

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034292

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.24

(51) Int. Cl. C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C12N 7/06 (2006.01)

(21) Номер заявки
201500952

(22) Дата подачи заявки
2010.08.02

(54) СПОСОБЫ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ADAMTS13 И ДРУГИХ БЕЛКОВ И ИХ
КОМПОЗИЦИИ

(31) 61/230,308

(56) US-A1-20070299250
KIM In Seop et al. Solvent/Detergent
Inactivation and Chromatographic Removal of Human
Immunodeficiency Virus During the Manufacturing of
a High Purity Antihemophilic Factor VIII Concentrate.
The Journal of Microbiology, 2000, Vol. 38, No. 3, pp.
187-191

(32) 2009.07.31

HOROWITZ B. et al. Inactivation of viruses
in labile blood derivatives. I. Disruption of lipid-
enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent
combinations. Transfusion, 1985, Vol. 25, No. 6, pp.
516-522

(33) US

US-B2-7037658

(43) 2016.05.31

(62) 201270214; 2010.08.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАКСАЛТА ГМБХ (CH); БАКСАЛТА
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

(72) Изобретатель:

Хасслахер Майнхард, Миттерер
Артур, Фидлер Кристиан, Майер
Криста (AT)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлен способ инактивации *in vitro* загрязнений вирусом с липидной оболочкой в растворе белка, содержащего терапевтический белок, при очистке терапевтической белковой композиции, возможно, содержащей загрязнение вирусом с липидной оболочкой. Способ включает иммобилизацию указанного терапевтического белка на носителе *in vitro* посредством связей между группой на носителе и группой на белке, причем указанная иммобилизация не осуществляется в присутствии смеси растворитель-дeterгент, и последующую обработку указанного терапевтического белка, пока он остается иммобилизованным на указанном носителе, смесью растворитель-дeterгент, включающей неионный deterгент и органический растворитель в концентрациях и в течение периода времени, достаточных для осуществления инактивации указанных загрязнений вирусом с липидной оболочкой.

B1

034292

034292
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По данной заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США № 61/230308, поданной 31 июля 2009 г., которая тем самым включена в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте, и на приоритет которой авторы настоящего изобретения претендуют.

Область техники

Настоящее изобретение относится в целом к способам очистки рекомбинантного белка, подобного дезинтегрину, и металлопептидазы с мотивом 13 тромbosпондина типа 1 (ADAMTS13) и других белков и композициям, содержащим такие очищенные белки.

Предпосылки создания изобретения

Семейство генов металлопротеиназ, ADAM (дезинтегрин и металлопротеиназа), включает члены, которые являются прикрепленными к мембране протеазами с разнообразными функциями. Члены семейства ADAMTS отличаются от ADAM наличием одного или нескольких подобных тромbosпондина-1 (TSP1) доменов на С-конце и отсутствием повтора EGF, трансмембранный домена и цитоплазматического хвоста, обычно отмечаемых у металлопротеиназ ADAM.

Подобный дезинтегрину белок и металлопептидаза с мотивом 13 тромbosпондина типа 1 (ADAMTS13) является членом семейства ADAMTS. ADAMTS13 имеет восемь тромbosпондиновых доменов и не имеет гидрофобного трансмембранный домена. Соответственно он секретируется. ADAMTS13 расщепляет фактор Виллебранда в месте связи Тир¹⁶⁰⁵-Мет¹⁶⁰⁶, и для его функционирования требуются ионы как кальция, так и цинка. ADAMTS13 также известен как "расщепляющая фактор Виллебранда протеаза" и "VWFCP".

Недостаточная экспрессия ADAMTS13 вовлечена в патогенез некоторых заболеваний, например тромботических нарушений, таких как тромботическая тромбоцитопеническая пурпур (TTP) (см., например, публикацию патентной заявки США № 20070015703). В случае TTP недостаток и/или ингибирование ADAMTS13 приводит к диссеминированным микроскопическим тромбам, которые образуются в мелких кровеносных сосудах по всему телу (тромботической микроангиопатии). Эритроциты, проходящие через микроскопические тромбы, подвергаются напряжению сдвига, которое вызывает повреждение мембраны эритроцита, которое, в свою очередь, приводит к внутрисосудистому гемолизу и образованию шизоцитов. Тромбозы также приводят к уменьшенному кровотоку, который может приводить в результате к повреждению органов. Симптомы обычно включают неврологические проблемы, такие как галлюцинация, аномальное поведение, измененное психическое состояние, удар или головные боли; почечную недостаточность; лихорадку и тромбоцитопению (низкое содержание тромбоцитов), приводящую к синяку или пурпуре; и микроангиопатическую гемолитическую анемию, включающую анемию и желтуху. Современная терапия включает плазмаферез для уменьшения количества циркулирующих антител против ADAMTS13 и/или пополнения уровней этого фермента в крови.

По этой причине существует острая необходимость в обеспечении способов очистки рекомбинантного ADAMTS13, в частности, в масштабе промышленного производства, который может использоваться в качестве терапевтического средства. Очистка ADAMTS13 была признана трудной, и были испробованы различные подходы, включая хроматографию. Хроматографический материал, который связывает не являющийся ADAMTS13 белок, что делает возможным попадание белка ADAMTS13 в элюат или супернатант, мог бы обеспечить применимый подход к очистке. Материал для хроматографии, который связывает белок ADAMTS13, в то время как не являющиеся ADAMTS13 примеси либо остаются в растворе, либо связываются намного сильнее, также представляет привлекательный подход и может использоваться в тандеме с другими подходами. В настоящем описании предоставлены такие подходы.

Кроме того, загрязнения вирусами представляли дополнительные проблемы при очистке белков ADAMTS13, а также других белков и рекомбинантных белков. Один традиционный подход включал обработку образца, подвергаемого очистке, смесью растворитель-дeterгент в растворе. Инкубация образца с химическими веществами смеси растворитель-дeterгент приводила к дезактивации покрытых липидами вирусов. Однако в случае этой обработки в растворе непроизводительно требовался перенос образца по меньшей мере в один другой сосуд, например, чтобы способствовать удалению химических веществ смеси растворитель-дeterгент после обработки. Кроме того, некоторые белки, включающие ADAMTS13, чувствительны к химическим веществам смеси растворитель-дeterгент, приводя к образованию агрегатов. В настоящем описании предоставлен подход, включающий иммобилизацию белка во время обработки смесью растворитель-дeterгент, для решения таких проблем в результате инактивации вирусов.

Краткое изложение сущности изобретения

Один аспект настоящего изобретения относится к способу очистки рекомбинантного белка, подобного дезинтегрину, и металлопептидазы с мотивом 13 тромbosпондина типа 1 (ADAMTS13) (в частности, ADAMTS13 человека) из образца, включающего белок ADAMTS13 и не являющиеся ADAMTS13 примеси. К удивлению было обнаружено, что хроматография с использованием гидроксиапатита может быть использована в условиях, подходящих для очистки белка ADAMTS13 от не являющихся ADAMTS13 примесей. Данный способ включает обогащение в отношении белка ADAMTS13 путем приведения образца хроматографически в контакт с гидроксиапатитом в условиях, обеспечивающих попадание белка ADAMTS13 в элюат из гидроксиапатита. Т.е. образец подвергают хроматографии с использо-

ванием гидроксиапатита в условиях, которые позволяют белку ADAMTS13, предпочтительно существенной части белка ADAMTS13, не связываться с гидроксиапатитом, в то время как примеси удерживаются. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный белок ADAMTS13 очищают из супернатанта, собранного из культивирующих СНО клеток, включающих нуклеиновую кислоту рекомбинантного ADAMTS13. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления процентный выход в супернатанте или элюате составляет, как ни удивительно, от 50 до 100%. Данный способ может дополнительно включать тандемную хроматографию, включающую приведение элюата из гидроксиапатита хроматографически в контакт со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает белок ADAMTS13. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления выход ADAMTS13 в процентах после обогащения тандемной хроматографией составляет, как ни удивительно, по меньшей мере 60%.

В некоторых вариантах осуществления способа дополнительно включает необязательную стадию подготовки к обогащению для увеличения концентрации ADAMTS13 в образце и/или связывания белка ADAMTS13 с анионообменной смолой. Например, способ может дополнительно включать приведение образца хроматографически в контакт с анионообменной смолой и элюирование белка ADAMTS13 из анионообменной смолы перед хроматографическим контактом с гидроксиапатитом; и/или концентрирование белка ADAMTS13 в образце ультрафильтрацией перед хроматографическим контактом с гидроксиапатитом; и/или стабилизацию белка ADAMTS13 обменом с использованием диафильтрации в буфер, включающий ионы кальция и ионы цинка, перед хроматографическим контактом с гидроксиапатитом. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления образец концентрируют 10-20-кратной ультрафильтрацией, обмен буфера осуществляют диафильтрацией с молекулярной отсечкой 30 кДа на буфер с низкой проводимостью, содержащий ионы кальция и цинка, и ADAMTS13 связывают и элюируют из анионообменной смолы, такой как ANX-Sepharose Fast Flow, POROS 50D или POROS 50PI, перед тандемной хроматографией. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления пул элюата со стадии анионообменной хроматографии разбавляют в соотношении 1:4 буфером для разжижения гидроксиапатита для снижения проводимости до 6 мСм/см перед тандемной хроматографией с использованием гидроксиапатита, включающей хроматографию с использованием гидроксиапатита, с последующей хроматографией с использованием элюата из гидроксиапатита, при использовании смолы с принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает белок ADAMTS13. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления элюат со стадии(и) предварительного обогащения может, как ни удивительно, быть обеспечен с процентным выходом, составляющим по меньшей мере 75%.

В некоторых вариантах осуществления способа дополнительно включает необязательную стадию доочистки катионообменной хроматографией после приведения в хроматографический контакт с гидроксиапатитом или смолой со смешанным принципом работы. В таких вариантах осуществления после приведения в контакт с гидроксиапатитом или смолой на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий способ может дополнительно включать стадию подготовки белка ADAMTS13 к катионообмену посредством снижения проводимости буфера. В некоторых вариантах осуществления эту стадию подготовки выполняют посредством ультрафильтрации/диафильтрации, диализа и/или гель-фильтрации. В некоторых вариантах осуществления, в которых используется ультрафильтрация/диафильтрация, отсечка составляет 10 кДа. В некоторых вариантах осуществления буферный обмен осуществляют анионообменной хроматографией на ANX Sepharose-FF с узким диапазоном разделения. В некоторых вариантах осуществления, в которых используется диализ, диализ может состоять не более чем из 2 прохождений через один модуль для диализа. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления катионообменную хроматографию выполняют на колонке Source S или колонке POROS S. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления выход ADAMTS13 в процентах после снижения проводимости буфера составляет, как ни удивительно, по меньшей мере 90% и после доочистки катионообменной хроматографией, как ни удивительно, по меньшей мере 70%.

В некоторых вариантах осуществления способа дополнительно включает подвергание белка ADAMTS13 необязательной стадии инактивации вирусов, например для дезактивации вирусов и/или удаления вирусов и вирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления стадия инактивации вирусов включает добавление смеси растворитель-детергент, включающей неионный детергент и органический растворитель, к белку ADAMTS13. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления белок ADAMTS13 является иммобилизованным, например иммобилизованным на катионообменной смоле. В некоторых вариантах осуществления смесь растворитель-детергент включает 1% TRITON X-100, 0,3% три-н-бутилфосфата и 0,3% TWEEN 80; и/или обработка смесью растворитель-детергент длится в течение 30 мин при 12-16°C. Альтернативно или дополнительно стадия инактивации вирусов может включать фильтрацию белка ADAMTS13 через нанофильтр для удаления вирусов и/или вирусных частиц. В некоторых таких вариантах осуществления нанофильтрацию осуществляют через фильтр 20 или 35 N перед и/или после обработки смесью растворитель-детергент. В некоторых вариантах осуществления стадию инактивации вирусов выполняют после стадии подготовки, описанной выше, и/или после стадии тандемной хроматографии, и/или после описанной выше катионообменной хроматографии для доочист-

ки. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления выход ADAMTS13 в процентах после инактивации вирусов, как ни удивительно, составляет по меньшей мере 95%.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает элюирование белка ADAMTS13 из катионообменной смолы. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления используют градиентное элюирование, например элюирование с использованием градиента, включающего первый буфер с низкой концентрацией соли и второй буфер с более высокой концентрацией соли. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления используют стадию элюирования, даже более предпочтительно стадия элюирования включает элюирование белка ADAMTS13 из смолы с использованием буфера для хранения. Например, буфер для хранения может иметь pH выше чем 7,0 и включать менее 10 mM ионов кальция, буферирующее соединение, 0,05% неионного детергента и соль. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления способ не включает последующую стадию концентрирования или буферного обмена после элюирования из смолы буфером для хранения.

В особенно предпочтительном варианте осуществления предоставлен способ очистки рекомбинантного белка ADAMTS13 из образца, включающего белок ADAMTS13 и не являющиеся ADAMTS13 примеси, который включает приведение образца хроматографически в контакт с гидроксиапатитом в условиях, обеспечивающих попадание белка ADAMTS13 в элюат или супернатант из гидроксиапатита; и затем приведение указанного элюата хроматографически в контакт со смолой на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает белок ADAMTS13, предпочтительно в виде тандемной хроматографии.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления описанным выше стадиям хроматографии предшествует приведение образца хроматографически в контакт с анионообменной смолой и элюирование белка ADAMTS13 из анионообменной смолы и/или концентрирование белка ADAMTS13 в образце ультрафильтрацией и стабилизация белка ADAMTS13 обменом с помощью диафильтрации в буфер, включающий ионы кальция и ионы цинка, перед хроматографическим контактом с гидроксиапатитом.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления после приведения в контакт с гидроксиапатитом или смолой на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий способ дополнительно включает стадию подготовки белка ADAMTS13 для катионного обмена путем снижения проводимости буфера, где стадию подготовки выполняют с использованием ультрафильтрации/диафильтрации; и/или с использованием диализа, состоящего не более чем из 2 прохождений через один модуль для диализа, и/или с использованием гель-фильтрации.

В еще одном особенно предпочтительном варианте осуществления способ включает получение образца из супернатанта, собранного из культивирующих CHO клеток, включающих нуклеиновую кислоту рекомбинантного ADAMTS13; приведение образца хроматографически в контакт с анионообменной смолой и элюирование белка ADAMTS13 из анионообменной смолы перед хроматографическим контактом с гидроксиапатитом; и/или концентрирование белка ADAMTS13 в образце ультрафильтрацией; и стабилизацию белка ADAMTS13 обменом с помощью диафильтрации в буфер, включающий ионы кальция и ионы цинка, перед хроматографическим контактом с гидроксиапатитом; с последующим приведением образца хроматографически в контакт с гидроксиапатитом в условиях, обеспечивающих попадание белка ADAMTS13 в элюат или супернатант из гидроксиапатита; и затем приведение элюата хроматографически в контакт со смолой на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает белок ADAMTS13; с последующей подготовкой белка ADAMTS13 для катионного обмена путем снижения проводимости буфера, например, с использованием ультрафильтрации/диафильтрации; и/или с использованием диализа, состоящего не более чем из 2 прохождений через один модуль для диализа; и/или с использованием гель-фильтрации, необязательно дополнительно включая одну или более стадий инактивации вирусов. В некоторых таких вариантах осуществления стадия инактивации вирусов включает добавление смеси растворитель-детергент, включающей неионный детергент и органический растворитель, к белку ADAMTS13, где белок ADAMTS13 иммобилизован на катионообменной смоле, и смесь растворитель-детергент включает 1% TRITON X-100, 0,3% три-н-бутилфосфата и 0,3% TWEEN 80. В еще одном варианте осуществления на стадии инактивации вирусов используют также или вместо обработки смесью растворитель-детергент нанофильтр для удаления вирусов и/или вирусных частиц. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления процентный выход ADAMTS13 в результате полной методики, представленной выше, как ни удивительно, составляет 22-24% или более и даже в более предпочтительных вариантах осуществления количество агрегатов, как ни удивительно, снижено на 50%.

В некоторых вариантах осуществления, в которых ADAMTS13 иммобилизован на катионообменной смоле, способ дополнительно включает элюирование белка ADAMTS13 из смолы, используя стадию элюирования буфером для хранения, имеющим pH выше чем 7,0 и включающим менее 10 mM ионов кальция, буферирующее соединение, 0,05% неионного детергента и соль; или используя градиентное элюирование, включающее первый буфер с низким содержанием соли и второй буфер с более высоким содержанием соли.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей рекомбинантный белок ADAMTS13, полученный согласно любому варианту осуществления способов, описанных в данном

описании. В некоторых вариантах осуществления композицией является фармацевтическая композиция, например композиция, содержащая очищенный белок ADAMTS13 и фармацевтически приемлемый носитель.

