



(51) МПК
C08B 37/00 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2009134940/10**, **28.02.2008**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.02.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
28.02.2007 EP 07103275.9

(43) Дата публикации заявки: **10.04.2011** Бюл. № 10

(45) Опубликовано: **27.01.2013** Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 5039610 A**, **13.08.1991**. **WO 2006016161 A1**, **16.02.2006**. **EP 50072513 A2**, **23.02.1983**. **US 5589591 A**, **31.12.1996**. **CN 1916010 A**, **21.02.2007**. **FR 2848223 A1**, **11.06.2004**. **WO 2005003152 A1**, **13.01.2005**.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **28.09.2009**

(86) Заявка РСТ:
GB 2008/050138 (28.02.2008)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/104811 (04.09.2008)

Адрес для переписки:

191186, Санкт-Петербург, а/я 230, "АРС-ПАТЕНТ", пат.пов. И.И. Липатовой, рег.№ 554

(72) Автор(ы):

**ДЖАЙН Санжай (GB),
 ЛАЙНГ Питер (GB),
 ГРЕГОРИАДИС Грегори (GB)**

(73) Патентообладатель(и):

**ЛИПОКСЕН ТЕКНОЛОДЖИЗ
 ЛИМИТЕД (GB)**

(54) СПОСОБ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОТОКСИНА В ОБРАЗЦЕ, СОДЕРЖАЩЕМ ПОЛИСИАЛОВУЮ КИСЛОТУ И ЭНДОТОКСИН

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. К образцу добавляют основание, имеющее рКа 12-13, и инкубируют в течение периода времени от 5 минут до 24 часов при температуре от 0°C до 60°C. Пропускают образец через анионообменную колонку, при этом полисиаловая кислота (PSA) адсорбируется на ионообменной смоле. Промывают колонку с помощью буфера, имеющего низкую ионную силу, который

включает NaCl в концентрации 0,2М. Полисиаловую кислоту элюируют с колонки буфером, имеющим более высокую ионную силу. Стадию промывания колонки повторяют неоднократно. Дополнительно способ может содержать предварительные стадии: нейтрализации, инкубирования образца с ПАВ, хелатирующим реагентом, органическим растворителем, окислителем или пероксидазой, стадию очистки с помощью ионообменной, аффинной, эксклюзионной хроматографии, с

помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий или их комбинаций. Получают образец, имеющий сниженное содержание эндотоксина, в котором PSA представляет собой поли(2,8-связанную сиаловую кислоту), поли(2,9-связанную сиаловую кислоту, чередующуюся 2,8-2,9-связанную полисиаловую кислоту, коломиновую кислоту или окисленное, восстановленное, аминированное и/или гидразидное ее

производное. Для получения образца культурального бульона, содержащего полисиаловую кислоту и эндотоксин, предварительно культивируют *Escherichia coli*, при этом способ может включать промежуточные стадии по удалению белка, липидов, нуклеиновых кислот и/или питательных веществ. Сниженное содержание эндотоксина в образце составляет не более 1407 ЭЕ/мг PSA или не более 300 ЭЕ/мг PSA. 14 пр.

R U 2 4 7 3 5 6 7 C 2

R U 2 4 7 3 5 6 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C08B 37/00 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009134940/10, 28.02.2008**

(24) Effective date for property rights:
28.02.2008

Priority:

(30) Convention priority:
28.02.2007 EP 07103275.9

(43) Application published: **10.04.2011 Bull. 10**

(45) Date of publication: **27.01.2013 Bull. 3**

(85) Commencement of national phase: **28.09.2009**

(86) PCT application:
GB 2008/050138 (28.02.2008)

(87) PCT publication:
WO 2008/104811 (04.09.2008)

Mail address:

191186, Sankt-Peterburg, a/ja 230, "ARS-PATENT", pat.pov. I.I. Lipatovoj, reg.№ 554

(72) Inventor(s):

**DZhAJN Sanzhaj (GB),
LAJNG Piter (GB),
GREGORIADIS Gregori (GB)**

(73) Proprietor(s):

LIPOKSEN TEKNOLODZhIZ LIMITED (GB)

(54) METHOD OF REDUCING CONTENT OF ENDOTOXIN IN SAMPLE CONTAINING POLYSIALIC ACID AND ENDOTOXIN

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry. A base having pKa 12-13 is added to a sample and incubated for 5 minutes to 24 hours at temperature of 0-60°C. The sample is passed through an anion-exchange column, wherein polysialic acid (PSA) is adsorbed on an anion-exchange resin. The column is washed with a buffer having low ionic force, which contains NaCl in concentration of 0.2M. The polysialic acid is eluted from the column using a buffer having higher ionic force. The step for washing the column is repeated multiple times. The method may additionally include preliminary steps: neutralisation, incubation of the sample with a surfactant, a chelating agent, an organic solvent, an oxidant or peroxidase, a step for cleaning using ion-

exchange, affinity, size-exclusion chromatography, using hydrophobic-interaction chromatography or combinations thereof. A sample is obtained, having low endotoxin content, wherein PSA is poly(2,8-combined sialic acid), poly(2,9-combined sialic acid), alternating 2,8-2,9-combined polysialic acid, colominic acid or an oxidised, reduced, aminated and/or hydrazide derivative thereof. To obtain a sample of culture broth containing polysialic acid and endotoxin, Escherichia coli is pre-cultured, wherein the method may include intermediate steps for removing protein, lipids, nucleic acids and/or nutrients.

EFFECT: low content of endotoxin in the sample of not more than 1407 EU/mg PSA or not more than 300 EU/mg PSA.

14 ex

Настоящее изобретение касается снижения содержания эндотоксина в полисиаловой кислоте (PSA) и ее конъюгатах путем инкубации в присутствии сильного основания с последующим извлечением PSA, обычно с помощью адсорбции и элюирования с анионообменной колонки. Очищенная PSA с пониженным
5 содержанием эндотоксина может быть использована для дериватизации систем доставки лекарственных веществ, биологических молекул, включающих лекарственные вещества белковой и пептидной природы, что улучшает фармакокинетику и фармакодинамику лекарственного вещества.

Полисиаловые кислоты - это природные неразветвленные полимеры сиаловой кислоты, продуцируемые некоторыми штаммами бактерий, а также в некоторых клетках млекопитающих [Roth et. al., 1993]. Они могут быть синтезированы с различной степенью полимеризации от $n \approx 80$ и более остатков сиаловой кислоты и вплоть до $n=2$, путем ограниченного кислотного гидролиза или расщепления с
15 помощью нейраминидаз, или же путем фракционирования природных форм этого полимера бактериального происхождения. Состав различных полисиаловых кислот также варьируется, так что имеются гомополимерные формы, например, альфа-2,8-связанная полисиаловая кислота, включающая капсулярный полисахарид штамма K1 E. Coli и meningococci группы B, и которая обнаруживается также на эмбриональной форме молекул адгезии нервных клеток (N-CAM). Гетерополимерные формы также существуют - например, чередующаяся альфа-2,8 альфа-2,9 полисиаловая кислота штамма K92 E. Coli и полисахариды группы C у N. meningitidis. Сиаловая кислота может быть также обнаружена в чередующихся сополимерах с мономерами,
25 отличными от сиаловой кислоты, например, в группе W135 или Y у N. meningitidis. Полисиаловые кислоты выполняют важные биологические функции, включающие уход патогенных бактерий от воздействия иммунной системы и системы комплемента, а также регуляцию глиальной адгезивности незрелых нейронов во время развития плода (где полимеры несут анти-адгезивную функцию) [Muhlenhoff et. al., 1998], хотя на данный момент нет известных рецепторов для полисиаловых кислот у млекопитающих. Альфа-2,8-связанные Полисиаловые кислоты штамма K1 E. Coli известны также как "коломиновая кислота" (CA, colominic acid) и использованы (с разной длиной), чтобы продемонстрировать в примерах настоящее изобретение.

Альфа-2,8-связанная форма полисиаловой кислоты, среди прочих бактериальных полисахаридов, не является иммуногенной (не вызывая ни Т-клеточный ответ, ни продукцию антител в организме млекопитающих, даже будучи конъюгированной с иммуногенными белками-носителями), что может отражать ее статус как полимер млекопитающих (в равной степени как и бактериальный полимер). Более короткие
40 формы этого полимера (вплоть до $n=4$) обнаруживаются на ганглиозидах клеточной поверхности, которые широко распространены в организме и которые, как считается, в значительной мере обуславливают и поддерживают иммунологическую толерантность к полисиаловой кислоте. В последние годы биологические свойства полисиаловых кислот, особенно альфа-2,8-связанной гомополимерной полисиаловой кислоты, использовались для модификации фармакокинетических свойств белковых и низкомолекулярных лекарственных веществ [Gregoriadis, 2006; Jain et. al., 2003; US-A-5846,951; WO-A-0187922]. Дериватизация полисиаловой кислоты приводит к
50 поразительному улучшению времени полужизни в кровотоке ряда терапевтических белков, включая каталазу и аспарагиназу, а также позволяет применять эти белки, несмотря на наличие предсуществующих антител, продукция которых явилась нежелательным (а иногда и неизбежным) последствием предшествующего воздействия

этих терапевтических белков. Во многих отношениях модифицированные свойства полисиалированных белков сравнимы со свойствами белков, дериватизированных с помощью полиэтиленгликоля (PEG). Например, в каждом случае значения времени полужизни возрастают, а белки или пептиды становятся более устойчивы к протеолитическому расщеплению, но биологическая активность оказывается большей в случае PSA, по сравнению с PEG [Hreczuk-Hirst et. al., 2002]. Кроме того, имеются проблемы в использовании PEG вместе с терапевтическими средствами, которые следует вводить постоянно, поскольку PEG лишь в очень малой степени подвергается биологической деградации [Beranova et. al., 2000], и высокомолекулярные формы имеют тенденцию к накоплению в тканях [Bendele et. al., 1998; Convers et. al., 1997]. Было обнаружено, что дериватизированные с помощью полиэтиленгликоля белки вызывают выработку антител против PEG, что также может влиять на время жизни конъюгата в кровотоке [Speng et. al., 1999]. Несмотря на укоренившуюся практику использования PEG как парентерально вводимого полимера, конъюгированного с лекарственными веществами, потребуется большее понимание его иммунотоксикологии, фармакологии и метаболизма [Hunter and Moghimi, 2002]. Более того, существуют сложности в использовании PEG в терапевтических средствах, для которых могут потребоваться большие дозировки, поскольку накопление PEG может привести к токсическим проявлениям. Поэтому альфа-2,8-связанная полисиаловая кислота представляет собой заманчивую альтернативу PEG, поскольку представляет собой иммунологически невидимый биodeградируемый полимер, который является естественной составляющей частью человеческого организма и который расщепляется с помощью тканевых нейраминидаз до сиаловой кислоты, нетоксичного сахара. Однако неочищенная PSA загрязнена высоким содержанием эндотоксина, что ограничивает ее терапевтическое применение.

В предшествующих научных статьях и выданных патентах нашей группой была описана очистка и фракционирование PSA, а также ее использование для улучшения фармакокинетических свойств белковых терапевтических средств [Gregoriadis, 2006, Jain et. al., 2004; US-A-05846, 951; WO-A-0187922]. Теперь мы описываем получение очищенных полисиаловых кислот (PSAs) со сниженным содержанием эндотоксина, которые могут быть использованы для получения PSA-дериватизированных белков и других лекарственных веществ. Эти новые материалы и методы особенно подходят для получения PSA-дериватизированных терапевтических средств, предназначенных к применению у людей и животных, в которых химическое и молекулярное определение подлинности лекарственных веществ имеет повышенную важность ввиду медицинской этики и требований безопасности со стороны таких распорядительных органов, как FDA и EMEA.

Эндотоксин (который является липополисахаридом) был впервые охарактеризован Рихардом Пфайфером (Richard Pfeiffer) в 1892 году как устойчивое к нагреванию токсичное вещество, выделяющееся при разрыве бактериальных оболочек. Воспалительная реакция в инфицированном организме хозяина приводит к развитию токсического эффекта, что, по-видимому, является оптимально адаптированной реакцией для устранения большинства местных инфекций. Тем не менее при этом может возникнуть воспалительная реакция, которая приведет к септическому шоку и смерти, если имеется системное распространение серьезных инфекций.

Этот липополисахарид (LPS) участвует в большинстве стадий, которые протекают в процессе презентации эндотоксина миелоидным клеткам иммунной системы и продукции провоспалительных цитокинов. Наиболее действенным компонентом LPS

является липид А, и последний стал синонимом эндотоксина. Бактериальные медиаторы воспаления, такие как пептидогликан, диацилглицерилцистеиновая часть бактериальных липопротеинов и характерные элементы (сигнатуры, signatures) бактериальных нуклеиновых кислот, также относят к эндотоксину. Недавно было обнаружено, что толл-подобный рецептор (TLR4) является передатчиком воспалительного сигнала от липида А. Помимо этого были идентифицированы передатчики сигнала для различных медиаторов воспаления. Структура эндотоксина важна, поскольку информация о ней дает возможность понять, как эндотоксин можно удалить.

LPS состоит из трех частей: проксимальная - гидрофобный участок, образованный липидом А, который «заякоривает» LPS во внешнем слое внешней мембраны (ОМ); дистальный, представляющий собой гидрофильные повторы О-антигена и расположенный в водной среде; и связующая центральная часть (кор) - олигосахарид. Сахара О-антигена и кора, хотя и не являются существенными для выживания, но обеспечивают бактериальную устойчивость к различным антимикробным агентам, включая детергенты и мембрано-атакующий комплекс сывороточного компонента.

Клетки дикого типа, продуцирующие О-антиген, называют «гладкими» (благодаря тому, что они образуют гладкие колонии), а те, которые не имеют О-антигена, - «шероховатыми». Молекулы, содержащие полисахарид О-антигена, обычно обозначают как LPS, а молекулы, не имеющие О-антигена, такие как в *Neisseria*, обозначают как липоолигосахарид, или LOS. Поскольку липид А жизненно важен и является также мощным медиатором воспаления, он представляет в настоящий момент мишень для разработки антибиотиков и противовоспалительных средств.

Многие медиаторы воспаления, помимо LPS, могут рассматриваться как эндотоксины, включая пептидогликан, диацилглицерилцистеиновую часть бактериальных липопротеинов, характерные элементы бактериальных нуклеиновых кислот и неактивные эндотоксины (продуцируемые эндотоксин-мутантными штаммами).

Модифицированная структура липида А была использована для разработки новых антагонистов эндотоксина и иммуностимуляторов [Christ et al., 1995]. Выяснение биохимических особенностей структуры и функции липида А позволяет понять его роль в бактериальном патогенезе и вводить новые методы борьбы с инфекцией [Bishop 2005].

Были разработаны способы для снижения содержания эндотоксина в жидкостях. Например, в WO 87/07531 описано удаление эндотоксина из содержащих эндотоксин жидкостей, таких как кровь, с использованием полимиксина В, иммобилизованного на твердофазном носителе.

В US 6,942,802 В2 описаны методы удаления бактериального эндотоксина из белкового раствора с целью извлечения белка. В этом патенте используется металл-аффинная хроматография.

US 6,713,611 В2 касается способа удаления эндотоксина из раствора, содержащего основные белки. Данный способ включает добавление поверхностно-активного вещества к раствору и нанесение полученного раствора на катионообменную колонку с последующим снятием основного белка с колонки.

В US 6,617,443 описан способ удаления эндотоксинов из материала, из которого следует получить нуклеиновые кислоты. Эндотоксины удаляются путем преинкубации нуклеиновых кислот в бессолевым растворе детергента и последующей анионообменной хроматографии с помощью анионообменника, изготовленного на

основе технологии «щупалец».