Еще дальнейший аспект настоящего изобретения относится к способу инактивации загрязнений вирусами в образце белка, где белком может быть любой белок из источника, который может иметь загрязнения вирусами. В предпочтительных вариантах осуществления белком является рекомбинантный белок, в частности белки, подверженные агрегации после воздействия органических растворителей и детергентов. В некоторых вариантах осуществления белком может быть белок ADAMTS13, в частности рекомбинантный ADAMTS13, или отличный белок (в частности, отличный рекомбинантный белок). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантным белком является фактор свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления белком является, например, один или несколько белков, выбранных из фактора VIII, фактора II, фактора VIIa, фактора IX, тромбина, фактора Виллебранда, антитела против MIF или другого белка, подвергаемого очистке с помощью хроматографии. Инактивация вирусов может быть осуществлена совместно с очисткой белка или без нее. В некоторых вариантах осуществления способ включает иммобилизацию белка на носителе и обработку иммобилизованного белка смесью детергент-растворитель, включающей неионный детергент и органический растворитель. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления носителем является хроматографическая смола. Даже в более предпочтительных вариантах осуществления смесь детергент-растворитель включает 1% Triton X-100, 0,3% три-н-бутилфосфата и 0,3% полисорбата 80 (Tween 80). Обработка смесью растворитель-детергент может продолжаться в течение удлиненного периода времени, например в течение от 30 мин до 1 ч, когда белок остается иммобилизованным на хроматографической смоле, например на катионообменной смоле; и/или обработка смесью растворитель-детергент может происходить при 2-10°C. Этот подход к инактивации вирусов может, как ни удивительно, уменьшить образование белковых агрегатов во время обработки смесью детергент-растворитель в значительной степени, например более чем на 50% по сравнению с обработкой смесью детергент-растворитель, когда белок присутствует в растворе, не являясь иммобилизованным. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления за данной процедурой следует элюирование белка из носителя буфером, такое как градиентное элюирование, где небольшое количество агрегатов, которое действительно образуются, в дальнейшем удаляется во фракции позднего элюирования. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления за данной процедурой следует элюирование белка буфером для хранения. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления буфер для элюирования включает Tween 80 в концентрации, составляющей 0,01%. В некоторых даже более предпочтительных вариантах осуществления способ не включает последующую стадию концентрирования или буферного обмена после элюирования из смолы с использованием буфера для хранения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления количество агрегатов, как ни удивительно, снижается на 50%.

В еще другом особенно предпочтительном варианте осуществления предоставляется способ инактивации загрязнений вирусами в образце белка, включающий иммобилизацию белка на хроматографической смоле и обработку иммобилизованного белка смесью растворитель-детергент, включающей 1% Triton X-100, 0,3% три-н-бутилфосфата и 0,3% полисорбата 80, в течение от 30 мин до 1 ч. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает элюирование белка с использованием буфера для хранения, имеющего pH выше чем 7,0 и включающего менее 10 мМ ионов кальция, буферирующее соединение, 0,05% неионного детергента и соль.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения описываются более подробно ниже.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 отображена блок-схема приводимых в качестве примеров стадий очистки рекомбинантного белка, подобного дезинтегрину, и металлопептидазы с мотивом 13 тромбоспондина типа 1 (ADAMTS13) из образца, включающего ADAMTS13 и не являющиеся ADAMTS13 примеси, в соответствии с настоящим изобретением. Порядок стадий, представленных на фиг. 1, может быть изменен и/или может быть пропущена одна или несколько стадий, как описано в данном описании, и как понятно специалисту в данной области техники.

На фиг. 2A-D отображены варианты выполнений очистки на катионообменной колонке. На фиг. 2A отображена процедура, включающая катионообменную хроматографию со стадией элюирования, после инактивации вирусов; на фиг. 2B отображена процедура, включающая катионообменную хроматографию со стадией элюирования, но без предшествующей инактивации вирусов; на фиг. 2C отображена процедура, включающая катионообменную хроматографию с использованием градиентного элюирования с последующей инактивацией вирусов на хроматографической колонке; и на фиг. 2D отображена процедура, включающая катионообменную хроматографию с использованием градиентного элюирования, но без предшествующей инактивации вирусов.

Подробное описание настоящего изобретения

Один аспект настоящего изобретения относится к способу очистки рекомбинантного белка, подобного дезинтегрину, и металлопептидазы с мотивом 13 тромбоспондина типа 1 (ADAMTS13) из образца, который может также включать не являющиеся ADAMTS13 примеси. Образец белка может также вклю-

чать загрязнения вирусами, которые можно удалить и/или инактивировать с помощью одной или нескольких-стадий инактивации вирусов.

Как использовано в данном описании, термины "подобный дезинтегрину, и металлопептидаза с мотивом 13 тромбоспондина типа 1", "ADAMTS13", "белок ADAMTS13", "полипептид ADAMTS13" и "рекомбинантный ADAMTS13" являются равнозначными (если особо не указано иное) и относятся к рекомбинантному белку ADAMTS13 млекопитающих, который также может быть биологически активным производным или фрагментом полноразмерного белка ADAMTS13. Аминокислотной последовательности полноразмерного белка ADAMTS13 человека и мыши соответствуют номера доступа в UniProtKB® - Q76LX8 и Q769J6. Детализацию структуры и информацию о последовательности ADAMTS13 человека можно найти у Zheng et al. ((2001) *J. Biol. Chem.* 276: 41059-41063).

Под используемым в данном описании термином "его биологически активное производное или фрагмент" подразумевают любые полипептиды с биологической функцией, соответствующей или, по существу, соответствующей биологической функции ADAMTS13. Полипептидные последовательности его биологически активных производных или фрагментов могут включать делеции, добавления и/или замены одной или нескольких аминокислот, отсутствие, присутствие и/или замена которых соответственно не оказывает какого-либо существенного отрицательного влияния на одну или несколько биологических активностей белка ADAMTS13. Например, альтернативный сплайсинг приводит к образованию вида с 130 кДа, который представляет собой биологически активный фрагмент полноразмерного белка. Биологическую активность указанных полипептидов можно определить с помощью хорошо известных методов, например методами тестирования протеолитической активности ADAMTS13 на факторе Виллебранда (vWF) и/или последующего уменьшения и/или приостановки последующих эффектов. Под "последующими эффектами" подразумевается одно или несколько биологических, биохимических или физиологических проявлений действия белка ADAMTS13 на его природный субстрат(ы), независимо от того, вызван ли этот эффект прямым или косвенным действием ADAMTS13, например эффект, являющийся результатом каскада явлений, следующих за активностью ADAMTS13. Анализы включают, но без ограничения, методы тестирования уменьшения и/или приостановки адгезии тромбоцитов к эндотелию, уменьшения и/или приостановки агрегации тромбоцитов, уменьшения и/или приостановки образования цепочек тромбоцитов, уменьшения и/или приостановки образования тромба, уменьшения и/или приостановки увеличения тромба, уменьшения и/или приостановки окклюзии сосуда, протеолитическое расщепление vWF (например, FRETS-VWF73 (Peptides International, Louisville, KY)) и/или распад тромбов (см., например, патент США 7270976, озаглавленный "Methods for measuring ADAMTS13 activity and protein on platelets and in plasma", со строки 55 в колонке 6 до строки 34 в колонке 10 и со строки 1 в колонке 12 до строки 25 в колонке 18, и патент США 7468258, озаглавленный "Self-quenching homofluorophore compositions for detecting enzyme activity", со строки 26 в колонке 11 до строки 50 в колонке 16; см. также публикацию патентной заявки США № 20070015703, озаглавленной "ADAMTS13-containing compositions having thrombolytic activity", параграфы [0036], [0043]-[0045] и [0053], и публикацию патентной заявки США № 20070065895, озаглавленной "Substrates specific to von Willebrand factor cleaving protease and method of assaying the activity"; и заявку на Европейский патент № 1990421 A1, озаглавленную "Method for Detection of Condition in Consciousness Disorder Patient and Kit for the Detection", которые включены в данное описание посредством ссылки, что касается анализов полипептидов ADAMTS13 и их производных и/или фрагментов).

Рекомбинантный ADAMTS13, например рекомбинантный ADAMTS13 человека, можно экспрессировать с помощью любого известного в данной области техники способа. Один конкретный пример описан в заявке WO 02/42441, которая включена в данное описание посредством ссылки, что касается способа получения рекомбинантной нуклеотидной последовательности ADAMTS13 (см. со строки 6 на с. 14 до строки 4 на с. 18). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный ADAMTS13 продуцируют согласно следующему способу: (i) получение рекомбинантной нуклеотидной последовательности ADAMTS13 с помощью генетической инженерии, например посредством обратной транскрипции РНК и/или амплификации ДНК; (ii) введение рекомбинантной нуклеотидной последовательности ADAMTS13 в эукариотические клетки, например, с помощью трансфекции, например посредством электропорации или микропиньекции; (iii) культивирование трансформированных клеток, например, непрерывно или периодически; (iv) обеспечение экспрессии рекомбинантного ADAMTS13, например, конститутивно или в результате индукции; и (v) выделение образцов, включающих экспрессированный рекомбинантный ADAMTS13, например, из культуральной среды или путем сбора трансформированных клеток; и (vi) очистка белка ADAMTS13 из образца согласно описанным в данном описании способам.

Рекомбинантный ADAMTS13 можно продуцировать экспрессией в подходящей системе-хозяине, предпочтительно эукариотической системе-хозяине и более предпочтительно в системе, характеризующейся тем, что она может продуцировать фармакологически эффективную молекулу ADAMTS13. Примеры эукариотических клеток включают, но без ограничения, клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Нер и HepG2. В предпочтительном варианте осуществления используют клетки CHO, и данные клетки секретируют рекомбинантный белок ADAMTS13 в культуральную среду. Нет ограничения в отношении реагентов или условий, используемых для рекомбинантной экспрессии

ADAMTS13, и может быть использована любая система, известная в данной области техники или коммерчески доступная.

Как используется в данном описании, "образец" относится к любой композиции, содержащей белок ADAMTS13 и не являющиеся ADAMTS13 примеси. Специалисту в данной области будет очевидно, что образец, как используется в данном описании, может быть результатом описанного выше продуцирования рекомбинантного ADAMTS13. Соответственно образец может включать супернатант, собранный при культивировании трансформированных клеток, которые экспрессируют рекомбинантный ADAMTS13; буферы, включающие ADAMTS13, на одной или нескольких стадиях процесса очистки рекомбинантного белка ADAMTS13 из культуральной среды; и/или трансформированные клетки, полученные из культуры клеток. Альтернативно образцом может быть кровь, плазма или фракция крови или плазмы.

В некоторых вариантах осуществления ADAMTS13 подвергают очистке из образца, включающего супернатант 100-л культуры клеток. Однако специалисту в данной области будет понятно, что масштаб способов настоящего изобретения может быть увеличен сообразно обстоятельствам, например, для высокомасштабного производства. Соответственно в некоторых вариантах осуществления способ включает очистку белка ADAMTS13 в масштабе промышленного производства, например по меньшей мере из приблизительно 250-л образца, по меньшей мере приблизительно 500-л образца или по меньшей мере приблизительно 1000-л образца.

Как использовано в данном описании, "не являющиеся ADAMTS13 примеси", как правило, относятся к связанным с процессом примесям (загрязнениям). Примеси могут включать, например, имеющие отношение к клеткам-хозяевам примеси (такие как загрязняющие белки клеток-хозяев, также называемые антигенами клеток-хозяев) и другие биомолекулярные примеси, такие как ДНК, РНК и клеточный дебрис; компонент(ы) сред; растворители; детергенты и т.п. Кроме того, не являющиеся ADAMTS13 примеси также включают связанные с продуктом примеси, например производные или фрагменты белка ADAMTS13, которые не являются биологически активными, или агрегаты белка ADAMTS13. В случае крови или плазмы не являющиеся ADAMTS13 примеси могут включать другие белки, обычно обнаруживаемые в крови или плазме, например альбумин, иммуноглобулины и т.д. Как используется в данном описании, "агрегат" относится к структуре, включающей более одной молекулы полипептида ADAMTS13 или более одной любой другой молекулы белка, которая соответствует высокомолекулярным структурам или олигомерным структурам, таким как димеры, тримеры и другие мультимеры макромолекулы. "Не являющиеся ADAMTS13 примеси" могут также включать загрязнения вирусами. "Загрязнения вирусами" относятся к любым примесям, являющимся следствием присутствия и/или происходящим из вируса, включающим, например, вирусные частицы, вирусные белки, вирусную ДНК, вирусную РНК или их фрагменты.

Термины "очистка", "очищенный" и т.п. относятся к удалению, изолированию или отделению ADAMTS13 от не являющихся ADAMTS13 примесей. Например, рекомбинантный белок ADAMTS13, экспрессируемый в клетках-хозяевах растений, бактерий, дрожжей или млекопитающих, может быть очищен посредством удаления не являющихся ADAMTS13 примесей, включающих, например, белки клеток-хозяев. Процент чистоты может относиться к проценту белка ADAMTS13 по отношению к белку клеток-хозяев (например, белку клеток СНО). "По существу, очищенный" рекомбинантный ADAMTS13 лишен по меньшей мере, приблизительно 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 75% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% (или приблизительно 95%, приблизительно 99% или приблизительно 99,9%) не являющихся ADAMTS13 примесей. В частности, "по существу, очищенный" рекомбинантный ADAMTS13 лишен по меньшей мере приблизительно 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 75% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% (или приблизительно 95%, приблизительно 99% или приблизительно 99,9%) белков клеток-хозяев. Белки клеток-хозяев можно детектировать, например, с помощью иммунохимических способов, используя поликлональные антисыворотки, как обсуждается более подробно ниже.

Удаление загрязнений может также привести к обогащению белком ADAMTS13. Как использовано в данном описании, "обогащение" и "обогащать" относится к увеличению процентного содержания рекомбинантного ADAMTS13 в образце. Соответственно обогащение белком ADAMTS13 имеет место, когда процентное содержание ADAMTS13 увеличивается в образце после некоторой манипуляции с образцом, например, подвергания образца одной или нескольким хроматографическим стадиям. В одном варианте осуществления ADAMTS13 является, по существу, обогащенным, когда отмечается по меньшей мере приблизительно от 10-кратного до приблизительно 115-кратного уменьшения не являющихся ADAMTS13 примесей, в частности белков клеток-хозяев. В одном варианте осуществления ADAMTS13 является, по существу, обогащенным, когда отмечается по меньшей мере приблизительно 20-кратное (например, приблизительно 30-кратное, приблизительно 40-кратное, приблизительно 50-кратное, приблизительно 60-кратное, приблизительно 70-кратное, приблизительно 80-кратное, приблизительно 90-кратное, приблизительно 100-кратное и т.д.) уменьшение не являющихся ADAMTS13 примесей, и, в частности, уменьшение имеет место в отношении белков клеток-хозяев.

Специалист в данной области будет способен использовать имеющиеся в данной области техники

способы для определения кратности уменьшения не являющихся ADAMTS13 примесей, в частности белков клеток-хозяев. Например, можно использовать анализ для не являющихся ADAMTS13 примесей. В одном варианте осуществления образцом является кондиционированный супернатант, собранный при культивировании трансформированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный ADAMTS13, и в анализе для определения кратности уменьшения не являющихся ADAMTS13 примесей определяют уровни белков клеток-хозяев. В одном конкретном варианте осуществления трансформированными клетками являются трансформированные клетки СНО, и анализом является иммуноферментный твердо-фазный серологический анализ, в котором измеряются белки клеток СНО. Кратность уменьшения не являющихся ADAMTS13 примесей можно рассчитать, например, как количество не являющихся ADAMTS13 примесей, извлеченных из сорбента, как уровень примесей в загружаемом образце (например, в ч./млн), разделенный на уровень примесей в элюате (например, в ч./млн).

Белки клеток-хозяев можно детектировать, например, с помощью иммунохимических способов, используя поликлональные антисыворотки против белковых компонентов клетки-хозяина и/или рекомбинантной векторной системы, использованной для производства ADAMTS13. Как правило, можно индуцировать антисыворотки против антигена, происходящего из клетки-хозяина, которая включает экспрессионный вектор, который используют в процессе производства, но в котором отсутствует ген, кодирующий ADAMTS13. Имеющие отношение к клеткам-хозяевам примеси можно извлечь, используя способ(ы), идентичный(ые) и/или, по существу, аналогичный(ые) описанным в данном описании способом. Очищенные (или частично очищенные) антигены клетки-хозяина, полученные при использовании способа(ов), идентичного(ых) и/или, по существу, аналогичного(их) описанным в данном описании способом, можно далее использовать для приготовления антисывороток против белковых компонентов клетки-хозяина и рекомбинантной векторной системы, используемой для производства ADAMTS13. Белки клетки-хозяина можно детектировать, используя антисыворотки, в иммуноанализе, например в ELISA, или анализе вестерн-блоттинге. Являющиеся белками клетки-хозяина примеси можно также детектировать путем разделения подвергаемого анализу образца с помощью двумерного гель-электрофореза и окрашивания серебром и/или окрашивания коллоидным золотом для выявления присутствия белков. Можно также использовать ВЭЖХ для количественного определения уровней имеющих отношение к клеткам-хозяевам примесей; однако способы с использованием ВЭЖХ не являются столь же чувствительными, как иммуноанализ или способы окрашивания серебром. Предпочтительно имеющие отношение к клеткам-хозяевам примеси уменьшают до уровней, которые ниже уровней, выявляемых при использовании, например, одного или нескольких из этих аналитических способов.

Используемый в данном описании термин "приблизительно" означает примерный диапазон, составляющий плюс или минус 10% от указанной величины.

Обогащение ADAMTS13.

В целом, настоящим изобретением обеспечивается способ очистки рекомбинантного белка ADAMTS13 (предпочтительно белка ADAMTS13 человека) из образца, включающего белок ADAMTS13 и не являющиеся ADAMTS13 примеси, который включает приведение образца хроматографически в контакт с (i) гидроксиапатитом или (ii) гидроксиапатитом и смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий в tandemе так, чтобы повысить количество ADAMTS13 в образце. Как используется в данном описании, "приведение хроматографически в контакт" относится к приведению образца или другой смеси, подвергаемой разделению, в контакт с хроматографической смолой, используя любой способ хроматографии, описанный в данном описании и/или известный в данной области техники. Способы включают, но без ограничения, хроматографию периодического режима и колоночную хроматографию. Приведение в контакт осуществляют, подвергая образец воздействию смолы и/или инкубирования образца на, в или внутри смолы, фильтрования образца через смолу или любыми другими способами. Буфером, используемым для хроматографии, является фосфатный буфер.