В US 5,169,539 описан способ удаления эндотоксина из раствора, содержащего белок и эндотоксин, где рН раствора доводится до рН 9 или ниже (изоэлектрическая точка белка), и раствор пропускают через колонку, упакованную перекрестно связанным гранулярным хитозаном. Эндотоксин абсорбируется, а белок выходит.

В US 5,917,022 описан способ удаления эндотоксина из биологических продуктов, например белков для терапевтического применения, фракции плазмы крови и растворы альбумина. Этот способ включает связывание эндотоксина, присутствующего в указанных биологических продуктах, с перекрестно связанной гидрофильной матрицей, образованной сополимером аллилдекстрана и N,N'-метиленбисакриламида, с которым эндотоксин связывается с некоторой степенью специфичности. Этот способ относится к классу методов аффинной хроматографии.

US 7,109,322 раскрывает способ снижения содержания или удаления эндотоксинов из композиций, содержащих активные лекарственные вещества, как правило, нуклеиновые кислоты, выделенные из природных источников с помощью генной инженерии и/или биотехнологии. С этой целью композиции, извлекаемые, например, из культурального бульона, обрабатывают с помощью хроматографических материалов. Фракции природных источников, такие как культуральный бульон E. coli, получают и центрифугируют, лизируют с помощью 200 мМ NaOH, 1% додецилсульфата натрия, фильтруют и затем пропускают через анионообменную колонку, на которой преимущественно (по сравнению с эндотоксином) абсорбируется нуклеиновая кислота. Нуклеиновую кислоту смывают элюирующим буфером и собирают. В другом примере перед анионообменной колонкой применяют металл-аффинный абсорбент для эндотоксина.

Изобретение US 6,699,386 B2 представляет абсорбент, обладающий высокой способностью селективно абсорбировать эндотоксин, а также способ абсорбции эндотоксина из раствора белка. Данный абсорбент состоит из вещества основной природы, связанного с материалом-носителем с помощью перекрестно сшивающего реагента.

В изобретении US 6,774,102 описано вещество для обработки крови, обладающее способностью селективно удалять эндотоксин и индуцирующие цитокин вещества из крови или плазмы путем экстракорпоральной адсорбции, для терапевтического лечения септического шока. Здесь также представлены методы и оборудование, в которых используется адсорбент, включающий полидисперсный олигопептид по изобретению, иммобилизованный на твердофазной подложке, для удаления эндотоксина из крови человека или животного.

Также были описаны способы для удаления эндотоксина из образцов полисахаридов.

В US 5,589,591 раскрыт способ получения полисахаридной композиции, в существенной мере освобожденной от эндотоксина, в котором применяется методика разделения по размеру, предпочтительно ультрафильтрация. Этот способ подходит для удаления эндотоксина из маннанов, гуммиарабика и арабиногалактана, полученных из их растительных источников.

В патенте US 5,039,610 описан способ удаления эндотоксина из граммотрицательных полисахаридов, таких как полирибозилрибитолфосфат. Содержащий полисахариды порошок, полученный из культурального бульона граммотрицательных бактерий, солибилизируют с целью получения двухвалентного противоиона для эндотоксина. Добавляют в возрастающем количестве спирт, чтобы вызвать осаждение

липополисахарида, и полученный материал смешивают с неионной смолой, детергентом и хелатирующим реагентом.

Однако до сих пор остается актуальной задача снижения содержания эндотоксина в образцах полисиаловой кислоты до приемлемого уровня для применения в лекарственных препаратах. Полисахарид из культуральных бульонов имеет содержание анионов и молекулярный вес, очень близкие к эндотоксину. Природное соединение также является липополисахаридом. По этим причинам большинство методов очистки приводят к частичной соочистке PSA и эндотоксина. Настоящее изобретение позволяет решить эти проблемы.

В соответствии с первым аспектом данного изобретения, мы представляем способ снижения содержания эндотоксина в образцах, содержащих полисиаловую кислоту и эндотоксин, включающий последовательные стадии:

(i) добавление к образцу основания, имеющего рКа по меньшей мере 12, чтобы получить основной раствор с рН по меньшей мере 12, инкубация раствора в течение предварительно определенного времени при предварительно определенной температуре; и затем

(ii) извлечение из раствора полисиаловой кислоты, имеющей сниженное содержание эндотоксина.

В одном воплощении извлечение PSA из раствора включает стадии:

(iii) пропускание обработанного основанием раствора через анионообменную колонку, в ходе чего полисиаловая кислота абсорбируется на анионообменной смоле;

(iv) промывание колонки одним промывочным буфером, в результате чего полисиаловая кислота остается абсорбированной на анионообменной смоле; и

(v) элюирование полисиаловой кислоты с колонки с помощью элюирующего буфера для получения конечного раствора полисиаловой кислоты, имеющего сниженное содержание эндотоксина. Считается, что по меньшей мере некоторое

количество обработанного основанием продукта эндотоксина выходит из ионообменной колонки в мертвом объеме.

В другом воплощении стадия извлечения (ii) включает стадию обработки с целью удаления солей, т.е. основанную на эксклюзионной хроматографии, при этом более высокомолекулярные вещества, такие как полисахариды, получают свободными от солей. Это изобретение особенно полезно для обработки бактериальных культуральных бульонов.

Раствор, содержащий полисиаловую кислоту и эндотоксин, который подвергают обработке основанием согласно способу по изобретению, является предпочтительно культуральным бульоном (обычно супернатант после центрифугирования) или продуктом предварительных стадий обработки с целью удаления нежелательных загрязняющих веществ, таких как питательные вещества, липиды, белки и нуклеиновая кислота. Тем не менее образец может содержать белок, присутствие которого нежелательно в конечном продукте, поскольку ожидается, что он будет расщеплен основанием, а продукты деградации будут легко удалены в ходе стадий извлечения PSA.

Данный способ позволяет получить образцы PSA, которые имеют сниженное содержание эндотоксина и которые подходят для применения в изготовлении лекарств. Для специалиста в данной области удивительно то, что использование сильного основания не приводит к деградации (молекулярного веса) или деацетилированию PSA. Опытный специалист постарался бы избежать контакта PSA с сильным основанием, таким как NaOH, в тех случаях, когда следует избегать

деацетилирования (см., например, Moe et al.). Тем не менее мы показали, что инкубация с основанием с последующим извлечением PSA, например с помощью элюирования с анионообменной колонки, является исключительно эффективным способом снижения содержания эндотоксина в PSA и при этом не приводит ни к химической модификации (например, к деацетилированию), ни к снижению молекулярного веса.

В соответствии со вторым аспектом изобретения, представлен образец PSA материала, имеющий сниженное содержание эндотоксина, который можно получить указанным выше способом.

Содержание эндотоксина должно быть снижено до фармацевтически приемлемого уровня. Предпочтительно, чтобы содержание эндотоксина в образце после применения способа по изобретению было менее 25 ЭЕ/мг (эндотоксиновых единиц на мг) в PSA-материале. Таким образом, третий аспект изобретения представляет образец PSA, имеющий содержание эндотоксина 25 ЭЕ/мг или менее в PSA-материале, что определено с помощью теста LAL. Предпочтительно, чтобы содержание эндотоксина было в пределах 0,05-25 ЭЕ/мг в PSA-материале. Настоящее изобретение предоставляет образцы самой PSA, а также образцы конъюгатов с PSA, например конъюгаты с биологической молекулой или системой доставки лекарственных веществ (которые далее будут обозначаться как PSA-материал), имеющие низкое содержание эндотоксина.

Способ по изобретению осуществляют в условиях, которые обеспечивают хороший выход PSA. Предотвратить загрязнение PSA аффинными лигандами, такими как полимиксин В, или поликатионами, такими как поли-D-лизин, которые обычно используют в аффинных адсорбентах, разработанных для удаления эндотоксина, можно либо опуская применение этих материалов совсем, либо применяя их в условиях, при которых не происходит деградация матрицы (при этом удаление эндотоксина может быть не оптимизированным). Такую «очищенную» PSA можно применять для дериватизации терапевтических средств, например белков, и вводить в человеческий организм без риска возникновения токсических проявлений эндотоксина.

Уровень эндотоксина измеряли с помощью LAL-теста, как описано в Европейской Фармакопее 5.0, Приложение XIVC.

На стадии (i) образца добавляют к основанию, имеющему рКа по меньшей мере 12. Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагают, что основание расщепляет связи, по всей видимости, сложноэфирные связи эндотоксина, делая его неактивным и/или способствуя удалению продуктов реакции. Таким образом, для того, чтобы основание могло быть применено в способе согласно данному изобретению, оно должно быть достаточно сильным, чтобы реагировать с эндотоксином и гидролизовать последний. Удивительно, что концентрация эндотоксина снижалась без существенного разрушения полисиаловой кислоты, например, посредством деацетилирования N-ацетильных групп или расщепления цепей полисиаловой кислоты.

Предпочтительно, чтобы основание имело рКа по меньшей мере 13 или, более предпочтительно, по меньшей мере 14. Желательно, чтобы основание давало основной раствор, имеющий рН по меньшей мере 13, более предпочтительно - по меньшей мере 14. Образец обычно инкубируют с основанием в подходящем буфере, например в буфере HEPES, или в воде.

Основания, пригодные для применения в данном изобретении, - это NaOH, KOH и LiOH. Особенно предпочтителен NaOH. NaOH подходит для применения в

концентрации 2н.

Стадию (i) проводят в течение предварительно определенного времени, которое обычно находится в пределах от 5 минут до 24 часов, предпочтительно, от 30 минут до 6 часов. Предварительно определенная температура обычно находится в пределах от 0°C до 60°C и предпочтительно от 2°C до 40°C. Более высокие температуры и/или большее время может привести к нежелательной деградации самой PSA.

В одном из воплощений изобретения инкубацию на стадии (i) проводят в течение 2 часов при 20°C при постоянном перемешивании. За стадией (i) может непосредственно следовать дополнительная стадия, в которой образец нейтрализуют. Нейтрализацию можно осуществлять, например, с помощью HCl, для достижения конечной pH раствора около 7,4.

Подходящий способ, включающий применение ионообменной хроматографии, на которой могут быть основаны стадии (iv) и (v), описан в нашей предыдущей заявке на патент WO 2006/016161. Этот способ может быть адаптирован для применения в настоящем изобретении в случаях, где нет необходимости на этой стадии разделять PSA на фракции с различным средним молекулярным весом. Согласно этому известному способу, полисиаловую кислоту разделяют на фракции с различным средним молекулярным весом. Водный раствор PSA вводят в контакт с анионообменной смолой в колонке, в ходе чего PSA адсорбируется. Затем PSA селективно элюируют водными элюирующими буферами и PSA извлекают из элюированных фракций. Селективное элюирование включает промывание смолы на колонке, по меньшей мере, одним элюирующим буфером. Если используют более чем один элюирующий буфер, каждый из них может иметь различную ионную силу и/или pH, причем второй и последующие буферы имеют более высокую ионную силу и/или pH, чем буферы, использованные на непосредственно предшествующей стадии. Процедура фракционирования с использованием ионного обмена приводит к небольшому снижению содержанию эндотоксина.

В предпочтительных воплощениях способа по данному изобретению образец пропускают через анионообменную колонку после того, как он был обработан основанием. Возможно, потребуется подготовить образец перед его нанесением на колонку; возможно, например, его необходимо разбавить. По меньшей мере, небольшое количество эндотоксина пройдет сквозь колонку, и желательно выбрать буфер для нанесения таким образом, чтобы PSA адсорбировалась полностью, а по меньшей мере, некоторое количество эндотоксина не могло бы адсорбироваться. Примеры буферов для нанесения описаны ниже.

Стадия (iv) данного способа - это стадия промывки, в которой колонку промывают элюирующим буфером с низкой концентрацией ионного соединения. Например, такую начальную стадию промывки можно проводить с помощью буфера, имеющего концентрацию соли, равную 100 мМ или меньше. Как правило, промывочный буфер содержит триэтаноламин и имеет pH около 7,4. На этой начальной стадии могут вымываться низкомолекулярные загрязняющие вещества. На стадии промывки может быть использован по меньшей мере 1, предпочтительно, по меньшей мере, 1,5 объема колонки, рассчитанного из объема колонки с ионообменной смолой. В ходе этой стадии практически вся полисиаловая кислота остается на ионообменной смоле. Может быть проведена более чем одна стадия промывки. Второй промывочный буфер может быть идентичен первому или, в другом варианте, включать спирт и/или поверхностно-активное вещество. Подходящими примерами поверхностно-активных веществ являются неионные вещества, такие как PEG, Tween 20 и 80 и Triton. На

стадиях промывки с колонки может происходить дальнейшее удаление эндотоксина.

Следует отметить, что колонка с ионообменной смолой может иметь диаметр поперечного сечения больший, чем высота, или, как в стандартной колонке, может иметь высоту большую, чем диаметр поперечного сечения. Объем может находиться в пределах от 1 мл до 5000 мл. Высота колонки может варьироваться от 1 см до 5000 см. Площадь поперечного сечения может быть в пределах от 1 см² до 5000 см². Поперечное сечение может иметь любую форму, но предпочтительно - круглую.

После стадии промывки анионообменной смолы PSA элюируют с помощью элюирующего буфера. Элюирующий буфер, используемый на стадии (v), обычно имеет относительно более высокую ионную силу, чем промывочный буфер, с тем чтобы удалить PSA с колонки. Как правило, элюирующий буфер содержит NaCl в концентрации по меньшей мере 0,4 М.

Нами было обнаружено, что предпочтительнее на стадии элюирования в желаемом воплощении использовать по меньшей мере 1,0, предпочтительно, по меньшей мере 1,25, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 1,5 объема колонки соответствующего элюирующего буфера. Желательно использовать не более чем 3 объема колонки элюирующего буфера. Скорость потока для матрицы объемом 75 мл предпочтительно должна быть 7 мл/мин.

Предпочтительное воплощение данного способа может включать более чем одну стадию, например, по меньшей мере 5, например, порядка 20 или, как правило, в пределах от 6 до 12 последовательных стадий элюирования, с помощью элюирующих буферов с последовательно возрастающей ионной силой. Ионная сила в первой из этих основных стадий находится обычно в пределах от 1 мМ до 1 М. Таким образом, элюируемую полисиаловую кислоту можно фракционировать на образцы, имеющие разный средний молекулярный вес.

Предпочтительно изменять ионную силу элюирующего буфера, варьируя содержание соли сильной минеральной кислоты и сильного минерального основания, предпочтительно, хлорида натрия.

После осуществления стадии (v) и получения раствора продукта можно повторить стадии (i) и от (iii) до (v). Предпочтительно, повторяют стадии (iii)-(v).

Можно и далее обрабатывать PSA. Последовательные стадии могут включать дальнейшие стадии очистки и/или концентрирования. С учетом последующих стадий, эти стадии обычно включают шаги, в которых полисахарид освобождают от всех солей, например, с помощью мембран, например мембран для ультрафильтрации. Подобные стадии могут позволить провести дополнительное концентрирование PSAs с получением более высоко концентрированных растворов. Над такими растворами можно проводить дополнительные стадии обработки с помощью мембран, например, ультрафильтрацию или другие стадии фильтрации.

Элюирующий буфер для анионообменной хроматографии может содержать летучую кислоту или основание, и в этом случае дальнейшие стадии могут включать выпаривание летучего основания из элюированных фракций. Хотя возможно извлечь PSA из водных растворов с помощью преципитации, например, применяя осадители для PSAs, предпочтительно, чтобы такие растворители не использовались, поскольку они могут сделать конечное выделение из соответствующих растворителей более сложным. Соответственно, конечный шаг выделения предпочтительно включает выпаривание воды и, предпочтительно, всех остаточных летучих компонентов буфера, оставшихся от стадий элюирования. В предпочтительном варианте, где присутствует триэтаноламин, как катион триэтанолamina, так и ацетат-

анион являются летучими и могут быть легко удалены под вакуумом.