В некоторых вариантах осуществления образец приводят хроматографически в контакт с гидроксиапатитом в условиях, обеспечивающих попадание белка ADAMTS13 в элюат из гидроксиапатита. При использовании "в условиях" отсылают к одному или нескольким параметрам или переменным, при которых проводят хроматографию, включающим, например, высоту колонки, набивку, буфер (рН, концентрацию соли, ионную силу и т.д.), температуру, давление и т.п. Т.е. образец подвергают хроматографии с использованием гидроксиапатита в условиях, которые позволяют белку ADAMTS13, предпочтительно существенной части белка ADAMTS13, в образце не связываться с гидроксиапатитом. В случае использования колоночной хроматографии белок ADAMTS13, предпочтительно его существенная часть, будет протекать через колонку с обогащением, таким образом, в буфере, вытекающем из колонки в виде проточной фракции или элюата, в то время как не являющиеся ADAMTS13 примеси будут удерживаться. В случае использования хроматографии периодического режима супернатант или супернатантная фракция будет включать белок ADAMTS13 или его существенную часть. Термин "элюат" используется в данном описании взаимозаменяя с термином "проточная фракция", "супернатант" или "супернатантная фракция". Элюат (или супернатант) можно собрать. Такой сбор происходит, например, путем цен-

трифугирования, осаждения, фильтрации и т.д. хроматографической смолы после подвергания образца воздействию смолы и завершения инкубации. Элюат (или супернатант) из гидроксиапатита можно далее подвергнуть одной или нескольким стадиям согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, например, способ дополнительно включает приведение элюата из гидроксиапатита хроматографически в контакт со смолой, такой как смола с принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает белок ADAMTS13. Т.е. образец белка ADAMTS13 может быть подвергнут тандемной хроматографии сначала с использованием гидроксиапатита предпочтительно в условиях, при которых существенная часть белка ADAMTS13 не связывается с гидроксиапатитом, с последующим использованием смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает белок ADAMTS13. Ниже представлены дополнительные детали, касающиеся стадии хроматографии с использованием гидроксиапатита и необязательной тандемной стадии хроматографии со смешанным принципом работы, используя смолу на основе катионного обмена/гидрофобных взаимодействий.

(а) Хроматография с использованием гидроксиапатита.

Стадия хроматографии с использованием гидроксиапатита включает любой способ хроматографии с использованием гидроксиапатита, который описан в данном описании, известен в данной области техники или может быть оценен специалистом в данной области техники, особенно с учетом приведенных в данном описании сообщений. Способы хроматографии с использованием гидроксиапатита широко известны в данной области техники. Гидроксиапатит имеет химическую формулу $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ и является основным минеральным компонентом костей и зубов, а также других биологических структур. Гидроксиапатит можно получить из таких природных источников или можно синтезировать хорошо известными способами. Гидроксиапатит широко используется в качестве хроматографической среды или носителя, в частности, для хроматографического разделения белков. Размер частиц не является, как правило, решающим и может значительно варьироваться. Типичные частицы имеют размеры в диаметре в интервале приблизительно от 1 до приблизительно 1000 мкм, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 100 мкм. Пористость может также значительно варьироваться. В предпочтительных вариантах осуществления средний диаметр пор колеблется приблизительно от 100 до приблизительно 10000 Å, более предпочтительно приблизительно от 500 до приблизительно 3000 Å, даже предпочтительнее от 500 до 3000 Å.

Различные гидроксиапатитные хроматографические среды коммерчески доступны, и при осуществлении на практике описанных в данном описании способов может использоваться любая доступная форма материала. Не ограничивающие примеры коммерчески доступных материалов, представляющих собой гидроксиапатитную керамику, которые могут использоваться, включают MACRO-PREP™, типы I и II гидроксиапатита (Biorad, Hercules, CA) и HA ULTROGEL® (PALL, Ann Arbor, MI). В одном варианте осуществления образец подвергают хроматографии с использованием типа II гидроксиапатита (Biorad, Hercules, CA).

Как ни удивительно, было обнаружено, что в результате приведения образца хроматографически в контакт с гидроксиапатитом значительная или существенная часть не являющихся ADAMTS13 примесей в образце связывается с гидроксиапатитом, в то время как значительная или существенная часть белка ADAMTS13 остается в растворе. Соответственно, как обсуждалось выше, обработка образца гидроксиапатитом может быть выполнена хроматографией периодического режима или колоночной хроматографией в соответствии с хорошо известными методами, и, по существу, обогащенный белок ADAMTS13 получают в супернатанте или элюате соответственно.

Как используется в данном описании, "существенная часть" относится к выходу при извлечении в супернатанте или элюате, составляющему приблизительно от 30 до приблизительно 100% (например, приблизительно от 40 до приблизительно 90%, например, приблизительно от 50 до приблизительно 80%, например, приблизительно от 60 до приблизительно 70%) рекомбинантного белка ADAMTS13 из образца по сравнению с его содержанием до стадии хроматографии с использованием гидроксиапатита. Например, выход при извлечении в супернатанте или элюате, составляющий приблизительно от 50 до приблизительно 100%, означает, что образец был подвергнут хроматографии с использованием гидроксиапатита в условиях, обеспечивающих протекание существенной части белка ADAMTS13.

В предпочтительных вариантах осуществления образец, подвергаемый хроматографии с использованием гидроксиапатита, имеет низкую проводимость, например приблизительно от 3 до приблизительно 15 мСм/см при комнатной температуре, предпочтительно менее приблизительно 10 мСм/см при комнатной температуре. В одном варианте осуществления образец имеет проводимость, составляющую 6 мСм/см при комнатной температуре. В другом варианте осуществления образец имеет проводимость, составляющую 7 мСм/см при комнатной температуре. Специалисту в данной области будет очевидно, что проводимость образца можно регулировать с помощью солевого раствора, включающего нейтральные соли, например хлорид натрия, хлорид калия, сульфат натрия, фосфат натрия, фосфат калия и т.п., и ему можно придать подходящие буферные свойства с помощью приблизительно 20 мМ фосфатного буфера. Предпочтительно образец имеет pH приблизительно от 6,5 до приблизительно 9,0 и предпочтитель-

тельно он имеет pH от 7 до 8. Образец может оставаться в контакте с гидроксиапатитом в течение любой продолжительности, которая будет обеспечивать достаточное связывание не являющихся ADAMTS13 примесей, например в течение приблизительно от 5 мин до приблизительно 24 ч. Обогащенный ADAMTS13 можно получить в супернатантной фракции или проточной фракции, которая может включать элюат от последующих промывок, особенно первой промывки.

В одном варианте осуществления подвергание образца хроматографии с использованием гидроксиапатита в условиях, обеспечивающих сохранение существенной части белка ADAMTS13 в супернатанте или элюате, приводит к обогащению ADAMTS13, например, приблизительно от 10-кратного уменьшения до приблизительно 115-кратного уменьшения не являющихся ADAMTS13 примесей, в частности белков клеток-хозяев, по сравнению с образцом до хроматографии с использованием гидроксиапатита. В одном варианте осуществления хроматографии с использованием гидроксиапатита уменьшает количество белков клеток-хозяев в образце по меньшей мере приблизительно в 20 раз (например, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 60 раз, приблизительно 70 раз, приблизительно 80 раз, приблизительно 90 раз, например, приблизительно 100 раз и т.д.).

В предпочтительных вариантах осуществления подвергание образца хроматографии с использованием гидроксиапатита в условиях, обеспечивающих сохранение существенной части белка ADAMTS13 в супернатанте или элюате, приводит к удалению приблизительно от 90% до приблизительно 99% не являющихся ADAMTS13 примесей, в частности белков клеток-хозяев. В одном варианте осуществления подвергание образца хроматографии с использованием гидроксиапатита приводит к удалению по меньшей мере приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, приблизительно 99,5% и т.д.) не являющихся ADAMTS13 примесей, в частности удалению белков клеток-хозяев. Соответственно способы, описанные в данном описании, включающие обогащение в отношении белка ADAMTS13 путем подвергания образца хроматографии с использованием гидроксиапатита в условиях, обеспечивающих сохранение существенной части белка ADAMTS13 в супернатанте или элюате, также может обеспечить буфер, включающий белок ADAMTS13, который является, по существу, очищенным.

Приводимые в качестве примеров условия колоночной хроматографии, которые обеспечивают протекание существенной части ADAMTS13 через хроматографическую колонку с гидроксиапатитом, предоставлены в примерах ниже. Как правило, для обеспечения протекания существенной части белка ADAMTS13 во время хроматографии с использованием гидроксиапатита хроматографическая колонка будет предпочтительно иметь высоту слоя приблизительно от 5 до приблизительно 30 см, например 20-30 см. Кроме того, перед подверганием образца хроматографии с использованием гидроксиапатита, например, перед внесением образца в колонку с гидроксиапатитом, колонка может быть сначала промыта, активирована и/или уравновешена с использованием соответствующих известных буферов для промывки, активации и/или уравновешивания, в частности, таких, которые рекомендованы производителем гидроксиапатита. В одном варианте осуществления колонку активируют и уравновешивают одним и тем буфером, например буфером, включающим 20 mM Na/K PO₄, имеющим pH 7,0 и проводимость 5,5 мСм/см при комнатной температуре.

(б) Хроматография со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий.

В одном варианте осуществления белок ADAMTS13 обогащают tandemной хроматографией с использованием гидроксиапатита с последующим использованием смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает белок ADAMTS13. Как ни удивительно, было обнаружено, что ADAMTS13 связывается со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, в то время как не являющиеся ADAMTS13 примеси либо остаются в растворе, либо связываются намного сильнее со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий. Соответственно обработку образца гидроксиапатитом с последующей обработкой смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий можно выполнить последовательной хроматографией периодического режима или последовательной колоночной хроматографией согласно широко известным способам, и, по существу, обогащенный ADAMTS13 может быть собран в конечной супернатантной фракции или конечном пуле элюата после подвергания образца tandemной хроматографии периодического режима или tandemной колоночной хроматографии соответственно. Соответственно, как описано в данном описании, белок ADAMTS13 обогащают, подвергая образец хроматографии с использованием гидроксиапатита в условиях, обеспечивающих сохранение существенной части белка ADAMTS13 в супернатанте или его протекание через колонку, включающую гидроксиапатит, в качестве элюата. После обработки гидроксиапатитом собранный супернатант или элюат, включающий обогащенный ADAMTS13, необязательно подвергают хроматографии периодического режима или колоночной хроматографии с использованием смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий. В одном варианте осуществления супернатант или элюат со стадии хроматографии с использованием гидроксиапатита вводят в хроматографическую колонку, включающую

смолу со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий. Хроматографию периодического режима или колоночную хроматографию с использованием смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий можно проводить любым способом, который описан в данном описании, известен в данной области техники или может оценить специалист в данной области техники, особенно с учетом приведенных в данном описании сообщений. Предпочтительной смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, подходящей для применения после хроматографии с использованием гидроксиапатита, является матрица на основе сефарозы, включающая гидрофильный линкер. Гидрофильный линкер может включать функциональный лиганд, например, через посредство тиоэфирной группы. Гидрофильный лиганд может быть отрицательно заряженным и может дополнительно включать гидрофобную группу, например углеводород. Гидрофильный лиганд, дополнительно включающий гидрофобную группу, может создавать лиганд со смешанным принципом работы, т.е. лиганд с мультимодальной функциональностью, подходящие для выполнения описываемой в данном описании хроматографии со смешанным принципом работы. В некоторых вариантах осуществления ионная способность смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий может составлять приблизительно от 0,07 до приблизительно 0,09 мМ/мл и имеет pH, стабильно находящийся приблизительно от 2 до приблизительно 14. Как правило, ADAMTS13 будет связываться со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий через ионные, водородные и/или гидрофобные связи.

Примеры коммерчески доступных смол со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которые могут использоваться в соответствии с описанными в данном описании способами, включают, но без ограничения, среду CAPTO™ MMC (GE Healthcare) и SampliQ SAX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). В предпочтительном варианте осуществления смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий является CAPTO™ MMC. CAPTO™ MMC представляет собой мультимодальную слабую катионообменную смолу на основе твердой, в высокой степени сшитой, гранулированной агарозы со средним размером частиц, составляющим приблизительно 75 мкм. Она включает лиганда с мультимодальной функциональностью, которые связывают белки при высоких концентрациях соли. Она характеризуется обычной скоростью потока, составляющей приблизительно 600 см/ч в случае колонки с диаметром 1 см, высотой слоя приблизительно от 10 до приблизительно 20 см, приблизительно при 20°C, при использовании технологических буферов с вязкостью, приблизительно равной вязкости воды при менее чем приблизительно 3 бар (приблизительно 0,3 МПа).

Во время хроматографии с использованием смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий ADAMTS13 связывается со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий и дополнительно отделяется от не являющихся ADAMTS13 примесей (например, белков клеток-хозяев, присутствующих в образце до обогащения). В случае выполнения стадии хроматографии со смешанным принципом работы на колонке белок ADAMTS13 абсорбируется на смоле на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, в то время как загрязняющие не являющиеся ADAMTS13 примеси удаляются из технологической цепи и отделяются от белка ADAMTS13 в образце в результате протекания через хроматографическую колонку.

Смолу со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, на которой абсорбируется ADAMTS13, затем промывают, например, для удаления слабосвязанных загрязнений или примесей и/или для подгонки проводимости буфера в препарате для элюирования ADAMTS13 из смолы. Т.е. после приведения образца хроматографически в контакт с гидроксиапатитом и приведения собранного супернатанта или элюата, включающего ADAMTS13, хроматографически в контакт со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий и абсорбции на ней смолу со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий промывают буфером для промывки. Как правило, буфер для промывки будет включать буферирующие фосфатный ион и нейтральную соль и будет иметь высокое значение pH, чтобы связывание ADAMTS13 со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий ослаблялось по мере увеличения соответствующих параметров буфера, например увеличения концентрации соли и/или pH буфера. В одном варианте осуществления связавшую ADAMTS13 смолу со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий сначала промывают уравновешивающим буфером, например уравновешивающим буфером, включающим приблизительно 20 мМ фосфат и приблизительно 25 мМ NaCl и имеющим pH приблизительно 7,0 при комнатной температуре. Последующие промывки могут выполняться с использованием буфера для промывки, включающего, например, приблизительно 20 мМ фосфат, приблизительно 80 мМ NaCl и имеющим pH приблизительно 8,0 при комнатной температуре. Связавшую ADAMTS13 смолу со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий можно подвергнуть конечной промывке буфером, включающим, например, 50 мМ Na/K PO₄ и 160 мМ NaCl и имеющим pH приблизительно 8,0 и проводимость, составляющую 16,5 мСм/см при комнатной температуре.

После хроматографии с использованием гидроксиапатита с последующей хроматографией со смешанным принципом работы с использованием смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает белок ADAMTS13, и необязательной промывки рекомбинантный белок ADAMTS13 подвергают элюированию из хроматографической смолы со смешанным принципом работы буфером для элюирования. Как правило, буфер для элюирования будет включать приблизительно от 5 до приблизительно 100 мМ буферирующих ионов, например от 20 до 50 мМ буферирующих ионов. Приводимые в качестве примеров буфера включают, но без ограничения, фосфат, Трис, HEPES, имидазол, гистидин, MES, цитрат, Gly-Gly, Трис/ацетат и т.п. Буфер для элюирования также обычно включает одновалентные или двухвалентные катионы, такие как, но без ограничения, ионы натрия, калия или кальция, предпочтительно в высоких концентрациях в форме соли (например, с анионами Cl⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻ или OAc и т.п.). В предпочтительном варианте осуществления буфер для элюирования включает ионы натрия в высокой концентрации, например в концентрации, превышающей приблизительно 700 мМ Na⁺. Буфер для элюирования может иметь pH в диапазоне приблизительно от 7 до приблизительно 11. В одном варианте осуществления буфер для элюирования включает 50 мМ Na/K PO₄, 1000 мМ NaCl и имеет pH, равный 8,0, и проводимость, составляющую 93 мСм/см при комнатной температуре.

Приводимые в качестве примеров условия, обеспечивающие связывание обогащенного ADAMTS13, полученного в виде элюата из колонки с гидроксиапатитом, со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий в колонке и его отделение от не являющихся ADAMTS13 примесей, представлены в примерах ниже. Как правило, высота слоя в колонке со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий может составлять приблизительно от 1 см до приблизительно 100 см или даже больше в зависимости от объема образца. Кроме того, отношение объема хроматографической колонки с гидроксиапатитом к объему колонки со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий может составлять приблизительно 10:1 в зависимости, например, от количества не являющихся ADAMTS13 примесей в образце по сравнению с количеством ADAMTS13.

Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что в случае вариантов осуществления, включающих tandemную хроматографию с использованием гидроксиапатита и смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, смолы и буфера, используемые для промывки, активации и/или уравновешивания, будут в определенных вариантах осуществления выбираться таким образом, чтобы они были совместимыми с обеими колонками. В одном варианте осуществления колонки активируют по отдельности. В другом варианте осуществления колонки уравновешивают, загружают и промывают один раз в tandemе с последующей одной или несколькими вторыми или последующими промывками и элюированиями, применяемыми только к смоле со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий. В одном варианте осуществления буфера для активации и уравновешивания хроматографической колонки со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий являются такими, как используют для активации и уравновешивания колонки с гидроксиапатитом. В одном варианте осуществления буфером для активации и уравновешивания хроматографической колонки со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий является буфер, включающий 20 мМ Na/K PO₄ и имеющий pH, равный 7,0, и проводимость 5,5 мСм/см при комнатной температуре.

В предпочтительных вариантах осуществления образец подвергают tandemной хроматографии с использованием гидроксиапатита и смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий в условиях, обеспечивающих протекание существенной части белка ADAMTS13 через гидроксиапатитную смолу, с последующим ее связыванием и затем элюированием из смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий. В более предпочтительных вариантах осуществления эта tandemная хроматография приводит, по существу, к обогащенному ADAMTS13. В некоторых вариантах осуществления подвергание образца, например кондиционированного супернатанта, собранного при культивировании трансформированных клеток-хозяев, экспрессирующих рекомбинантный ADAMTS13, который может быть подвергнут предварительному обогащению, tandemной хроматографии, описанной в данном описании, дает приблизительно от 40 до приблизительно 80% ADAMTS13 (например, приблизительно от 45 до приблизительно 75%, например, приблизительно от 50 до приблизительно 70%, например, приблизительно от 55 до приблизительно 65%) и/или приблизительно от 40 до приблизительно 90% активности (например, приблизительно от 45 до приблизительно 85%, например, приблизительно от 50 до приблизительно 80%, например, приблизительно от 55 до приблизительно 75%).

В некоторых вариантах осуществления в результате tandemной хроматографии удаляется приблизительно от 90 до приблизительно 99% имеющих отношение к клеткам-хозяевам примесей. В одном варианте осуществления описываемая в данном описании tandemная хроматография увеличивает чистоту ADAMTS13 по меньшей мере приблизительно в 600 раз, например по меньшей мере приблизительно в 650 раз, например по меньшей мере в приблизительно 700 раз, например по меньшей мере приблизительно в 800 раз, например по меньшей мере приблизительно в 900 раз, например по меньшей мере при-

близительно в 1000 раз, например по меньшей мере приблизительно в 1100 раз, например по меньшей мере приблизительно в 1200 раз, например по меньшей мере приблизительно в 1300 раз, например по меньшей мере приблизительно в 1400 раз или по меньшей мере приблизительно в 1500 раз по сравнению с чистотой ADAMTS13 до подвергания образца тандемной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления подвергание образца, например кондиционированного супернатанта, собранного при культивировании трансформированных клеток-хозяев, экспрессирующих рекомбинантный ADAMTS13, который может быть подвергнут предварительному обогащению, предпочтительно путем ультрафильтрации/диафильтрации и/или анионообменной хроматографии, описанной в данном описании, тандемной хроматографии приводит к образцу с приблизительно от 600 до приблизительно 1500 ч./млн не являющихся ADAMTS13 примесей (например, антигенов клеток-хозяев). Например, тандемная хроматография может приводить к образцу с приблизительно от 750 до приблизительно 1250 ч./млн не являющихся ADAMTS13 примесей, предпочтительно к образцу с менее чем приблизительно 1000 ч./млн не являющихся ADAMTS13 примесей.

В некоторых вариантах осуществления тандемная хроматография приводит приблизительно к 1000-кратному уменьшению до приблизительно 3000-кратного уменьшения не являющихся ADAMTS13 примесей (в частности, антигенов клеток-хозяев) по сравнению с образцом до тандемной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления подвергание кондиционированного супернатанта, собранного при культивировании трансформированных клеток-хозяев, экспрессирующих рекомбинантный ADAMTS13, который может быть подвергнут предварительному обогащению, тандемной хроматографии, описанной в данном описании, уменьшает количество не являющихся ADAMTS13 примесей (например, антигенов клеток-хозяев) по меньшей мере приблизительно в 1000 раз, например по меньшей мере приблизительно в 1300 раз, например по меньшей мере приблизительно в 1500 раз, например по меньшей мере приблизительно в 2000 раз, например по меньшей мере приблизительно в 2500 раз, например по меньшей мере приблизительно в 3000 раз и т.д.

Соответственно в предпочтительных вариантах осуществления буфер для элюирования из смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, который включает рекомбинантный ADAMTS13, обеспечивает композицию, содержащую белок ADAMTS13, который является, по существу, очищенным.

Подготовка образца к предварительному обогащению.

В некоторых вариантах осуществления описываемый в данном описании способ дополнительно включает подготовку образца, включающего ADAMTS13, к обогащению с помощью хроматографии с использованием гидроксиапатита или тандемной хроматографии с использованием гидроксиапатита и смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий. На этой необязательной стадии предварительного обогащения ADAMTS13 в образце может быть подвергнут одной из двух или обеим манипуляциям: (a) концентрированию с помощью ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF) и/или (b) приведению хроматографически в контакт с ионообменной смолой, с которой ADAMTS13 связывается и из которой он впоследствии элюируется.

(a) Предварительное обогащение ультрафильтрацией/диафильтрацией (UF/DF).

На необязательной стадии предварительного обогащения ADAMTS13 в образце концентрируют с помощью предварительного обогащения ультрафильтрацией, и обмен буфера образца осуществляют с помощью диафильтрации. Стадию предварительного обогащения ультрафильтрацией/диафильтрацией обычно выполняют перед обогащением ADAMTS13 хроматографией с использованием гидроксиапатита или тандемной хроматографией с использованием гидроксиапатита, и последующим использованием смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, описанной выше. Стадию предварительного обогащения ультрафильтрацией/диафильтрацией обычно выполняют перед любым предварительным обогащением анионообменной хроматографией (в случае ее выполнения). Стадия предварительного обогащения ультрафильтрацией/диафильтрацией (UF/DF) может быть эффективна при удалении низкомолекулярных компонентов, например низкомолекулярных компонентов сред для культивирования клеток. Такие компоненты могут связываться с последовательной хроматографической колонкой и уменьшать производительность колонки в отношении ADAMTS13.

Соответственно предварительное обогащение UF/DF может оптимизировать загрузку для стадий хроматографий впоследствии. В одном варианте осуществления компоненты с низкой молекулярной массой ниже примерно 30 кДа удаляются или, по меньшей мере, их существенная часть. В некоторых вариантах осуществления удалеными (или, по существу, удаленными) низкомолекулярными компонентами являются компоненты ниже приблизительно 60 кДа, ниже приблизительно 55 кДа, ниже приблизительно 50 кДа, ниже приблизительно 45 кДа, ниже приблизительно 40 кДа, ниже приблизительно 35 кДа, ниже приблизительно 30 кДа, ниже приблизительно 25 кДа, ниже приблизительно 20 кДа и т.д.

Стадия предварительного обогащения ультрафильтрацией/диафильтрацией также используется в некоторых вариантах осуществления, чтобы перевести ADAMTS13 в соответствующий буферный раствор для последующей обработки и/или дополнительного концентрирования образца. В одном варианте осуществления соответствующим буферным раствором является буфер с низкой проводимостью, подходящий для предварительного обогащения анионообменной хроматографией, если такая анионообменная

хроматография должна проводиться. Например, буфер с низкой проводимостью будет иметь проводимость, составляющую менее приблизительно 10 мСм/см, например приблизительно от 7 до приблизительно 8 мСм/см, например 7 мСм/см, при комнатной температуре, и может иметь pH, равный или превышающий приблизительно 7,0.

В другом варианте осуществления соответствующим буферным раствором является буфер, подходящий для обогащения хроматографией с использованием гидроксиапатита, за которой может следовать хроматография на смоле со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий. Например, буфер для обогащения может включать 20 мМ Na/K PO₄ и иметь pH, равный приблизительно 7, при комнатной температуре. В другом варианте осуществления соответствующий буферный раствор также включает ионы кальция и/или цинка, любой или оба из которых стабилизируют белок ADAMTS13. В одном варианте осуществления соответствующий буферный раствор включает ионы кальция в концентрациях, составляющих менее приблизительно 10 мМ, например 2 мМ. В другом варианте осуществления соответствующий буферный раствор дополнен ионами цинка в концентрации, составляющей менее приблизительно 50 мкМ, например 5 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления соответствующий буферный раствор включает буферирующий агент, который обладает буферирующей способностью в растворах с pH, равным или превышающим приблизительно 7,0. В одном варианте осуществления буферирующий агент выбирают из группы, состоящей из фосфата, Трис, НЕРС, имидазола, гистидина, MES, цитрата, Gly-Gly, Трис/ацетата и т.д.

Образец, полученный после этой стадии предварительного обогащения UF/DF, может быть использован на последующих стадиях очистки, например, образцом может быть концентрированный с помощью UF/DF пул, включающий белки клеток-хозяев, удаляемые с помощью хроматографии с использованием гидроксиапатита или хроматографии с использованием гидроксиапатита с последующей хроматографией со смолой со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления образец после стадии предварительного обогащения UF/DF концентрируют приблизительно в 10 раз до приблизительно 20 раз, например приблизительно в 15 раз, по сравнению с образцом до стадии предварительного обогащения UF/DF.

(b) Предварительное обогащение анионообменной хроматографией.

Другая необязательная стадия предварительного обогащения включает предварительное обогащение хроматографией, которая может проводиться перед обогащением ADAMTS13 посредством хроматографии с использованием гидроксиапатита или tandemной хроматографии с использованием гидроксиапатита и затем смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий. Специалисту в данной области будет понятно, что предварительное обогащение хроматографией может проводиться после необязательной стадии предварительного обогащения ультрафильтрацией/диафильтрацией. Альтернативно предварительное обогащение хроматографией можно проводить как таковое, т.е. без необязательной стадии предварительного обогащения ультрафильтрацией/диафильтрацией.

В некоторых вариантах осуществления стадия предварительного обогащения хроматографией включает приведение образца, включающего ADAMTS13, хроматографически в контакт с анионообменной смолой и элюирование белка ADAMTS13 из анионообменной смолы. Т.е. ADAMTS13 связывают с анионообменной смолой и впоследствии элюируют из нее. Используемый в данном описании термин "анионообменная смола" относится к любой смоле, подходящей для анионообменной хроматографии и имеющей результирующий положительный заряд, например, из-за положительно заряженной группы (при нейтральном pH). Примеры включают, но без ограничения, диэтиламиноэтан (DEAE), диметилэтаноламин (DMAE), полиэтиленимин (PEI), четвертичный аминоэтан (QAE), trimethylaminoethyl (TMAE), четвертичный аммоний (Q) и т.п. и их комбинации.

В одном варианте осуществления анионообменная смола также обладает одним или несколькими следующими свойствами: большой размер пор, режим перфузионного потока и режим конвективного потока. Неограничивающие примеры коммерчески доступных анионообменных смол, которые могут использоваться на стадии предварительного обогащения, описанной в данном описании, включают Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ), ANX-Sepharose Fast Flow с узким диапазоном разделения (GE Healthcare), DEAE-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), DEAE-Toyopearl (Tosoh Bioscience LLC, Grove City, OH), QAE-Toyopearl (Tosoh Bioscience LLC), POROS® Q (Applied Biosystems, Foster City, CA), POROS® 50D (Applied Biosystems), POROS® 50PI (Applied Biosystems), конвективно взаимодействующие среды (CIM®; BIA Separation), Fractogel-DMAE (Capitol Scientific Inc., Austin, TX), Fractogel EMD-TMAE (Capitol Scientific Inc., Austin, TX), Matrex Cellufine DEAE (Chisso Corp., Rye, NY) и т.п.

Во время предварительного обогащения анионообменной хроматографией ADAMTS13 связывается с анионообменной смолой и отделяется от не являющихся ADAMTS13 примесей (например, компонентов клеток-хозяев, которые могут присутствовать в концентрированном с помощью используемого перед обогащением UF/DF пуле). Как правило, анионообменная смола абсорбирует белок ADAMTS13, в то время как не являющиеся ADAMTS13 примеси с изоэлектрическими точками, превышающими рабочий pH, удаляются из технологической цепи в результате протекания через анионообменную колонку. Не

являющиеся ADAMTS13 примеси с изоэлектрическим точками, которые ниже рабочего pH, связываются сильнее, предпочтительно намного сильнее со смолой, так что они предпочтительно не элюируются вместе с белком ADAMTS13. Перед элюированием колонку, на которой абсорбирован ADAMTS13, затем промывают, например, для удаления слабосвязанных примесей или загрязнений и/или для подгонки проводимости буфера в препарате к элюированию. Как правило, связанный ADAMTS13 элюируют из анионообменной смолы путем увеличения ионной силы буфера. В одном варианте осуществления ADAMTS13 элюируют ступенчатым элюированием. Как правило, вводимый образец и буфер для промывки имеют pH приблизительно от 7 до приблизительно 9, например 7,7, и проводимость приблизительно менее 10 мСм/см (например, 6,5 мСм/см) при комнатной температуре. Буфер(ы) для элюирования может иметь pH, составляющий приблизительно от 6 до приблизительно 9 (например, 7), и иметь проводимость больше приблизительно 10 мСм/см (например, 16,5 мСм/см) при комнатной температуре.

Как правило, элюат выходит со стадии анионообменной хроматографии с активностью, составляющей приблизительно от 60 до приблизительно 120% активности ADAMTS13 (например, составляющей приблизительно от 70 или приблизительно 80% до приблизительно 107% активности ADAMTS13) и/или включает рекомбинантный ADAMTS13 с чистотой, составляющей приблизительно от 20 до приблизительно 70%, (например, с чистотой, составляющей приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60% и т.д.). В одном варианте осуществления анионообменная хроматография уменьшает количество не являющихся ADAMTS13 примесей приблизительно в 2 раза до приблизительно 5 раз. В предпочтительном варианте осуществления процентный выход после подготовки к обогащению может составлять приблизительно 75%.

Концентрацию элюированного ADAMTS13 можно затем повысить, подвергая образец хроматографии с использованием гидроксиапатита, обеспечивающей протекание существенной части белка ADAMTS13, или подвергая образец tandemной хроматографии с использованием гидроксиапатита в условиях, обеспечивающих протекание существенной части белка ADAMTS13, с последующей хроматографией с использованием смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает ADAMTS13, как описано выше.

Инактивация вирусов.

Специалисту в данной области будет понятно, что способы инактивации вирусов могут быть, в частности, полезны при очистке рекомбинантного ADAMTS13 из образцов, которые включают или возможно включают загрязнения вирусами (примеси, являющиеся следствием присутствия и/или происходящие из вируса, включающие, например, вирусные частицы, вирусный белок, вирусную ДНК, вирусную РНК или их фрагменты). Соответственно в одном варианте осуществления описываемый в данном описании способ дополнительно включает по меньшей мере одну стадию инактивации вирусов. Термин "инактивация вирусов" относится либо к ситуации, когда вирусы остаются в растворе, но являются дезактивированными или инактивированными (например, нежизнеспособными, например, в результате растворения липидной оболочки вирусов с липидной оболочкой); или к физическому удалению вирусов и/или загрязнений вирусами из образца (например, с помощью гель-фильтрации), либо к тому и другому. Таким образом, в контексте представленного в данном описании описания "инактивация вирусов" относится либо к вирусной дезактивации или к удалению вирусов, либо к тому и другому.

В случае проведения инактивации вирусов она может иметь место один раз или более чем один раз на протяжении всего процесса очистки. Кроме того, она может иметь место перед или после подвергания образца хроматографии с использованием гидроксиапатита. В некоторых вариантах осуществления инактивация вирусов имеет место перед и после необязательной стадии доочистки с помощью катионообменной хроматографии, описанной более подробно ниже. Однако специалисту в данной области будет понятно, что инактивация вирусов может необязательно иметь место, если вообще проводится, на любой стадии во время процесса очистки. Кроме того, специалист в данной области сможет определить подходящее время для инактивации вирусов.

Способы приведения вирусов с липидными оболочками в нежизнеспособное состояние широко известны в данной области техники. Как правило, способы дезактивации (или инактивации) вирусов с липидными оболочками в образце включают добавление смеси растворитель-дeterгент к образцу (см., например, Edwards, et al. (1987) "Tri(n-butyl) phosphate/detergent treatment of licensed therapeutic and experimental blood derivatives" Vox Sang 52: 53-59 (особенно см. с. 54, 55); и патент США 4540573 (со строки 9 в колонке 7 до строки 42 в колонке 12); 4764369 (со строки 17 в колонке 7 до строки 47 в колонке 12); 4939176 (со строки 59 в колонке 3 до строки 14 в колонке 10); 5151499 (со строки 59 в колонке 2 до строки 38 в колонке 11); 6090599 (со строки 20 в колонке 4 до строки 67 в колонке 8); 6468733 (со строки 12 в колонке 5 до строки 36 в колонке 9) и 6881573 (со строки 63 в колонке 5 до строки 9 в колонке 14), все из которых включены в данное описание посредством ссылки).

Комбинация растворитель-дeterгент, используемая для дезактивации вирусов с липидными оболочками, может быть любой комбинацией растворитель-дeterгент, известной в данной области техники, и предпочтительно включает неионный deterгент и органический растворитель. Неограничивающие примеры включают три-н-бутилфосфат (TnBP) и TRITON X-100™, а также TWEEN 80™ (CAS 9005-65-6), полиоксиэтиленсorbitанмоноолеат, холат натрия и т.п. Концентрации растворителя(ей) и/или deter-

гента(ов) могут быть такими, как обычно используются в данной области техники, например, больше чем приблизительно 0,1% TnBP и больше чем приблизительно 0,1% TRITON X-100™.