PSA может быть окончательно выделена из раствора путем высушивания, желательного, при пониженном давлении. Это предпочтительно осуществляют с помощью лиофилизации.

5 Преципитация, желательного с использованием осадителя, может осуществляться как стадия, предшествующая фракционированию, с целью удаления части популяции молекул PSA и уменьшения полидисперсности фракций с наибольшим молекулярным весом. Предпочтительно используют дифференциальную преципитацию этанолом.

10 Способ может включать дополнительную стадию либо перед стадией (i), либо между стадиями (i) и (ii), либо после стадии (ii). Это может быть хроматография гидрофобных взаимодействий (hydrophobic interaction chromatography, HIC), аффинная хроматография, например металл-аффинная хроматография (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) или эксклюзионная хроматография (size exclusion chromatography, SEC).

15 Подходящая HIC-колонка должна быть такой, чтобы на ней адсорбировался эндотоксин, но не сорбировалась PSA, например Phenyl FF. Буфером для нанесения обычно является сульфат аммония, хлорид натрия и т.п. в деионизированной воде или же деионизированная вода с рН, доведенной до 7,4.

20 HIC предпочтительно осуществляют перед стадией (i). Фактически, полагают, что здесь HIC впервые была применена для удаления эндотоксина из образца PSA. Удивительно то, что HIC можно использовать для удаления эндотоксина без соудаления полисиаловой кислоты, например, из культурального бульона, т.е. в форме липополисахарида, или, наоборот, например, в случаях, когда материал PSA конъюгируют для того, чтобы сделать его более гидрофобным, чем эндотоксин. Путем подбора соответствующей колонки и условий можно добиться, чтобы эндотоксин адсорбировался на колонке, в то время как PSA выходит, не задерживаясь, или наоборот, либо в мертвом объеме (в буфере для нанесения), либо путем элюирования с помощью подходящего элюирующего буфера. Таким образом, в соответствии со следующим аспектом изобретения, мы представляем новый способ снижения содержания эндотоксина в образце, содержащем полисиаловую кислоту и эндотоксин, включающий пропускание образца через колонку для хроматографии гидрофобных взаимодействий, на которой адсорбируется эндотоксин, в то время как PSA проходит сквозь колонку, и ее собирают, получая конечный раствор полисиаловой кислоты, имеющий сниженное содержание эндотоксина. В соответствии с дальнейшим аспектом изобретения, мы представляем новый способ снижения содержания эндотоксина в образце, содержащем полисиаловую кислоту и эндотоксин, включающий пропускание образца через колонку для хроматографии гидрофобных взаимодействий, на которой адсорбируется материал PSA, причем эндотоксин проходит сквозь колонку, а материал PSA адсорбируется, а затем материал PSA элюируют и собирают, получая конечный раствор полисиаловой кислоты, имеющий сниженное содержание эндотоксина. Предпочтительно использовать фенильную колонку, поскольку фенильные группы связываются с эндотоксином, в то же время обеспечивая прохождение PSA сквозь колонку. В первом воплощении, после прохождения мертвого объема, содержащего эндотоксин, колонку можно промыть промывочным буфером и собрать промывочные фракции, которые тоже могут содержать PSA. Второе воплощение особенно подходит для очистки конъюгатов PSA с белками, например с относительно гидрофобными белками.

50 В способе по изобретению после стадии (ii) могут быть применены средства

аффинной фильтрации. Подбирают аффинные матрицы, которые специфически улавливают эндотоксин. Условия подбирают таким образом, чтобы PSA не адсорбировалась при нанесении раствора. Часто бывает желательным избежать применения эндотоксин-специфичной аффинной хроматографии, чтобы избежать загрязнения продуктами деградации матрицы. Желательно во всех случаях, когда включают подобную стадию, подбирать условия таким образом, чтобы избежать подобной деградации. Несмотря на то, что такие условия могут быть подобраны ценой оптимизации удаления эндотоксина, при комбинации с основными стадиями способа по изобретению, в ходе многостадийной процедуры уровень эндотоксина может быть снижен до приемлемого уровня.

В одном воплощении настоящего изобретения применяется аффинная матрица, включающая иммобилизованный реагент, связывающий эндотоксин, для очистки образца PSA. Подходящим реагентом является гель полимиксина В, особенно Detoxi-Gel™.

В геле Detoxi-Gel™ (гель, удаляющий эндотоксин, Endotoxin Removing Gel) применяется иммобилизованный полимиксин В для связывания и удаления пирогенов из раствора. Полимиксины представляют собой семейство антибиотиков, которые содержат катионный циклопептид с цепочкой жирной кислоты. Полимиксин В нейтрализует биологическую активность эндотоксинов за счет связывания с участком липида А бактериального липополисахарида. Исследования, проведенные Клугером (Kluger et al., 1985), показывают, что полимиксин В инактивирует некоторые, но не все эндотоксины.

Гель с иммобилизованным полимиксином В является стабильной аффинной матрицей, которая устойчива к утечке лиганда в ценный образец. Применение аффинной подложки позволяет осуществить быструю очистку буферов, клеточной культуральной среды, растворов, содержащих макромолекулы (например, белки) и фармакологически значимые компоненты. Гель Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel также был применен для удаления эндотоксина из образцов нуклеиновой кислоты (ДНК) (Wicks et al., 1995).

Как правило, перед применением геля полимиксина В его следует сначала дегазировать. Гели можно регенерировать путем промывки, обычно с помощью детергента, например деоксихолата натрия, с последующей промывкой для удаления детергента. Подходящим агентом для промывки геля является вода, не содержащая пирогенов. После того как гель один раз регенерировали, его упаковывают в колонку и добавляют буфер или воду, не содержащие пирогенов. Время инкубации колонки, как правило, составляет один час. После того как образец собрали, его обычно лиофилизируют для предотвращения бактериальных загрязнений.

Колонка Cellufine™ представляет собой другой тип колонки для аффинной хроматографии, которую можно применять для снижения содержания эндотоксина в образце PSA. Такую колонку обычно уравнивают с помощью 2-8, например, 5 объемами колонки буфера, не содержащего эндотоксина, например буфера HEPES (pH 7,4). HEPES можно применять также в качестве буфера для нанесения. Cellufine является особенно подходящим материалом для применения, поскольку он содержит компонент, связывающий PSA с низкой специфичностью.

Другими коммерчески доступными эндотоксин-селективными колонками для аффинной хроматографии являются колонки EndoTrap. Колонка EndoTrap Red™ также может применяться для снижения содержания эндотоксина в образце PSA. Такую колонку обычно уравнивают с помощью 5-10, например, 5 объемами колонки

буфера, не содержащего эндотоксина, например, с помощью Regeneration Buffer Red™ и 20 мМ буфером HEPES (pH 7,4) или с помощью деионизированной воды (pH 7,4). HEPES или деионизированная вода могут быть также использованы в качестве буфера для нанесения.

5 Колонка EndoTrap Blue™ может применяться для снижения содержания эндотоксина в образце PSA. Такую колонку обычно уравнивают с помощью 5-10, например, 5 объемами колонки деионизированной воды (pH 7,4), содержащей 50-100 мкМ Ca²⁺.

10 По способу согласно первому аспекту изобретения образец можно обрабатывать другими средствами очистки. Например, обработка образца может включать одну или более предварительных стадий инкубации с поверхностно-активным веществом, хелатирующим реагентом, основанием, органическим растворителем, окислителем или пероксидазой перед стадией (i), между стадиями (i) и (ii) или после стадии (ii).