В некоторых вариантах осуществления условия, при которых смесь растворитель-дeterгент инактивирует вирусы, включают приблизительно от 10 до приблизительно 100 мг/мл растворителя-дeterгента при уровне pH в диапазоне приблизительно от 5 до приблизительно 8 и температуре в диапазоне приблизительно от 2 до приблизительно 37°C, предпочтительно приблизительно от 12 до приблизительно 25°C в течение приблизительно от 30 мин до приблизительно 24 ч, предпочтительно приблизительно от 30 мин до приблизительно 1 ч. В некоторых вариантах осуществления смесь слегка встряхивают или перемешивают во время обработки. В одном варианте осуществления стадия инактивации вирусов включает добавление смеси растворитель-дeterгент (например, в виде смеси растворитель-дeterгент, включающей 0,3% TnBP, 1% TRITON X-100™ и 0,3% TWEEN 80™) к образцу по меньшей мере на 1 ч при 15-25°C. В другом варианте осуществления образец обрабатывают смесью растворитель-дeterгент, включающей 0,3% TnBP, 1% TRITON X-100™ и 0,3% TWEEN 80™, в течение 30 мин при 12-16°C. Как будет понятно специалисту в данной области техники, могут использоваться другие комбинации растворитель-дeterгент и/или подходящие условия, такие как комбинации полисорбата или холата и три-н-бутилфосфата. В случае таких комбинаций может потребоваться более длительный период времени обработки, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ч или дольше.

Инактивацию можно осуществлять любым способом, известным в данной области техники. Например, инактивацию можно остановить путем разбавления, предпочтительно разбавления холодным буфером для разбавления. Например, в некоторых вариантах осуществления инактивацию останавливают разбавлением одним объемом холодного буфера для разбавления, включающего приблизительно 20 мМ MES и имеющего pH приблизительно 6 при комнатной температуре.

После дезактивации вирусов с липидными оболочками с помощью комбинации растворитель-дeterгент смесь растворитель-дeterгент можно удалить. Например, смесь растворитель-дeterгент можно удалить посредством хроматографии или другого подходящего способа. В некоторых вариантах осуществления используют хроматографию с использованием смолы для удаления растворителя-дeterгента (SDR), такой как, например, смола HyperD™ (Biosepra Inc., MA) (см., например, патент США 6468733 (со строки 12 в колонке 5 до строки 36 в колонке 9), который включен в данное описание во всей его полностью посредством ссылки).

Инактивация загрязнений вирусами при иммобилизации белка.

В некоторых вариантах осуществления инактивация вирусов включает дезактивацию вирусов с помощью смеси растворитель-дeterгент, когда белок иммобилизован. Такая процедура может использоваться при вирусной инактивации для полипептида ADAMTS13, описанного в данном описании, а также других белков. Другие белки могут включать, но без ограничения, любой белок или биологическую молекулу из источника, который может быть загрязнен вирусами, включающего белки иммунной системы (антитела, моноклональные антитела, гибридные белки, слитые с Fc-фрагментом белки, основные антигены гистосовместимости, Т-клеточный рецептор), ферменты (оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы), структурные белки, фибриллярные белки (такие как белки цитоскелета, подобные актину, Агр2/3, коронину, дистрофину, кератину, миозину, спектину, белку Таи, тубулину, и белки экстраклеточного матрикса, подобные коллагену, эластину, F-спондину), глобулярные белки, белки плазмы (сывороточный альбумин и сывороточный амилоидный P), факторы свертывания (подобные белкам комплемента, фактору VIII, фактору XIII, фибрину, белку C, белку S, белку Z, родственному белку Z ингибитора протеазы, тромбину, фактору Виллебранда), С-реактивный белок, гемопротеины, белки клеточной адгезии (кадгерин, эпендимин, интегрин, NCAM, селектин), осуществляющие трансмембранный перенос белки (CFTR, гликофорин D, скрамблазу), ионные каналы (являющийся рецептором ацетилхолина калиевый канал), осуществляющие синпорт/антиторт белки (переносчик глюкозы), гормоны и факторы роста (эпидермальный фактор роста, инсулин, инсулиноподобный фактор роста, окситоцин), рецепторы (трансмембранные рецепторы, сопряженные с G-белком рецепторы, родопсин, внутриклеточные рецепторы, подобные рецептору эстрогена), ДНК-связывающие белки (гистоны), белки для регуляции транскрипции (с-мус FOXP2, FOXР3, MyoD, p53), осуществляющие запас/перенос питательных веществ белки (ферритин), белки теплового шока, макромолекулярные комплексы (нуклеосому, рибонуклеопротеин, частицу распознавания сигнала, спайсому) и т.п. В предпочтительных вариантах осуществления белком является рекомбинантный белок, в частности белки, подверженные агрегации, когда подвергнуты воздействию органических растворителей и дeterгентов. В некоторых вариантах осуществления белком является белок ADAMTS13, в частности рекомбинантный ADAMTS13, или отличный белок (в частности, отличный рекомбинантный белок). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантным белком является фактор свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления белком является, например, один или несколько из следующих белков: фактора VIII, фактора II, тромбина, фактора VIIa, фактора IX, фактора Виллебранда, антител против MIF и, в частности белков, поддающихся хроматографической очистке, и/или белков, чувствительных к обработке смесью растворитель-дeterгент. Соответственно другой аспект настоящего изобретения направлен на инактивацию вирусов, когда белок

иммобилизован. Предпочтительно инактивацию вирусов выполняют совместно с процедурой очистки белка, так что эта процедура включает инактивацию вирусов в препарате белка при иммобилизации белка, подвергаемого очистке.

Общепринятая стадия инактивации вирусов с использованием смеси растворитель-дeterгент, применяемая в последующих способах очистки различных белков, таких как белки, описанные выше, как правило, включает добавление смеси растворитель-дeterгент в растворе к образцу, подвергаемому очистке, например в периодическом способе. В периодическом способе образец, включающий белок, обрабатывают смесью растворитель-дeterгент (например, смесью, включающей приблизительно 1% Triton X-100, приблизительно 0,3% три-н-бутилфосфата и приблизительно 0,3% полисорбата 80) в сосуде с перемешиванием (например, баке для крупномасштабных очисток). После растворения химических веществ растворителя-дeterгента подвергнутый обработке раствор образца можно перекачать во второй сосуд с перемешиванием, в котором в действительности происходит фактическая инактивация вирусов, поскольку здесь инкубируют раствор белка для обеспечения того, чтобы такая дезактивация имела место (например, в течение приблизительно от 30 мин до приблизительно 1 ч).

Напротив, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают инактивацию вирусов в композиции, содержащей белок, например подвергаемый очистке белок, когда белок иммобилизован. Данный способ включает приведение композиции, содержащей представляющей интерес белок, в контакт со смесью растворитель-дeterгент, когда белок иммобилизован, в отличие от целевого белка, находящегося в растворе. В предпочтительных вариантах осуществления белок иммобилизован на хроматографической смоле. Инактивацию вирусов, когда белок иммобилизован на хроматографической смоле, например хроматографической колонке, называют в данном описании инактивацией вирусов "на колонке". Очистка ADAMTS13 на Poros S, описанная в примерах ниже, обеспечивает один вариант осуществления этого способа, когда инактивацию вирусов осуществляют на колонке. Специалисту в данной области техники будет понятно, что белок можно иммобилизовать на различных носителях различными способами. Например, белок можно связать с любым твердым или полутвердым носителем, включая предметное стекло, гранулы, матрицу или мембранны. Иммобилизация может происходить вследствие любого процесса, с помощью которого белок закрепляется на носителе относительно других компонентов раствора белка. Иммобилизация может возникать вследствие образования одного или нескольких типов связей между группами на носителе и группами белка, таких как, например, ковалентная связь, водородные связи, электростатические взаимодействия, силы Ван-дер-Ваальса и т.п. или их комбинации.

Инактивация вирусов при иммобилизации белка на хроматографической колонке может упростить очистку. Например, вместо необходимости использования более одного сосуда (например, системы из двух баков, используемой при крупномасштабных очистках), хроматографическая очистка и инактивация вирусов могут выполняться в одном и том же сосуде, например, на одной и той же хроматографической колонке. Это упрощает последующие процессы очистки белка, например, сокращая время, сберегая реагенты и/или увеличивая эффективность. В некоторых вариантах осуществления хроматографическая колонка содержит катионообменную смолу. В некоторых вариантах осуществления хроматографическая колонка содержит анионообменную смолу.

Дополнительным и неожиданным преимуществом определенных вариантов осуществления инактивации вирусов при иммобилизации белка является уменьшение образования агрегатов. Некоторые белки демонстрируют чувствительность к смесям растворитель-дeterгент, например подверженность образованию агрегатов после приведения в контакт с реагентами растворителем-deterгентом в растворе. Без ограничения конкретной теорией или гипотезой приведение в контакт со смесью растворитель-дeterгент чувствительного белка, когда он иммобилизован, например, когда белок связан с хроматографической смолой, может предотвратить образование агрегатов просто на основе физической неспособности иммобилизованных молекул белка к контакту друг с другом. В некоторых вариантах осуществления инактивация приводит к образованию менее чем приблизительно 20% агрегатов, менее чем приблизительно 18%, менее чем приблизительно 15%, менее чем приблизительно 12%, менее чем приблизительно 10% или менее чем приблизительно 5% агрегатов. И в определенных вариантах осуществления уровень агрегации снижается по меньшей мере приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 50% или приблизительно на 100% уровня агрегации, когда препарат белка подвергают инактивации вирусов, когда белок не иммобилизован.

В одном предпочтительном варианте осуществления белок загружают на хроматографическую смолу, и обработку смесью растворитель-дeterгент используют в виде стадии промывки, предпочтительно стадии промывки, которая длится в течение достаточно долгого периода инкубации, чтобы обеспечить инактивацию вирусов с липидными оболочками. Например, предпочтительно стадия промывки длится в течение приблизительно от 30 мин до приблизительно 1 ч. Смесь растворитель-дeterгент будет включать неионный deterгент и органический растворитель в концентрациях, подходящих для осуществления такой инактивации вирусов, как описано выше. Например, в некоторых вариантах осуществления смесь растворитель-дeterгент включает 1% Triton X-100, 0,3% три-н-бутилфосфата и 0,3% полисорбата 80. Ниже представлены дополнительные подробности в отношении некоторых конкретных вариантов осуществления, что касается очистки ADAMTS13.

Инактивация вирусов может также включать удаление вирусов, например, посредством фильтрации, такой как нанофильтрация с использованием нанофильтра. Такое удаление вирусов может иметь место само по себе или в комбинации с дезактивацией (инактивацией) вирусов, например стадией дезактивации вирусов, включающей обработку смесью растворитель-детергент, как описано выше. Когда инактивация вирусов включает как дезактивацию вирусов, так и удаление вирусов, удаление вирусов может иметь место перед и/или после дезактивации вирусов обработкой смесью растворитель-детергент. Как правило, удаление вирусов из образца включает фильтрацию образца, например пропускание образца через фильтр с размером пор, который удерживает ADAMTS13 в образце, обеспечивая прохождение вирусов и вирусных загрязнений. В одном варианте осуществления размер пор фильтра составляет приблизительно от 15 нм до приблизительно 50 нм. Фильтрацию можно также осуществить нанофильтрацией, используя фильтры 20 N или 35 N (Planova, Asabj Kasei). В некоторых вариантах осуществления используют предфильтры для предотвращения забивания нанофильтра, например можно использовать фильтр приблизительно 2 мкм, или 0,2 мкм PVDF, или PES мембранны.

Доочистка с помощью катионообменной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает после хроматографии с использованием гидроксиапатита (или tandemной хроматографии с использованием гидроксиапатита и затем смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий) необязательную стадию доочистки образца, включающую ADAMT13, с помощью хроматографии на катионообменной смоле. На этой стадии перед доочисткой можно снизить, в случае необходимости, проводимость буфера, включающего ADAMTS13, для достижения проводимости, подходящей для катионообменной хроматографии.

(a) Снижение проводимости буфера.

После хроматографии с использованием гидроксиапатита или tandemной хроматографии с использованием гидроксиапатита и затем смолы со смешанным принципом работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий буфер, включающий белок ADAMTS13, можно подготовить к катионообмену путем снижения проводимости буфера, например удалением ионных компонентов (например, хлорида натрия). В некоторых вариантах осуществления проводимость буфера снижают менее чем приблизительно до 5 мСм/см и/или pH снижают приблизительно до 6,0. Проводимость буфера можно снизить с помощью любого способа, который известен в данной области техники, описан в данном описании или может оценить специалист в данной области техники, особенно с учетом приведенных в данном описании сообщений. Неограничивающие примеры включают ультрафильтрацию/диафильтрацию (например, с использованием кассет с поперечным потоком или модулей из полых волокон), гельфильтрацию, диализ и т.д.

В одном варианте осуществления белок ADAMTS13 подготавливают к катионообмену посредством ультрафильтрации/диафильтрации с использованием мембранны с отсечкой, составляющей приблизительно 10 кДа, в обмен на буфер для уравновешивания катионообменной смолы (например, буфер, включающий 20 мМ MES, pH 6,0 при комнатной температуре). В некоторых вариантах осуществления мембранный для ультрафильтрации/диафильтрации является PES мембрана с отсечкой, составляющей приблизительно от 10 кДа до приблизительно 50 кДа, например приблизительно 20 кДа, приблизительно 30 кДа, приблизительно 40 кДа и т.д. Используя такой подход, pH буфера можно снизить приблизительно с 8,0 до приблизительно 6,0 и/или проводимость буфера можно снизить меньше чем приблизительно до 2 мСм/см при комнатной температуре. В некоторых таких вариантах осуществления буфер для диафильтрации может включать 20 мМ MES и может иметь pH, равный 6,0 при комнатной температуре, и/или проводимость, составляющую 0,6 мСм/см при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления проводимость буфера для диафильтрации может быть равной или, по существу, равной проводимости используемого буфера для уравновешивания катионообменной смолы.

В одном варианте осуществления подготовку буфера, включающего ADAMTS13, к катионообмену проводят посредством диализа, например, используя оборудование для диализатора, включающее модули для гемодиализа, такие как модуль для гемодиализа из полых волокон (серии Aquapax, PES химия полых волокон, Edwards Lifesciences, Unterschleißheim, Германия). Как правило, для приблизительно 5 л образца используют фильтр с площадью, составляющей приблизительно 2 м²; и буфер образца и буфер для диализа проходят в противотоке относительно друг друга. В некоторых вариантах осуществления диализ состоит не более чем из двух прохождений через один модуль для диализа. Под "одним модулем для диализа" подразумевают один элемент или структуру, через который осуществляется диализ. Модуль для диализа обычно включает пакет с открытыми концами из мембранны с полыми волокнами, помещаемый в корпус в виде трубки для создания двух различных проточных камер, полостной и экстракапиллярной, каждая с доступом для входа и выхода. Полупроницаемая мембрана с полыми волокнами разделяет две камеры и дает возможность избирательного прохождения на основе размера и градиента концентрации растворенных веществ, ограничивая при этом прохождение других растворенных веществ между 2 камерами. При работе модуля в противоточном режиме растворенные вещества, проходящие через мембранны, быстро смываются и растворяются в большом объеме раствора диализата ("смыв"), поддерживая наибольший из возможных градиент концентрации. Соответственно диализ может быть прове-

ден в один смыв при прохождении через один модуль для диализа.

В некоторых вариантах осуществления используют комбинацию этих подходов, например UF/DF с диализом можно использовать для концентрирования образца и буферного обмена в препарате для доочистки катионообменной хроматографии. В еще одних вариантах осуществления буферный обмен можно проводить с помощью анионообменной хроматографии.

(b) Катионообменная хроматография.

Как указано выше, описываемый в данном описании способ может необязательно включать доочистку образца с помощью хроматографии на катионообменной смоле. Используемый в данном описании термин "катионообменная смола" относится к любой смоле, которая подходит для катионообменной хроматографии и которая имеет результирующий отрицательный заряд, например, из-за присутствия отрицательно заряженной группы (при нейтральном pH). Примеры включают, но без ограничения, карбоксильную группу, карбоксиметильную (CM) группу, сульфоалкильную группу (SP, SE), метилсульфонатную (S) группу, сульфатированный эфир целлюлозы, гепарин и т.п. и их комбинации. Эта стадия, как правило, предназначена для концентрирования продукта ADAMTS13, включения продукта в буфер для предварительного составления и дальнейшего уменьшения количества не являющихся ADAMTS13 примесей, включая связанные с процессом примеси (например, белков клеток-хозяев, таких как белки клеток СНО, ДНК клеток-хозяев, такой как ДНК клеток СНО, реагентов смеси растворитель-детергент и т.д.), а также связанные с продуктом примеси (например, агрегатов и не являющихся биологически активными фрагментов ADAMTS13).

В одном варианте осуществления катионообменная смола также обладает одним или несколькими следующими свойствами: большой размер пор, режим перфузионного потока и режим конвективного потока. Неограничивающие примеры коммерчески доступных катионообменных смол, которые могут использоваться на описываемой в данном описании стадии доочистки, включают POROS® S (Applied Biosystems), среды для взаимодействий с режимом конвективного потока (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), Macroprep CM ((Bio-rad, Hercules, CA), Fractogel EMD SO₃ (Merck), Fractogel EMD COO (Merck), Fractogel EMD SE Hicap (Merck), Cellufine Sulfate (Chisso), CM и SP Trisacryl (Pall), CM и S HyperD (Pall), Mustang S (Pall), S и CM Sepharose CL (GE Healthcare), S и CM Sepharose FF (GE Healthcare), S и CM CAP-TO™ (GE Healthcare), MonoS (GE Healthcare), Source S (GE Healthcare) и т.п.

Хроматография на катионообменной смоле является известным в данной области техники способом. В некоторых вариантах осуществления максимальная загрузка на катионообменную колонку составляет приблизительно от 0,2 до приблизительно 0,5 мг ADAMTS13/мл. В предпочтительном варианте осуществления в колонку вводят по меньшей мере 0,3 мг ADAMTS13/мл. Как правило, во время хроматографии на катионообменной смоле ADAMTS13 связывается с катионообменной смолой, и буферу и определенным примесям обеспечивается протекание. Колонку, на которой абсорбирован ADAMTS13, затем промывают, например, для удаления слабосвязанных загрязнений или примесей и/или для доведения буфера в препарате для элюирования ADAMTS13 из катионообменной смолы. Затем ADAMTS13 можно подвергнуть элюированию в элюате.

В некоторых вариантах осуществления элюат, полученный на стадии катионообменной хроматографии, содержит большее количество агрегатов ADAMTS13, чем желательно. В некоторых вариантах осуществления, например, элюат включает более чем приблизительно 15% агрегатов, которые, как полагают, привносятся после стадии концентрирования и буферного обмена с использованием диализатора и/или стадии катионообменной хроматографии.

Для обеспечения получения ADAMTS13, по существу, с пониженным процентным содержанием агрегатов при использовании катионообменной смолы можно использовать определенные условия, детализированные ниже на фиг. 2 в отношении катионообменной смолы Poros S. Например, в некоторых вариантах осуществления используют комбинацию, включающую очистку катионообменной хроматографии с последующей инактивацией вирусов смесью растворитель-детергент на колонке, например, как описано более подробно выше. Эта комбинация предпочтительно приводит к уменьшенному количеству агрегатов, возникающих при использовании полипептида ADAMTS13, в элюате. В более предпочтительных вариантах осуществления процедура элюирования включает градиентное элюирование (но не ступенчатое элюирование), которое может дополнительно удалить агрегаты ADAMTS13, например, в нисходящей части пика элюирования. Даже в более предпочтительных вариантах осуществления концентрация Tween 80 в буфере для элюирования больше чем приблизительно 0,05%, например составляет приблизительно 0,06%, приблизительно 0,07%, приблизительно 0,08%, приблизительно 0,09%, предпочтительно приблизительно 0,1%, приблизительно 0,11%, приблизительно 0,12%, приблизительно 0,13%, приблизительно 0,14% или приблизительно 0,15%. Полагают, что повышенная концентрация оказывает дополнительный стабилизирующий эффект на ADAMTS13, дополнительно предотвращая образование высокомолекулярных структур во время элюирования ADAMTS13 из смолы. Под "стабилизацией белка ADAMTS13" или "стабилизирующим эффектом на ADAMTS13" подразумевают стремление поддержи-

вать природную структуру ADAMTS13, особенно в интактной и/или мономерной форме или, по существу, интактной и/или мономерной форме, отличной от фрагментированной или агрегированной формы. Стабилизация может также относиться к стремлению полученного ADAMTS13 не поддаваться фрагментации, утрате природной структуры и/или агрегации, несмотря на иные дестабилизирующие условия, такие как изменяющиеся температуры, изменяющиеся pH, ионные силы и т.п.

Белок ADAMTS13 также может быть стабилизирован используемой во время сбора матрицей, например, когда инактивацию вирусов обработкой смесью растворитель-дeterгент проводят на концентрированном сборе. Кроме того, агрегаты, которые действительно образуются, можно удалить на последующих стадиях очистки, таких как ввод в анионообменную хроматографическую колонку (такую как ANX Sepharose, описанную в данном описании); и/или доочистка с помощью хроматографии (такой как tandemная хроматография с использованием гидроксиапатита/Capto MMC, описанная в данном описании).

Использование одной или нескольких модификаций, описанных выше, может привести к элюату, включающему меньшее количество агрегатов полипептида ADAMTS13. Например, в предпочтительных вариантах осуществления элюат из катионообменной колонки может включать менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 18%, менее чем приблизительно 15%, менее чем приблизительно 12%, менее чем приблизительно 10% или менее чем приблизительно 5% агрегатов.

Конечная стадия при хроматографии на катионообменной смоле включает элюирование белка ADAMTS13 с помощью буфера для элюирования. В некоторых вариантах осуществления связанный ADAMTS13 элюируют из катионообменной смолы путем увеличения ионной силы буфера. Включающий ADAMTS13 буфер, используемый для приведения в хроматографический контакт с катионообменной смолой, обычно имеет проводимость, составляющую менее чем приблизительно 10 мСм/см при комнатной температуре, например менее чем 5 мСм/см. Кроме того, включающий ADAMTS13 буфер, используемый для приведения в хроматографический контакт с катионообменной смолой, обычно имеет pH ниже чем приблизительно 7,0 при комнатной температуре, например равен 6,0. Буфер, используемый для элюирования белка ADAMTS13 из катионообменной смолы, может обладать ионной силой, которая ниже ионной силы таких буферов. Смолу можно также промыть буфером, имеющим pH, равный или, по существу, равный pH буфера, предназначенного для хранения.

В предпочтительном варианте осуществления белок ADAMTS13 элюируют из катионообменной смолы с помощью буфера для хранения. Как правило, под буфером для хранения подразумевают буфер, имеющий pH приблизительно от 5 до приблизительно 9 при комнатной температуре и включающий кальций, буферирующее соединение и соль. pH буфера для хранения может быть выше приблизительно 7,0 (например, равняться приблизительно 7,5) при комнатной температуре. Буфер для хранения может включать менее чем приблизительно 10 mM Ca^+ (например, 2 mM Ca^+); буферирующее соединение может быть выбрано из группы, состоящей из фосфата, Трис, НЕPES, гистидина, имидазола, Gly-Gly, MES, трицина, ацетата и т.п.; и соль может быть выбрана из группы, состоящей из NaCl , KCl , CaCl_2 , MgCl_2 и т.п. В предпочтительном варианте осуществления буфер для хранения имеет pH выше чем 7,0 и включает менее чем 10 mM ионов кальция, буферирующее соединение и соль. В более предпочтительном варианте осуществления буфер для хранения дополнительно включает неионный детергент, например, приблизительно от 0,01 до приблизительно 0,5% неионного детергента, например, 0,05% неионного детергента. В даже более предпочтительных вариантах осуществления элюат не подвергают ни последующему концентрированию, ни стадии буферного обмена после элюирования из катионообменной смолы буфером для хранения.

В одном конкретном варианте осуществления в качестве катионообменной смолы на стадии доочистки используют Source S (GE healthcare), например колонку Source S с высотой слоя, составляющей приблизительно 20 см. В таких вариантах осуществления колонку можно активировать приблизительно 2 объемами колонки приблизительно 2 M NaCl и уравновесить приблизительно 6 объемами колонки буфера, включающего приблизительно 20 mM MES, приблизительно 10 mM NaCl и приблизительно 2 mM CaCl_2 , с pH, равным приблизительно 6 при комнатной температуре. Включающий ADAMTS13 буфер можно привести в контакт с колонкой при проводимости, которая ниже приблизительно 5 мСм/см при комнатной температуре, и впоследствии колонку промывают буфером для уравновешивания, и, наконец, собирают элюат, включающий белок ADAMTS13. После сбора элюат может быть концентрирован и обменять буфер в буфер для хранения, например, с помощью анионообменной хроматографии, диафильтрации, ультрафильтрации, диализа и т.п.

В другом конкретном варианте осуществления в качестве катионообменной смолы при доочистке образца, включающего белок ADAMTS13, используют POROS® S. В этом варианте осуществления включающий ADAMTS13 буфер, используемый для приведения в хроматографический контакт с катионообменной смолой, может иметь проводимость, составляющую менее чем приблизительно 5 мСм/см, и pH приблизительно от 6,1 до приблизительно 6,4. ADAMTS13 можно элюировать, используя градиентное элюирование, хотя ступенчатое элюирование может предпочтительно обеспечить более концентрированный продукт. В случае проведения градиентного элюирования можно использовать два буфера, например первый буфер, который имеет низкое содержание соли (например, от незначительного содерж-

жания соли до ее отсутствия), и второй буфер, который имеет более высокое содержание соли (например, приблизительно 500 мМ), так что пул элюата может иметь концентрацию соли, составляющую приблизительно 200 мМ. В случае проведения ступенчатого элюирования буфер для элюирования может включать буфер для хранения, например буфер для хранения, содержащий приблизительно 300 мМ NaCl, приблизительно 2 мМ CaCl₂, приблизительно 20 мМ гистидин, приблизительно 0,05% Tween 80, и может иметь pH приблизительно 7,5 при комнатной температуре. В некоторых таких вариантах осуществления обмена буфера не требуется после стадии с использованием POROS® S, т.е. включающие ADAMTS13 фракции, полученные из POROS® S, уже находятся в буфере и в концентрациях, подходящих для хранения. В еще одних вариантах осуществления включающие ADAMTS13 фракции, полученные из колонки POROS® S, могут быть подвергнуты дополнительным стадиям концентрирования и/или буферного обмена.

Как правило, очистка рекомбинантного белка ADAMTS13 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления способов, описанных в данном описании, приводит к композициям из чистого белка ADAMTS13. В одном варианте осуществления очистка рекомбинантного белка ADAMTS13 в соответствии с описанным способом дает белок ADAMTS13, чистота которого составляет по меньшей мере приблизительно 90%, например по меньшей мере приблизительно 95%, например по меньшей мере приблизительно 98% или, например, по меньшей мере приблизительно 99%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описанного в данном описании способа могут быть достигнуты выходы, составляющие по меньшей мере приблизительно 20%. В одном варианте осуществления способ обес печивает выходы, составляющие по меньшей мере приблизительно 5%, например, приблизительно 30%, например, приблизительно 10%, например, приблизительно 20%, например, приблизительно 40%, например, приблизительно 50%, например, приблизительно 60%, например, приблизительно 70%, например, приблизительно 80%, например, приблизительно 90% или, например, приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления способ обес печивает белок ADAMTS13 со специфической активностью в диапазоне приблизительно от 500 ед./мг ADAMTS13 до приблизительно 1000 ед./мг ADAMTS13. В другом варианте осуществления способ обес печивает белок ADAMTS13 со специфической активностью в диапазоне приблизительно от 1200 ед./мг белка ADAMTS13 при длине УФ 280 нм до приблизительно 2400 ед./мг белка ADAMTS13 при длине УФ 280 нм. В другом варианте осуществления, в котором рекомбинантный белок ADAMTS13 продуцируют клетки CHO, трансформированные нуклеиновой кислотой рекомбинантного ADAMTS13, очистка рекомбинантного ADAMTS13 в соответствии с описанным способом приводит к композиции, которая содержит менее чем приблизительно 1000 ч./млн имеющих отношение к клеткам-хозяевам примесей. В некоторых вариантах осуществления способ обес печивает по меньшей мере приблизительно 2 мг/мл белка ADAMTS13 в буфере для хранения.

Композиции, содержащие рекомбинантный белок ADAMTS13.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает композиции, содержащие рекомбинантный ADAMTS13, очищенный согласно описанному в данном описании способу. Описываемые в данном описании композиции могут быть пригодны для хранения очищенного рекомбинантного ADAMTS13. Например, в некоторых вариантах осуществления очищенный белок ADAMTS13 хранят в замороженном виде, например, при температуре ниже приблизительно -60°C. Описываемые в данном описании композиции также могут быть пригодны для терапевтического введения белка ADAMTS13 и/или для получения композиций для терапевтического введения, в частности парентерального введения. Например, в некоторых вариантах осуществления очищенный ADAMTS13, полученный согласно описанным в данном описании способом, находится в форме нерасфасованного лекарственного вещества (BDS), т.е. в форме, готовой к составлению композиций для терапевтического введения.

Соответственно другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям, в которых очищенный рекомбинантный белок ADAMTS13 смешан с эксципиентами или другими фармацевтически приемлемыми носителями. В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель является фармацевтически инертным. Фармацевтически инертным носителем является носитель, который не вступает в реакцию или, по существу, не вступает в реакцию с активным фармацевтическим веществом и/или, в частности, не наносит ущерб или, по существу, не наносит ущерб желаемым фармацевтическим свойствам активного ингредиента.

Фармацевтические композиции могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, например путем обычного смешивания, растворения, гранулирования, получения драже, расстирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, включения, лиофилизации и т.п.

В зависимости от подвергаемого лечению заболевания эти фармацевтические композиции можно составить и вводить системно или местно. Методы составления и введения можно найти в последнем издании "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Подходящие пути могут, например, включать пероральное или чресслизистое введение; а также парентеральную доставку, включающую внутримышечное введение, подкожное введение, костномозговое введение, подоболочечное введение, внутрижелудочковое введение, внутривенное введение, внутрибрюшинное введение, интраназальное введение и т.п.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают композиции, содержащие ADAMTS13 в качестве активного ингредиента в количестве, эффективном для достижения намеченной цели. Как используется в данном описании, "эффективное количество" ADAMTS13 может относиться к такому количеству, которое усиливает, увеличивает, улучшает или вызывает биологический эффект природного ADAMTS13.

Биологические эффекты природного ADAMTS13 включают vWF-расщепляющую протеазную активность, основанную на эффекте ADAMTS13 через расщепление фактора Виллебранда, крупного белка, вовлеченного в свертывание крови. "Эффективное количество" будет включать количество ADAMTS13, которое вызывает снижение уровня агрегации тромбоцитов, например снижение уровня у индивидуума, страдающего нарушением свертывания крови, до уровня, который в большей степени сопоставим с уровнем у индивидуума, не страдающего нарушением свертывания крови. Нарушения свертывания крови включают, но без ограничения, тромботическую тромбоцитопеническую пурпур (TTP), также известную как синдром Мошковича, синдром Аппо-Шульмана (наследственная форма TTP) и удар. "Эффективное количество" также включает количество, необходимое для достижения профилактического и/или терапевтического эффекта при лечении одного или более нарушений свертывания крови и связанных состояний. Определение определенных эффективных количеств полностью находится в компетенции специалистов в данной области техники.

Настоящее изобретение предоставляет способы, фармацевтические композиции и наборы для лечения и/или предупреждения нарушений свертывания крови и связанных состояний у являющихся животными субъектами. Используемый в данном описании термин "являющийся животным субъект" включает людей, а также других млекопитающих.

Используемый в данном описании термин "лечение и/или предупреждение" включает достижение терапевтического эффекта и/или профилактического эффекта соответственно. Под терапевтическим эффектом подразумевается реверсия или ослабление лежащего в основе нарушения свертывания крови, подвергаемые лечению. Например, у пациента с TTP терапевтический эффект включает ликвидацию или ослабление одного или более состояний и/или симптомов, связанных с TTP, так что у пациента отмечается улучшение, несмотря на тот факт, что пациент может все еще страдать лежащим в основе нарушением. Например, лечение может обеспечить терапевтический эффект не только, когда уменьшается или исключается образование тромбов, но также, когда у пациента отмечается ослабление симптомов, сопровождающих TTP, такое как уменьшение головных болей, ослабление лихорадки и/или отсрочка почечной недостаточности.

Для профилактического эффекта фармацевтическую композицию настоящего изобретения можно вводить пациенту, подверженному риску развития нарушения свертывания крови, в том числе, например, пациенту, сообщающему об одном или нескольких симптомах или состояниях, обычно ассоциируемых с нарушениями свертывания крови, подобно TTP, даже несмотря на то, что диагноз может быть еще не поставлен.

Помимо активного ингредиента фармацевтические композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые носители, такие как эксципиенты и вспомогательные вещества, которые способствуют переработке активных соединений в препараты, которые могут быть использованы фармацевтически.

Фармацевтические композиции для парентерального введения, как правило, включают водные растворы активного ингредиента в водорастворимой форме. В некоторых вариантах осуществления могут быть приготовлены суспензии активного ингредиента, как например, подходящие масляные суспензии для инъекции. Подходящие липофильные растворители или носители включают масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Водные суспензии для инъекции могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстроза.

Необязательно суспензия также может содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые увеличивают растворимость активного ингредиента, например, для обеспечения приготовления в высокой степени концентрированных растворов.

Для инъекции, фармацевтические композиции настоящего изобретения можно составить в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Ханка, раствор Рингера или забуференный физиологический солевой раствор. В случае тканевого или клеточного введения в композиции используют пенетранты, подходящие для прохождения сквозь конкретный барьер. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники.

Фармацевтические препараты для перорального введения можно получить путем объединения активного ингредиента с твердым эксципиентом, необязательно измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул, после добавления подходящих вспомогательных веществ, если желательно, для получения таблеток или сердцевин драже. Подходящие эксципиенты включают являющиеся углеводами или белками эксципиенты, такие как сахара, включающие лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; кукурузный, пшеничный, рисовый, картофельный крахмал и т.д.; целлюлозу, такую как метилцеллюлоза, гидрокси-пропилметилцеллюлоза или натрийкарбоксиметилцеллюлоза; камеди, включая аравийскую камедь и

трагакант; и белки, такие как желатин и коллаген. Если желательно, можно добавить дезинтегрирующие агенты или солюбилизаторы, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или их соль, такая как альгинат натрия. Носители также могут быть использованы для обеспечения составления фармацевтических композиций в виде таблеток, пилоль, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, суспензий, растворов, суспензий, драже и т.п. для перорального и/или интраназального введения подвергаемым лечению пациентам.