15 Желательно, чтобы поверхностно-активным веществом было анионное поверхностно-активное вещество, например додецилсульфат натрия (SDS). В другом варианте, поверхностно-активным веществом может быть 0,5% Triton X 114 или 1% Triton X 100 или 114. В качестве другого варианта могут быть применены катионные 20 поверхностно-активные вещества, например бактерицидно-активные поверхностно-активные соединения, такие как бромид цетилтриметиламмония. Подходящее время инкубации - 1 час. Подходящие температуры находятся в пределах 0-50°C, хотя предпочтительны температуры в диапазоне 35-37°C.

25 В тех случаях, когда используют неионное поверхностно-активное вещество, раствор наносят на анионообменную колонку для удаления неионных поверхностно-активных веществ. Здесь может быть использован буфер 20 мМ ТЕА.

В одном воплощении настоящего изобретения образец PSA инкубируют в присутствии 1% SDS/ 2 Н NaOH в буфере HEPES в течение 1 часа, а затем раствор 30 наносят на колонку для удаления соли и анионного поверхностно-активного вещества, например колонку GPC, и фракционируют с помощью подходящего буфера, как правило буфера HEPES. Здесь можно использовать колонку pd 10, Sephadex 25.

В другом варианте для снижения содержания эндотоксина в образце PSA можно 35 использовать и другие неионные поверхностно-активные вещества, имеющие точки помутнения, отличные от таковых для Triton, например Tween 20 и Tween 80. Образец PSA инкубируют в 0,1% Tween 80 в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем раствор наносят на анионообменную колонку в подходящем 40 буфере или деионизированной воде (pH 7,4) с целью удаления поверхностно-активных веществ. Колонку тщательно промывают водой и буфером (pH 7,4) для удаления поверхностно-активного вещества.

В своих воплощениях способ включает стадию окисления. Эта стадия проводится с целью окисления концевой фрагмента полисиаловой кислоты, чтобы сделать его 45 реакционно-способным, например, по отношению к белкам или пептидам. В то же время, она может привести к снижению содержания эндотоксина и поэтому может оказаться полезной стадией для достижения общей цели - снижения содержания эндотоксина. Подходящими окислителями являются периодат натрия, супероксид, гипохлорит и пероксидаза.

50 Способ по изобретению может включать применение экстракции, диафильтрационного осаждения и/или обработку сухим жаром перед стадией (i) или после стадии (ii). Если применяют сухую стерилизацию, то, как правило, образец PSA нагревают в ампуле до температуры в интервале 100-200°C, наиболее

предпочтительно, в районе 150°C, в течение 1-6 часов, обычно около 4 часов.

5 Диафильтрацию можно применять сразу после инкубации образца PSA с поверхностно-активным веществом или, в другом варианте, применять независимо от обработки поверхностно-активным веществом. Фильтр должен быть достаточно
10 мелким для того, чтобы задерживать по меньшей мере PSA с наибольшим молекулярным весом, но в то же время пропускать эндотоксин. Типичное устройство для ультрафильтрации с пределом пропускания 5 кДа для глобулярных белков имеет достаточно большие поры, для того чтобы пропускать эндотоксин (~10000 Да), в то же время задерживая PSAs размером ~20000 и выше. Стадию диафильтрации предпочтительно проводить после обработки основанием, например, как часть стадии извлечения (ii).

15 Способ по настоящему изобретению предоставляет PSA с содержанием эндотоксина, сниженным до фармацевтически приемлемых уровней для применения в лечении человека или животных. В идеальном случае содержание эндотоксина в продукте PSA должно быть менее 25 ЭЕ/мг PSA. Предпочтительно, чтобы содержание эндотоксина в PSA было в пределах 0,05-25 ЭЕ/мг.

20 Настоящее изобретение может применяться для получения конъюгатов PSA, имеющих низкое содержание эндотоксина. Желательно, чтобы в конъюгате PSA конъюгируемой частью была биологическая молекула, более предпочтительно - белок. Конъюгаты PSA-белок могут быть получены различными методами (см. подробнее наши предыдущие Заявки на Изобретение WO-A-0187922 и WO 92/22331).
25 Способ согласно первому аспекту изобретения в общем случае не пригоден для конъюгатов PSA с биологическими молекулами, поскольку основание, как правило, разрушает биологическую часть (конъюгата), т.е. никакая конъюгация не должна проводиться перед стадией (i). В четвертом аспекте данного изобретения представлен способ, включающий последовательные стадии:

30 (v) смесь конъюгата PSA и эндотоксина подвергается контакту с неионным поверхностно-активным веществом в течение предварительно определенного времени и при предварительно определенной температуре;

(vi) образец, обработанный поверхностно-активным веществом, пропускают через анионообменную колонку, в ходе чего конъюгат PSA адсорбируется на колонке;

35 (vii) конъюгат PSA элюируют с колонки с помощью элюирующего буфера, чтобы получить раствор конъюгата PSA, имеющий сниженное содержание эндотоксина.

40 Примеры неионных поверхностно-активных веществ, которые можно применять в данном аспекте - это, например, соединения PEG, монолинолеат сорбитана Tween 20/80 или одно из веществ группы Triton. Без ограничения какой-либо теорией предполагается, что поверхностно-активное вещество снижает уровень эндотоксина за счет нарушения образования мицелл эндотоксина или за счет растворения эндотоксина.

45 Продуктом способов согласно четвертому или первому аспекту изобретения может быть фармацевтическая композиция, и в этом случае содержание эндотоксина должно быть достаточно низким для того, чтобы избежать побочных токсических эффектов, когда композицию вводят человеку или животному. Композиция может представлять собой фармацевтическую композицию для людей или животных.

50 Как правило, образцы PSA перед очисткой, т.е. до начала осуществления над образцом стадии (i) первого аспекта или стадии (v) четвертого аспекта, имеют содержание эндотоксина в диапазоне 1000-200 000 ЭЕ/мг. Для того чтобы быть фармацевтически приемлемым, конечное содержание эндотоксина в образце должно

быть не более чем 25 ЭЕ/мг. Предел допустимого содержания эндотоксина зависит от цели, с которой предполагается использовать PSA. Если предполагается использовать PSA для дериватизации белка, предназначенного для применения в качестве лекарства, то предел допустимого содержания эндотоксина варьируется

5 вместе с величиной дозировки белка, предназначенного для применения в качестве лекарства: более высокие дозы обычно требуют более полного удаления эндотоксина.

Для конъюгатов PSA-белок, применяемых в качестве фармацевтической композиции с человеческой (ветеринарной) дозировкой 10-500 мг, содержание

10 эндотоксина должно быть не более чем 0,5 ЭЕ/мг, и желательно находится в пределах 0,05-0,5 ЭЕ/мг. Для конъюгатов PSA-белок с человеческой дозировкой 1-10 мг, содержание эндотоксина должно быть не более чем 5 ЭЕ/мг, и желательно находится в пределах 0,5-5 ЭЕ/мг. Для конъюгатов PSA-белок с человеческой дозировкой до 1000 мкг, содержание эндотоксина должно быть не более чем 25 ЭЕ/мг,

15 и желательно находится в пределах от 5 до 25 ЭЕ/мг.

Образцом по изобретению, содержащим эндотоксин и PSA, может быть культуральный бульон. Культуральный бульон может быть бульоном рекомбинантных или природных PSA-продуцирующих микроорганизмов, продуктом

20 его гидролиза или фракционированным производным любого из вышеназванных материалов. Микроорганизмами могут выступать *E. coli* K1, *Neisseria meningitidis* или *Moraxella liquefaciens*. Как правило, способ согласно первому аспекту изобретения включает предварительную стадию, в которой осуществляют культивирование микроорганизмов с получением культурального бульона. В качестве PSA может быть

25 поли(2,8-связанная сиаловая кислота), поли(2,9-связанная сиаловая кислота) или чередующаяся 2,8-2,9-связанная PSA. Предпочтительно, чтобы PSA являлась коломиновая кислота (CA, colominic acid), или же ее окисленное, восстановленное, аминированное и/или гидразидное производное.