Фармацевтические препараты, которые могут применяться перорально, включают твердые капсулы, изготовленные из желатина, а также мягкие, герметизированные капсулы, составленные из желатина и покрытия, такого как глицерин или сорбит. Твердые капсулы могут содержать активный ингредиент, смешанный с наполнителями или связующими веществами, такими как лактоза или крахмалы; лубрикантами, такими как тальк или магния стеарат; и необязательно стабилизаторами. В мягких капсулах активные соединения могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как масла, жидкий парафин или жидкий полиэтиленгликоль, вместе со стабилизаторами или без них.

Композиции, включающие ADAMTS13 или другой белок, полученный согласно описанному в данном описании способу, могут быть составлены с использованием фармацевтически приемлемого носителя, помещены в соответствующий контейнер (или набор), и к ним может быть прикреплена этикетка для описания лечения указанного состояния.

Примеры

Следующие примеры предоставлены с иллюстративной целью и, как предполагается, не ограничивают объем настоящего изобретения.

Пример 1.

На фиг. 1 представлен приводимый в качестве примера способ очистки белка ADAMTS13 согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным в данном описании. В представленном примере рекомбинантный белок ADAMTS13 очищают из супернатанта, собранного из культивирующих СНО клеток, включающих нуклеотидную последовательность рекомбинантного ADAMTS13. В данном примере образцом является супернатант культуры клеток, включающий приблизительно 2 ед./мл (приблизительно 2 мкг/мл) белка ADAMTS13.

Как показано на фиг. 1, образец, включающий ADAMTS13 и не являющиеся ADAMTS13 примеси, сначала подвергают необязательной подготовке к обогащению: (а) как показано на стадии 101, образец может быть концентрирован ультрафильтрацией (приблизительно в 10 раз до приблизительно 20 раз) и подвергнут буферному обмену посредством диафильтрации (с отсечкой по молекулярной массе, составляющей приблизительно 30 кДа); и (б) как показано на стадии 102, белок ADAMTS13 можно связать с анионообменной смолой и элюировать из нее перед дальнейшим обогащением.

Подготовка образца к обогащению.

(а) Предварительное обогащение ультрафильтрацией/диафильтрацией (UF/DF).

Как показано на фиг. 1, стадии 101, для оптимизации загрузки в случае предварительного обогащения анионообменной хроматографией супернатант культуры клеток концентрируют приблизительно в 10 раз до приблизительно 20 раз и подвергают диафильтрации, используя PES мембрану (с отсечкой, составляющей приблизительно от 30 кДа до приблизительно 50 кДа; Pall Omega) против буфера с низкой проводимостью, содержащего ионы кальция и цинка, которые, как считается, стабилизируют ADAMTS13. Буфером для диафильтрации супернатанта культуры клеток является 20 мМ Трис, 0,1% полисорбата 80, 85 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 5 мкМ ZnCl₂, с pH, равным 7,7 при комнатной температуре.

(б) Предварительное обогащение анионообменной хроматографией.

Как показано на фиг. 1, стадия 102, предварительное обогащение анионообменной хроматографией можно выполнить, используя ANX Sepharose Fast Flow с узким диапазоном разделения от GE Healthcare. Эта анионообменная смола может быть использована согласно следующим условиями (табл. 1, 2).

Загрузка на колонку: максимум 0,5 мг ADAMTS13 Аг/мл смолы; высота слоя: 20 см

Таблица 1

| Стадия | Буфер | Объем колонки (CV) | Скорость потока (см/ч) |
|--------------------------|---|--------------------|------------------------|
| Активация колонки | Буфер с высокой концентрацией соли для ANX | 2 | 100 |
| Уравновешивание | Буфер для уравновешивания ANX | 6 | 100 |
| Загрузка | Концентрированный и подвергнутый диафильтрации супернатант культуры клеток | | |
| Промывка 1 | Буфер для промывки 1 ANX | 2,5 | 100 |
| Промывка 2 | 12,5% буфера В для элюирования с ANX/87,5% буфера А для элюирования из ANX | 3 | 100 |
| Градиент для элюирования | 12,5% буфера В для элюирования из ANX/87,5% буфера А для элюирования из ANX до 100% буфера В для элюирования из ANX | 11 | 100 |
| После элюирования | Буфер с высокой концентрацией соли для ANX | 3 | 100 |

Альтернативно на стадии элюирования можно использовать 2,8 объемов колонки буфера, включающего 48% буфера В для элюирования из ANX и 52% буфера А для элюирования из ANX, как детализировано в табл. 2. Также указаны другие потенциально подходящие буфера.

Таблица 2

| Буфер | Состав |
|--|--|
| Буфер для уравновешивания ANX | 20 mM Трис, 0,1% полисорбата 80, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 5 мкM ZnCl ₂ , pH=7,7 (при комнатной температуре) |
| Буфер для промывки 1 ANX | 20 mM Трис, 0,1% полисорбата 80, 50 mM NaCl, pH=7,7 (при комнатной температуре) |
| Буфер А для элюирования из ANX | 20 mM Na/K PO ₄ , pH=7,0 (при комнатной температуре) |
| Буфер В для элюирования из ANX | 20 mM Na/K PO ₄ , 400 mM NaCl, pH=7,0 (при комнатной температуре) |
| Буфер с высокой концентрацией соли для ANX | 2M NaCl |

Можно использовать смолы, отличные от той, которая указана на фиг. 1, стадия 102. Можно использовать, например, POROS 50D и POROS 50PI от Applied Biosystems, Foster City, CA. Элюат из этой смолы для предварительного обогащения анионообменной хроматографией может обеспечить рекомбинантный ADAMTS13 с чистотой, составляющей приблизительно от 20 до приблизительно 70%, и процентный выход после этой стадии подготовки образца к обогащению может составить по меньшей мере приблизительно 75%.

Обогащение ADAMTS13.

Как показано на фиг. 1, стадии 103 и 104 соответственно, ADAMTS13 можно затем подвергнуть обогащению через посредство стадий (а) и (б) доочистки. Включающий ADAMTS13 образец подвергают тандемной хроматографии, сначала с использованием гидроксиапатита на колонке Hydroxyapatite Type II (Biorad, Hercules, CA), стадия 103, с последующей хроматографией на смоле смешанного принципа работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий CAPTO™ MMC (GE Healthcare), стадия 104. Более конкретно, пул элюата со стадии предварительного обогащения анионообменной хроматографией разбавляют в соотношении 1:4 буфером для разжижения гидроксиапатита для снижения проводимости приблизительно до 6 мСм/см. Разбавленный пул элюата подвергают тандемной хроматографии с использованием гидроксиапатита в условиях, обеспечивающих протекание существенной части белка ADAMTS13, стадия 103, и затем смолы смешанного принципа работы на основе катионообмена/гидрофобных взаимодействий, которая связывает белок ADAMTS13, стадия 104. Условия для тандемной хроматографии представлены ниже в табл. 3 и 4.

Колонка 1: смола: гидроксиапатит типа II (Biorad) (HA); загрузка: максимум 2 мг общего белка/мл смолы; высота слоя: 20-30 см.

Колонка 2: смола: Capto MMC (GE Healthcare); загрузка: 3-6 мг ADAMTS13/мл смолы; высота слоя: 10 см.

Отношение объема колонки HA:MMC=10:1.

Таблица 3

| Стадия | Буфер | Объем колонки (CV) | Скорость потока (см/ч) |
|---------------------------|---|--------------------|------------------------|
| Активация (MMC) | Буфер для элюирования из MMC | 3 (MMC) | 50 (MMC) |
| Уравновешивание | Буфер для уравновешивания HA | 4 (HA) | 50 (HA) |
| Уравновешивание | Буфер для уравновешивания HA | 1 (HA) | 50 (HA) |
| Загрузка | Разбавленный элюат из смолы для захвата (разбавленный 1:5 буфером для уравновешивания НЕ) до <6 мСм/см проводимости | 20-30 л | 30 (HA) |
| Повторное уравновешивание | Буфер для уравновешивания HA | 0,5 (HA) | 30 (HA) |
| Промывка 1 (MMC) | Буфер для уравновешивания MMC | 3 (MMC) | 50 (MMC) |
| Промывка 2 (MMC) | Буфер для промывки MMC | 4 (MMC) | 50 (MMC) |
| Элюирование (MMC) | 75% буфера для элюирования из MMC/25% буфера для промывки MMC | 4 (MMC) | 50 (MMC) |

Таблица 4

| Буфер | Состав | Проводимость |
|---|---|--|
| Буфер для разжигания НЕ | 20 мМ Na/K PO ₄ , pH = 7,0 (при комнатной температуре) | |
| Буфер для уравновешивания колонок, используемых при tandemной хроматографии | 20 мМ Na/K PO ₄ , 25 мМ NaCl, pH=7,0 (при комнатной температуре) | Приблизительно 5,5 мСм/см (при комнатной температуре) |
| Буфер для промывки MMC | 50 мМ Na/K PO ₄ , 160 мМ NaCl, pH=8,0 (при комнатной температуре) | Приблизительно 16,5 мСм/см (при комнатной температуре) |
| Буфер для элюирования из MMC | 50 мМ Na/K PO ₄ , 1000 мМ NaCl, pH=8,0 (при комнатной температуре) | Приблизительно 93 мСм/см (при комнатной температуре) |
| Буфер для элюирования из НЕ | 300 мМ Na/K PO ₄ , pH=7,0 (при комнатной температуре) | Приблизительно 33 мСм/см (при комнатной температуре) |

Процентный выход ADAMTS13 после обогащения tandemной хроматографией может составлять по меньшей мере 60%.

Инактивация вирусов.

Как показано на фиг. 1, стадия 105, образец можно подвергнуть обработке смесью растворитель-детергент для инактивации загрязняющих вирусов или вирусных частиц; и/или образец фильтруют для удаления таких вирусов или вирусных частиц. Также как показано на фиг. 1, стадию 105 инактивации вирусов можно выполнить в различных местах способа, например, перед стадиями 103 и 104 tandemной хроматографии, или после стадии, которая включает концентрирование и буферный обмен, стадия 106, как описано ниже.

Для инактивации вирусов обработкой смесью растворитель-детергент образец обрабатывают смесью растворитель-детергент, включающей 1% TRITON X-100®, 0,3% три-н-бутилфосфата и 0,3% полисорбата 80, в течение 30 мин приблизительно от 12°C до приблизительно 16°C (в частности, для инактивации вирусов с липидными оболочками). Дополнительные детали представлены ниже в примере 2.

Альтернативно или дополнительно образец подвергают фильтрации, например нанофильтрации, через фильтр для удаления частиц размером 0,2 мкм. Например, смесь после обработки растворителем-детергентом разбавляют 1 объемом буфера для уравновешивания, используемого для доочистки, описанного ниже, и фильтруют через 0,2 мкм PVDF или PES мембранны. Фильтрацию можно проводить перед и/или после обработки смесью растворитель-детергент. Фильтрация после данной обработки может быть использована для удаления твердых частиц, которые могли образоваться во время такой обработки. Фильтрация также может быть осуществлена нанофильтрацией с использованием 20 N фильтра (Planova, Asahi Kasei), что также показано на фиг. 1, когда стадию 105 инактивации вирусов проводят перед стадиями 103 и 104 tandemной хроматографии. Дополнительная стадия 105 инактивации вирусов может быть осуществлена после того, как образец был дочищен с помощью катионообменной хроматографии, как описано ниже.

Процентный выход ADAMTS13 в результате инактивации вирусов может составлять по меньшей мере 95%.

Доочистка с помощью катионообменной хроматографии.

После обогащения ADAMTS13 может быть дочищен с помощью хроматографии на катионообменной смоле, и перед доочисткой можно снизить проводимость включающего ADAMTS13 буфера для получения соответствующей проводимости для катионообменной хроматографии. Соответственно стадии после обогащения могут включать (a) снижение проводимости буфера с последующей (b) катионообменной хроматографией.

(a) Снижение проводимости буфера.

Как показано на фиг. 1, стадия 106, подготовка к катионообменной хроматографии может включать концентрирование и буферный обмен с использованием UF/DF с составляющей 10 кДа отсечкой и оборудования для диализатора. В иллюстративном варианте осуществления оборудования для диализатора, используемое для буферного обмена, включает модуль для гемодиализа с полыми волокнами (серия Aquamax, PES химия полых волокон, Edwards Lifesciences, Unterschleißheim, Германия), имеющий площадь фильтра, составляющую 0,3-0,9 м². В ходе оперативного режима контролируют следующие параметры: давление (до модуля, после модуля и трансмембранные давление), проводимость и температуру. Картридж диализатора соединяют двумя насосами, одним, подающим образец (через полые волокна), и другим, подающим диализный буфер (окружающий полые волокна, в направлении противотока). Для приблизительно 5 л образца используют приблизительно 2 м² площадь фильтра; и устанавливают следующую скорость потока жидкости: 40 мл/мин (для потока образца или 20 мл/мин/м² площади фильтра), 60 мл/мин (для потока диализного буфера, противотока). Перед и после диализа модуль с полыми волокнами промывают диализным буфером, и промывку после диализа добавляют к собранному продукту. После диализа образец имеет приблизительно тот же объем, что и до него, хотя он является немногим концентрированным.

Процентный выход ADAMTS13 после снижения проводимости буфера, таким образом, может составлять приблизительно 90%.

В других вариантах осуществления буферный обмен может быть осуществлен с помощью анионообменной хроматографии на ANX Sepharose-FF с узким диапазоном разделения, как на стадии 102.

Катионообменная хроматография.

Как показано на фиг. 1, стадия 107, после обогащения белком ADAMTS13 (и необязательной стадии 106 концентрирования и буферного обмена и/или стадии 105 инактивации вирусов) образец может быть подвергнут доочистке с помощью катионообменной хроматографии. Включающий белок ADAMTS13 буфер подвергают доочистке либо на колонке Source S (GE Healthcare), либо на колонке POROS® S, такой как колонка POROS 50 HS (Applied Biosystems).

Условия для доочистки на колонке Source 30S представлены в табл. 5, и буферы для стадии доочистки представлены в табл. 6.

Смоля: Source 30 S (GE Healthcare); загрузка на колонку: максимум 0,2 (0,5) мг ADAMTS13/мл смолы; высота слоя: 20 см.

Таблица 5

| Стадия | Буфер | Объем колонки (CV) | Скорость потока (см/ч) |
|--|--|--------------------|------------------------|
| Активация колонки | 2M NaCl | 2 | 32 |
| Уравновешивание | Буфер для уравновешивания SOS | 6 | 32 |
| Загрузка | | | 32 |
| Промывка | Буфер для уравновешивания SOS | 3 | 32 |
| Элюирование (с использованием градиента) | 100% буфера для уравновешивания SOS/0% буфера для элюирования из SOS до 0% буфера для уравновешивания SOS/100% буфера для элюирования из SOS | 5 | 19 |
| После элюирования | Буфер для элюирования из SOS | 3 | 32 |

Таблица 6

| Буфер | Состав | Примечания |
|-------------------------------|---|--|
| Буфер для уравновешивания SOS | 20 mM MES, pH=6,0 (при комнатной температуре) | Буфер может содержать 10 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ . |
| Буфер для элюирования из SOS | 20 mM MES, 500 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , pH=6,0 (при комнатной температуре) | |

Пул элюата из колонки Source S концентрируют и подвергают диафильтрации в обмен на буфер для хранения.

Условия для доочистки на колонке POROS® S представлены в табл. 7, и буферы для стадии доочистки представлены в табл. 8.

Смоля: POROS® S (Applied Biosystems, Foster City, CA); загрузка на колонку: максимум 12 мг ADAMTS13/мл смолы; высота слоя: 20 см.

Таблица 7

| Стадия | Буфер | Объем колонки (CV) | Скорость потока (см/ч) |
|---------------------------|--|---|------------------------|
| Активация колонки | 2M NaCl | 50 CV | 50 |
| Уравновешивание | Буфер для уравновешивания Poros | 10 CV (пока сигналы значений pH и проводимости не станут ровными и неизменными) | 50 |
| Загрузка | Элюят из MMC после обработки растворителем-дeterгентом и разбавления | Проводимость, составляющая менее 5 мСм/см (при комнатной температуре) | 31 |
| Повторное уравновешивание | Буфер для уравновешивания Poros | 5 CV | 32 |
| Промывка 1 | Буфер для промывки 1 Poros | 5 CV | 32 |
| Промывка 2 | Буфер для промывки 2 Poros | 7 CV | 32 |
| Элюирование | Буфер для элюирования из Poros | 5 CV | 19 |
| После элюирования | 2M NaCl | 3 CV | 32 |

Таблица 8

| | |
|---------------------------------|--|
| Буфер для уравновешивания Poros | 20 mM MES-кислота, 30 mM NaCl, 0,1% Tween 80, pH=6,0 (при комнатной температуре, проводимость = приблизительно 3,9 мСм/см при 25°C) |
| Буфер для промывки 1 Poros | 20 mM L-гистидин, 5 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,05% Tween 80, pH=6,0 (при комнатной температуре, проводимость = приблизительно 1,9 мСм/см при 25°C) |
| Буфер для промывки 2 Poros | 20 mM L-гистидин, 5 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,05% Tween 80, pH=7,5 (при комнатной температуре, проводимость = 1,9 мСм/см при 25°C) |
| Буфер для элюирования из Poros | 20 mM L-гистидин, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,05% Tween 80, pH=7,5 (при комнатной температуре, проводимость = приблизительно 18 мСм/см при 25°C) |

Пул элюата из колонки POROS® S концентрируют и подвергаютdiafiltration в обмен на буфер для хранения.

Процентный выход ADAMTS13 после этой дополнительной стадии доочистки может составлять по меньшей мере приблизительно 70%, и после обмена буфера по меньшей мере приблизительно 90%.

Как показано на фиг. 1, стадия 108, очищенный белок ADAMTS13 получают согласно описанному выше способу. ADAMTS замораживают и хранят, например, при приблизительно ниже -60°C. Выход в результате процесса в целом может составлять приблизительно от 22% до приблизительно 24% или более.

Пример 2.

На фиг. 2 кратко предоставлены различные условия, которые могут быть использованы для стадии 107 катионообменной хроматографии фиг. 1. В частности, сравнение продукта ADAMTS13, полученного из различий серий, показывает, что условия, приведенные на фиг. 2C, уменьшают количество загрязняющих агрегатов.

Как показано на фиг. 2A, вариант А представляет собой комбинацию инактивации вирусов с использованием обработки растворителем-детергентом (S/D), обсуждаемой более подробно ниже, с последующей катионообменной хроматографией на Poros S, при которой применяется стадия элюирования. Как показано на фиг. 2B, вариант В включает катионообменную хроматографию на Poros 50S, со стадией разбавления, но без предшествующей инактивации вирусов. Оба варианта А и В могут быть выполнены согласно методике, представленной в табл. 9.

Таблица 9

| | Объем колонки (CV) | Буферный состав | Скорость потока (см/ч) | Данные наблюдений |
|--------------------|--------------------|--|------------------------|--|
| Активация | 5 | 2M NaCl | 50 | |
| Уравновешивание | 6 | 20 mM MES-кислота, 30 mM NaCl, pH=6,0 (при комнатной температуре) | 50 | |
| Загрузка продукта | Приблизительно 12 | Подвергнутый обработке растворителем-детергентом и разбавленный раствор продукта | 32 | Максимальная загрузка на колонку = 6 мг ADAMTS13/мл смолы |
| Промывка 1 | 10 | 20 mM MES-кислота, 30 mM NaCl, pH=6,0 (при комнатной температуре) | 32 | |
| Промывка 2 | 5 | 20 mM гистидин, 30 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,05% Tween 80, pH=7,0 (при комнатной температуре) | 32 | |
| Стадия элюирования | 5 | 20 mM гистидин, 200 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,05% Tween 80, pH=7,5 (при комнатной температуре) | 25 | Объединение начинается после значительного увеличения сигнала при длине УФ=280 нм, и объединение завершается после снижения сигнала при длине УФ=280 нм ниже 5% от сигнала при длине УФ=280 нм в максимуме пика (приблизительно 1 CV). |

В случае варианта А кондиционированный (подвергнутый диализу) элюат со стадии 106 подвергают стадии 105 инактивации вирусов обработкой растворителем-дeterгентом. Сначала элюат фильтруют через фильтр с размером пор 0,2 мкм для удаления твердых частиц. Затем фильтрат дополняют смесью растворитель-дeterгент до конечных концентраций: 1% Triton X-100, 0,3% три-н-бутилфосфата и 0,3% полисорбата 80 (Tween 80) из стоковых растворов. Инактивацию выполняют при температуре в диапазоне приблизительно от 12 до приблизительно 25°C в течение периода времени, составляющего приблизительно от 30 мин до приблизительно 1 ч, при легком перемешивании или встряхивании. Инактивацию останавливают путем разбавления раствора одним объемом холодного буфера для разбавления (20 мМ MES, pH 6,0, при комнатной температуре). Для предохранения колонки подвергнутый обработке растворителем-дeterгентом и разбавленный раствор снова фильтруют с использованием 0,2 мкм фильтра, например, для удаления твердых частиц, которые могли образоваться во время обработки для инактивации вирусов.

Инактивированный растворителем-дeterгентом и разбавленный раствор продукта затем подвергают стадии 107 катионообменной хроматографии на Poros 50HS, используя стадию разбавления, подробности хроматографической методики представлены в табл. 9 выше. Полученный в результате пул элюата обеспечивает белок ADAMTS13 в форме нерасфасованного лекарственного вещества, который можно хранить в замороженном виде при ниже -60°C.

В случае варианта В стадию 107 катионообменной хроматографии выполняют на кондиционированном (подвергнутом диализу) элюате со стадии 106, без стадии 105 инактивации вирусов обработкой растворителем-дeterгентом. Подробности катионообменной хроматографии являются такими, как подробно представлено выше.

Как показано на фиг. 2С, вариант С представляет собой комбинацию, включающую очистку катионообменной хроматографией на Poros 50HS при использовании градиентного элюирования, с последующей инактивацией вирусов путем обработки растворителем-дeterгентом на колонке. Как ни удивительно, этот вариант уменьшает количество иных агрегатов, обнаруженных в очищенном белке ADAMTS13. Подробности хроматографической методики, которые могут быть использованы в случае варианта С, представлены в табл. 10 ниже.

Таблица 10

| | Объем колонки (CV) | Буферный состав | Скорость потока (см/ч) | Примечания |
|----------------------|--------------------|---|------------------------|---|
| Активация | 5 | 2М NaCl | 50 | |
| Уравновешивание | 6 | 20 мМ MES-кислота, 30 мМ NaCl, pH=6,0 (при комнатной температуре) | 50 | |
| Загрузка продукта | Приблизительно 6 | Подвергнутый диализу пул элюата от очистки на Capto MMC | 32 | Максимальная загрузка на колонку 6 мг ADAMTS13/мл смолы |
| Промывка 1 | 10 | 20 мМ MES-кислота, 30 мМ NaCl, pH=6,0 (при комнатной температуре) | 32 | |
| Промывка 2 | 1,5 | 20 мМ MES-кислота, 30 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 0,3% TNBP, 0,3% Tween 80, pH 6,0 (при комнатной температуре) | 32 | |
| Промывка 3 | 2,1 | 20 мМ MES-кислота, 30 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 0,3% TNBP, 0,3% Tween 80, pH 6,0 (при комнатной температуре) | 20 | Обработка растворителем-дeterгентом (S/D): составляющее 1 час время контактирования с химическими веществами S/D |
| Промывка 4 | 10 | 20 мМ MES-кислота, 30 мМ NaCl, pH=6,0 (при комнатной температуре) | 32 | Удаление химических веществ S/D |
| Промывка (буфером А) | 5 | 20 мМ гистидин, 30 мМ NaCl, 2 мМ CaCl ₂ , 0,1% Tween 80, pH=7,0 (при комнатной температуре) | 32 | Кондиционирование колонки для элюирования |
| Стадия элюирования | 10 | Градиент со 100% буфера А до 100% буфера В (20 мМ гистидин, 300 мМ NaCl, 2 мМ CaCl ₂ , 0,1% Tween 80, pH=7,5 (при комнатной температуре)) в пределах 10 CV | 32 | Объединение начинается после значительного увеличения сигнала при длине УФ=280 нм, и объединение завершается после снижения сигнала при длине УФ=280 нм ниже 5% от сигнала при длине УФ=280 нм в максимуме пика (приблизительно 2-3 CV) |

В случае варианта С загрузочным материалом является пул элюата со стадии 104 доочистки катионообменной хроматографией и предпочтительно имеет проводимость, которая меньше 4,5 мСм/см, достигаемую с помощью диализа или буферного обмена посредством гель-фильтрации. Примечательно, что катионообменная хроматография на Poros S приспособлена к включению обработки растворителем-дeterгентом на колонке, которая включает инактивацию вируса, иммобилизованного на хроматографической колонке, как обсуждалось выше. Инактивация вирусов на колонке включает промывку в течение одного часа смесью растворитель -дeterгент при 2-10°C. После обработки на колонке осуществляют замену буфера для промывки, чтобы эффективно отмыть химические вещества смеси растворитель-deterгент перед элюированием.

Элюирование изменяют с переходом от стадии элюирования с использованием 200 мМ NaCl к градиентному элюированию, которое, как полагают, способствует разделению мономерных и олигомерных видов ADAMTS13, особенно в нисходящей части пика элюирования. Агрегаты удаляются в поздней фракции элюирования, обеспечивая, таким образом, дополнительное удаление иных агрегатов, обнаруженных в очищенном белке ADAMTS13. В качестве дополнительного приспособления для стабилизации

мономерного белка ADAMTS13 концентрацию Tween 80 в буфере для элюирования увеличивают с 0,05 до 0,1% в буферах для промывки и элюирования. Как полагают, это дополнительно предотвращает образование агрегатов во время элюирования ADAMTS13 из смолы Poros S. Подробности хроматографической методики на Poros S, включающей инактивацию вирусов обработкой растворителем-дeterгентом на колонке, представлены в табл. 10 выше.

Как показано на фиг. 2D, вариант D служит в качестве контроля. В случае варианта D стадию 107 доочистки катионообменной хроматографией выполняют на Poros 50 HS снова с использованием градиентного элюирования и увеличенной концентрации Tween 80 в буфере для элюирования, но без инактивации вирусов на колонке обработкой растворителем-дeterгентом. Стадию 105 обработки растворителем-дeterгентом для инактивации вирусов выполняют вместо концентрированного сбора перед катионообменной хроматографией. Подробности хроматографической методики представлены в табл. 11 ниже.

Таблица 11

| | Объем колонки (CV) | Буферный состав | Скорость потока (см/ч) | Примечания |
|------------------------|--------------------|---|------------------------|---|
| Активация | 5 | 2M NaCl | 50 | |
| Уравновешивание | 6 | 20 mM MES-кислота, 30 mM NaCl, pH=6,0 (при комнатной температуре) | 50 | |
| Загрузка продукта | Приблизительно 6 | Подвергнутый диялизу пул элюата от очистки на Capto MMC | 32 | Максимальная загрузка на колонку 6 мг ADAMTS13/мл смолы |
| Промывка 1 | 10 | 20 mM MES-кислота, 30 mM NaCl, pH=6,0 (при комнатной температуре) | 32 | |
| Промывка 2 (буфером А) | 10 | 20 mM гистидин, 30 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,1% Tween 80, pH=7,0 (при комнатной температуре) | 32 | Кондиционирование колонки для элюирования |
| Стадия элюирования | 10 | Градиент со 100% буфера А до 100% буфера В (20 mM гистидин, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,1% Tween 80, pH=7,5 (при комнатной температуре)) в пределах 10 CV | 32 | Объединение начинается после значительного увеличения сигнала при длине УФ=280 нм, и объединение завершается после снижения сигнала при длине УФ=280 нм ниже 5% от сигнала при длине УФ=280 нм в максимуме пика (приблизительно 2-3 CV) |

В случае варианта D загрузочным материалом является пул элюата со стадии 104 доочистки катионообменной хроматографией и предпочтительно имеет проводимость, которая меньше 4,5 мСм/см, достигаемую с помощью диализа или буферного обмена посредством гель-фильтрации. На стадии 107 катионообменной хроматографии на Poros S используют градиентное элюирование вместо стадии элюирования, а также 0,1% Tween 80 в буферах для промывки и элюирования, как описано выше. Подробности хроматографической методики на Poros S с использованием градиентного элюирования представлены в табл. 11 выше.

Пример 3.

Эксперименты, проводимые в лабораторных масштабах, используя масштаб 100-л ферментера, проводили с использованием инактивации вирусов обработкой растворителем-дeterгентом на колонке для определения возможного влияния данной методики на проведение стадии 107 катионообменной хроматографии. Данные представлены в табл. 12.

Таблица 12

| Образец | Методика обработки растворителем-дeterгентом | Выход из Poros S | | Специфическая активность | Примеси CHO НСР | | Агрегаты | | |
|---------|---|------------------|--------------------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------|-----------|
| | | % Ag ADAMTS13 | % ADAMTS13 в единицах по методу FRET | | Единицы/мг Ag ADAMTS13 | нг CHO НСР/единицу ADAMTS13 | нг CHO НСР/мг Ag ADAMTS13 | % мультимеров | % димеров |
| 1 | Обработка растворителем-дeterгентом непосредственно перед хроматографией на Poros S (вариант А) | 99 | 100 | 696 | 0,49 | 346 | 9,7 | 7,0 | 83,3 |
| 2 | Без обработки растворителем-дeterгентом (вариант В) | 133 | 154 | 894 | 0,58 | 519 | 1,3 | 4,6 | 94,1 |
| 3 | Обработка растворителем-дeterгентом на колонке (Poros S) (вариант С) | 89 | 95 | 931 | 0,60 | 561 | 1,0 | 2,3 | 96,7 |
| 4 | Обработка растворителем-дeterгентом на колонке (Poros S) (вариант С) | 87 | 117 | 905 | 0,39 | 354 | 1,0 | 3,7 | 95,3 |
| 5 | Обработка растворителем-дeterгентом на стадии сконцентрированного сбора (вариант D) | 65 | 93 | 764 | 0,21 | 163 | 0,8 | 1,5 | 97,8 |
| 6 | Обработка растворителем-дeterгентом на стадии сконцентрированного сбора (вариант D) | 81 | 108 | 845 | 0,38 | 324 | 0,7 | 1,5 | 98,7 |
| 7 | Обработка растворителем-дeterгентом на стадии сконцентрированного сбора (вариант D) | 66 | 131 | 741 | 0,31 | 231 | 0,2 | 1,1 | 98,7 |

* - выходы, превышающие 100%, отражают проблему анализа хроматографически загружаемой на Poros 50S фракции; Ag ADAMTS13 - антитела ADAMTS13; ADAMTS13 FRET - ADAMTS13 в единицах по методу FRET; CHO НСР - белки клеток-хозяев яичника китайского хомячка.

Как представлено в табл. 12, выполнение инактивации вирусов через обработку растворителем-дeterгентом перед катионообменной хроматографией на Poros S может привести к образованию большого количества агрегатов (вариант А на фиг. 2А и образец 1). В случае пропуска обработки растворителем-дeterгентом и осуществления этой же методики образование агрегатов значительно уменьшается (вариант В на фиг. 2В и образец 2).

Выполнение обработки растворителем-дeterгентом на колонке, т.е. приведение ADAMTS13 в контакт со смесью растворитель-дeterгент, когда он иммобилизован на поверхности смолы, также может предотвратить образование агрегатов. Кроме того, небольшое количество агрегатов, которые действительно образуются, можно в дальнейшем удалить градиентным элюированием в поздних фракциях элюирования (вариант С на фиг. 2С; образцы 3 и 4).

Для сравнения в процессе очистки стандартную обработку растворителем-дeterгентом в растворе осуществляют с последующей катионообменной хроматографией на Poros S без обработки растворителем-дeterгентом ни непосредственно перед, ни на колонке (вариант D на фиг. 2D, образцы 5-7). Такая методика также приводит к ADAMTS13 с низким содержанием агрегатов.

Все патенты и публикации патентных заявок, на которые ссылаются в данном описании, включены, тем самым, посредством ссылки.

Определенные модификации и улучшения могут быть осуществлены специалистами в данной области техники после прочтения приведенного выше описания. Следует понимать, что все такие модификации и улучшения были исключены из описания для краткости и удобочитаемости, но они, как следует, входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ инактивации *in vitro* вирусов с липидной оболочкой в растворе белка при очистке терапевтической белковой композиции, включающей

обеспечение раствора белка, содержащего терапевтический белок, загрязненный вирусом с липидной оболочкой, где указанный терапевтический белок представляет собой по меньшей мере один белок, выбранный из ADAMTS13, фактора VIII, фактора VIIa, фактора IX, фактора Виллебранда и антитела против MIF;

иммобилизацию указанного терапевтического белка на носителе *in vitro*, где указанная иммобилизация происходит посредством связей между группой на носителе и группой на белке и где указанная иммобилизация не осуществляется в присутствии смеси растворитель-дeterгент;

последующую обработку указанного терапевтического белка, иммобилизованного на указанном носителе, смесью растворитель-дeterгент, включающей неионный дeterгент и органический растворитель в концентрациях и в течение периода времени, достаточных для осуществления инактивации указанных вирусов с липидной оболочкой.

2. Способ по п.1, где указанный носитель представляет собой хроматографическую смолу.

3. Способ по п.1 или 2, где указанная смесь растворитель-дeterгент включает 1% Triton X-100, 0,3% три-*n*-бутилфосфата и 0,3% полисорбата 80.

4. Способ по любому из пп.1-3, где инкубация в указанной смеси растворитель-дeterгент продолжается в течение от 30 мин до 1 ч.

5. Способ по любому из пп.1-4, дополнительно включающий элюирование указанного терапевтического белка из указанного носителя буфером для хранения.
6. Способ по п.5, где указанный буфер для хранения имеет pH выше чем 7,0 и включает менее 10 мМ ионов кальция, буферирующее соединение, 0,05%-го неионного детергента и соль.
7. Способ по п.5, где указанный носитель представляет собой катионообменную смолу.
8. Способ по любому из пп.1-7, где отсутствуют последующие после стадии элюирования катионообменной смолы буфером для хранения стадии ультрафильтрации, диафильтрации или буферного обмена.
9. Способ по любому из пп.1-8, где указанная обработка растворителем-детергентом приводит к пониженному образованию агрегатов указанного терапевтического белка по сравнению с обработкой растворителем-детергентом, пока указанный терапевтический белок присутствует в растворе.