PSA, как правило, имеет по меньшей мере 2, предпочтительно, 5, более

30 предпочтительно - по меньшей мере, 10, например, по меньшей мере 50 сахаридных звеньев. Обычно PSA, имеющие наиболее широкое применение, имеют средний молекулярный вес вплоть до 100 кДа.

PSA может быть получена из любого источника, предпочтительно из природного

35 источника, такого как бактериальный источник, например, *E. coli* K1 или K92, менингококки группы В, или даже коровьего молока или N-CAM. Полимер сиаловой кислоты может быть гетерополимером, таким как группа 135 или группа V N. *meningitidis* или может быть синтезирован, например, энзиматически. PSA может быть

40 блочным сополимером, таким как конъюгат гомо поли(сиаловой кислоты) с блоком другого природного полимера или синтетического полимера. PSA может находиться в форме соли или свободной кислоты. Она может быть в гидролизованной форме, и таким образом, молекулярный вес может быть снижен после извлечения из бактериального источника. PSA в исходном материале, который обрабатывается

45 способом по изобретению, может быть материалом, имеющим широкий диапазон молекулярных весов, например, имеющим полидисперсность более чем 1,3, например, равную 2 или более. Желательно, чтобы полидисперсность молекулярных весов была менее 1,2, более предпочтительно, менее 1,1, например, равная 1,01.

Дериватизация белков и систем доставки лекарственных веществ с помощью

50 очищенной PSA может привести к увеличению времени полужизни, возрастанию стабильности, уменьшению иммуногенности и/или к возможности контролировать растворимость и, соответственно, биологическую доступность и фармакокинетические

свойства, или может повысить растворимость активных компонентов или вязкость растворов, содержащих производные активных компонентов.

Желательно, чтобы PSAs в конечном продукте способов по изобретению и в новых продуктах имели 2-1000 остатков сиаловой кислоты, например, 10-500, более предпочтительно, от 10 до 50 остатков сиаловой кислоты. Желательно, чтобы полидисперсность PSA была менее 2, в идеале менее 1,2, и в идеальном случае в пределах от 1,01 до 1,10.

Методы очистки, применяемые в настоящем изобретении, выгодным образом снижают полидисперсность PSA, в дополнение к снижению содержания эндотоксина.

Содержание эндотоксина в образце PSA снижается в результате применения способа по изобретению по меньшей мере в 5 раз, желательно - по меньшей мере в 10 раз, более предпочтительно - по меньшей мере в 100, 200, 500 раз и в некоторых воплощениях вплоть до 1000, 10000, 100000 или даже 1 миллион раз. Желательно, чтобы обработка основанием и извлечение снижали содержание эндотоксина по меньшей мере в 5 раз. Общее снижение в ходе предварительных стадий и многократных стадий извлечения PSA может быть по меньшей мере 10^5 -кратным. В общем случае комбинация стадий извлечения подбирается таким образом, чтобы снижение содержания эндотоксина было максимальным, в то время как извлечение PSA максимизируется с помощью стадий, которые дополняют друг друга с точки зрения удаления фракции эндотоксина.

В разделе Примеров «Анализ эндотоксина» (тест LAL) описано, как можно измерить уровень эндотоксина.

Примеры

Сравнительный метод определения эндотоксина

Для проведения анализа эндотоксина использовали систему The Endosafe - PTS (Portable Test System, портативная система для анализа), поставляемую Charles River Laboratories. Она основана на тесте LAL (Limulus Amoebocyte Lysate).

Порядок работы с прибором

На ридер вводили всю требуемую информацию. После того, как вся информация по тесту была введена, на дисплее ридера появлялась надпись: «add sample; press enter» («добавьте образец; нажмите ввод»). Подготавливали образцы PSA в концентрации 1 мг/мл (если не указано иное) в 20 mM буфере ТЕА с pH 7,4. С помощью пипетки добавляли по 25 мкл образца во все четыре емкости для образцов и нажимали клавишу ввода на ридере. Под действием насоса образцы из всех четырех емкостей всасывались в канал тестирования, и в течение 15-20 мин происходила генерация результатов. После того как тест был завершен, на дисплее прибора отображалась величина содержания эндотоксина и погрешность определения. Прибор выдавал следующий отчет: Образец - ЭЕ/мл, образец - %CV (коэффициент вариации), пик - ЭЕ/мл, пик - %CV и % выхода пика.

Пример 1 - Снижение уровня эндотоксина с применением гидроксида натрия

Готовили раствор, содержащий 6 мг/мл коломиновой кислоты, загрязненной эндотоксином (31 кДа в неокисленном состоянии), в 0,5 М буфере NaOH Hepes и инкубировали его при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем 0,5 мл раствора наносили на обессаливающую колонку для эксклюзионной хроматографии и собранную фракцию отбрасывали. Далее колонку промывали 2,5 мл буфера HEPES и собирали эту фракцию, а затем собирали 2 мл еще одной фракции в буфере HEPES. Собранные фракции далее анализировали на содержание коломиновой кислоты резорциновым методом. Фракции, содержащие коломиновую кислоту, затем

объединяли и анализировали на содержание эндотоксина. В образцах определяли степень деацетилирования PSA. На Фиг.1 показан результат нативного электрофореза в полиакриламидном геле (Native PAGE) для коломиновой кислоты в буферном растворе 0,5 М NaOH и 1% SDS HEPES.

5 При применении NaOH было получено 53-кратное снижение содержание эндотоксина и не было обнаружено детектируемого деацетилирования. Не наблюдалось также деградации коломиновой кислоты при электрофорезе в полиакриламидном геле (PAGE) с применением NaOH и SDS.

10 Пример 2 - снижение содержания эндотоксина с применением анионного обмена после обработки основанием

Анализировали образец, взятый непосредственно из ферментера с E. coli K1 (1 мг/мл) в 20 мМ буфере ТЕА (рН 7,4), и в нем было обнаружено более чем 10^5 ЭЕ/мг (эндотоксина). Затем к раствору PSA добавляли NaOH до достижения конечной нормальности NaOH в растворе PSA, равной 2Н, после чего инкубировали образец 2 часа при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Отмечали рН раствора. Промывали колонку HiTrap QFF (1 мл) 10 объемами колонки деионизированной воды (рН 7,4), и затем колонку уравнивали 10 объемами колонки 20 мМ буфера ТЕА. Измеряли электропроводность раствора образца и разбавляли последний соответствующим образом 20 мМ буфером ТЕА, так чтобы достичь значения электропроводности буферного раствора. Затем раствор образца наносили на QFF (колонка 1 мл) при скорости 1 мл/мин и отдельно собирали мертвый объем (~1/3 объема колонки). Собирали фракции объемом 1 мл. Затем колонку промывали с помощью 20 мМ ТЕА и собирали промывочные фракции объемом 1 мл каждая. Далее элюировали образец с помощью 1М NaCl в 20 мМ ТЕА и собирали фракции. Проводили резорциновый анализ элюированных фракций, чтобы определить количество коломиновой кислоты, присутствующей в образцах, и определяли концентрацию эндотоксина в пуле элюированных образцов, содержащих коломиновую кислоту. Было обнаружено, что уровень эндотоксина в продукте был снижен до 1407 ЭЕ/мг, т.е. более чем в 71 раз. Выход PSA составил 91%.

30 Обработку основанием и извлечение путем анионного обмена повторили, взяв предыдущий образец, и было обнаружено дальнейшее снижение содержания эндотоксина, вплоть до уровня менее 300 ЭЕ/мг, т.е. дополнительное 5-кратное снижение.

Пример 3 - снижение содержание эндотоксина с применением анионного обмена после обработки неионным поверхностно-активным веществом (Triton X-100)

40 Определяли содержание эндотоксина в исходном образце (1 мг/мл) в 20 мМ буфере ТЕА (рН 7,4). Готовили раствор коломиновой кислоты (35 мг/мл, загрязненной эндотоксином) в 1% Triton X 100 и инкубировали его в течение 2 часов при комнатной температуре. Измеряли рН раствора. Готовили колонку HiTrap QFF, как в Примере 2, и образец подготавливали и наносили, как в Примере 2. Затем колонку промывали с помощью 20 мМ ТЕА и собирали промывочные фракции объемом 1 мл каждая. Далее образец элюировали с помощью 1 М NaCl в 20 мМ ТЕА и собирали фракции. Проводили резорциновый анализ фракций, чтобы определить количество коломиновой кислоты, присутствующей в образцах, и определяли концентрацию эндотоксина в пуле элюированных образцов, содержащих коломиновую кислоту. В то время как загрузка коломиновую кислоту составляла 7,28 мг, уровень эндотоксина исходного материала был снижен от 4023 до 1511 ЭЕ/мг, т.е. примерно в 3 раза. Выход составил 97%.

Пример 4 - снижение содержание эндотоксина с применением неионного поверхностно-активного веществом (Triton X 114) и анионного обмена

5 Готовили 1% раствор Triton X 114 и добавляли его к раствору PSA, полученного из культурального бульона путем стандартного центрифугирования, лизиса, диафильтрации и ультрафильтрации, в соответствующем количестве, так чтобы конечная концентрация Triton X 114 составляла 0,5%, и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. Измеряли pH раствора. Готовили колонку HiTrap QFF, наносили образец, промывали и элюировали, как в Примере 3, и определяли 10 концентрацию эндотоксина в пуле элюированных образцов, содержащих коломиновую кислоту. Исходный уровень эндотоксина, составлявший более чем 10^5 ЭЕ/мг, был снижен до приблизительно $2,3 \times 10^4$ ЭЕ/мг, т.е. примерно в 4 раза.

15 Пример 5 - снижение содержания эндотоксина с применением основания/анионного обмена с последующим применением обработки неионным поверхностно-активным веществом и анионного обмена

Раствор коломиновой кислоты, продукт другого культурального бульона, обрабатывали основанием тем же способом, как в Примере 2, затем подвергали обработке Triton X 114, как описано ниже, и анионному обмену.

20 Готовили 1% раствор Triton X 114 и добавляли его к раствору PSA в соответствующем количестве, так чтобы конечная концентрация Triton X 114 была 0,5%. Раствор становится мутным при комнатной температуре (25°C). Чтобы сделать раствор прозрачным, его выдерживали на льду в течение 10-15 мин. Затем 25 раствор снова выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин, чтобы сделать его мутным. Центрифугировали мутный раствор, в ходе чего он разделялся на два слоя: верхний слой, содержащий PSA, и нижний слой Triton X 114, содержащий эндотоксин. Верхний слой сохраняли для последующего нанесения на колонку QFF. Колонку HiTrap QFF готовили, наносили на нее образец, промывали и элюировали, 30 как в Примере 4.

В этом случае уровень эндотоксина был снижен от более чем 10^5 до приблизительно $4,4 \times 10^3$ ЭЕ/мг на первой стадии обработки основанием и далее до $8,2 \times 10^2$ ЭЕ/мг после второй стадии с применением поверхностно-активного вещества 35 и анионного обмена.

Пример 6 - снижение содержания эндотоксина посредством обработки неионным поверхностно-активным веществом (Tween 80) и анионного обмена

40 Готовили раствор коломиновой кислоты (100 мг/мл, загрязненной эндотоксином; навеска 2,5 г) в 0,1% Tween 80 и доводили pH до 7,4. Раствор инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и разбавляли до 500 мл водой с pH 7,4. Колонку HiTrap QFF (75 мл) промывали 10 объемами колонки (CV, column volume) деионизированной воды (pH 7,4), затем колонку уравнивали с помощью 10 45 объемов колонки воды с pH 7,4. Наносили раствор образца со скоростью 7 мл/мин при комнатной температуре. Нанесенные фракции собирали фракциями по 50 мл в колбы Falcon или другим подходящим способом. Первые 25 мл собирали отдельно, поскольку они соответствовали мертвому объему колонки. Колонку далее промывали с помощью 0,01% Tween 80 в воде с pH 7,4 (7 мл/мин, 4CV) и собирали промывочные 50 фракции по 75 мл или другим подходящим способом. Затем промывали колонку с помощью 150 мМ хлорида натрия в воде с pH 7,4 (7 мл/мин, 8CV) и собирали фракции по 75 мл или другим подходящим способом. Далее элюировали образец с помощью 500 мМ хлорида натрия в воде с pH 7,4 и собирали элюированные фракции по 75 мл или другим подходящим способом. Образцы собирали при комнатной

температуре. Проводили резорциновый анализ элюированных образцов, чтобы определить количество коломиновой кислоты, присутствующей в образцах, и определяли концентрацию эндотоксина в пуле элюированных образцов, содержащих коломиновую кислоту.

5 Пример 7 - удаление эндотоксина с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC)

В качестве буфера для нанесения использовали 2М сульфат аммония в деионизированной воде или деионизированную воду. Растворяли 500 мкг
10 коломиновой кислоты (7 кДа, полученной в Сравнительном Примере 1) в 500 мкл буфера для нанесения и наносили раствор на колонки HIC, указанные в Таблице ниже. Затем инкубировали колонки в течение одного часа. Собирали элюированные образцы и проводили резорциновый анализ для определения количества коломиновой
15 кислоты в элюированных образцах. Объединяли образцы, содержащие коломиновую кислоту, и анализировали содержание в них эндотоксина.

Результаты				
Использованная колонка	Буфер для нанесения	СА (мкг)	Исходное содержание эндотоксина (ЭЕ/мг)	Конечное содержание эндотоксина (ЭЕ/мг)
Butyl FF	2 М (NH ₄) ₂ SO ₄	336,95	3070	211
Phenyl FF	2 М (NH ₄) ₂ SO ₄	353,80	3070	148
Octyl FF	Деионизированная вода	379,49	3070	214

25 Содержание эндотоксина было снижено вплоть до 14 раз. Степень снижения уровня эндотоксина разными колонками уменьшалась в ряду: Phenyl>Butyl≥Octyl.

Пример 8 - удаление эндотоксина с применением анионного поверхностно-активного вещества (додецилсульфат натрия)

30 Готовили раствор коломиновой кислоты (31 кДа, загрязненной эндотоксином) с концентрацией 6 мг/мл в 1% буфере SDS HEPES и инкубировали 1 час при 37°C. Далее 0,5 мл раствора наносили на колонку Pd10 и собранную фракцию отбрасывали. Затем колонку промывали с помощью 2,5 мл буфера HEPES и собирали фракции.
35 После этого проводили элюирование с колонки с помощью 2 мл буфера HEPES. Элюированные фракции собирали и проводили анализ содержания в них коломиновой кислоты резорциновым методом. Затем объединяли фракции, содержащие коломиновую кислоту, и анализировали содержание в них эндотоксина.

Содержание эндотоксина было снижено с более чем 10⁶ ЭЕ/мг до 741,6 ЭЕ/мг.

40 Выход PSA составил 84%.

Сравнительный Пример 1. Фракционирование с применением анионного обмена
Готовили новую предварительно упакованную колонку (1000 мл; Q Sepharose FF, GE Healthcare) и смывали консервант тремя объемами колонки деионизированной воды, а
45 затем тремя объемами колонки промывочного буфера при скорости потока 50 мл/мин. Трубку насоса наполняли стартовым буфером (триэтаноламиновый буфер, рН 7,4; 20 мМ), колонку подсоединяли к насосу и несколько капель буфера наносили в верхнюю часть колонки, чтобы предотвратить попадание воздуха внутрь колонки.
Готовили раствор коломиновой кислоты, полученный из культурального бульона E. coli, загрязненный эндотоксином, в триэтаноламиновом буфере, и рН раствора
50 доводили до 7,4. Затем наносили образец (коломиновая кислота; получена из Marukin, Япония; 750 мл в промывочном буфере) на колонку со скоростью 50 мл/мин с последующей промывкой колонки с помощью 750 мл промывочного буфера. Далее

промывали колонку с помощью 1500 мл промывочного буфера. Связанную коломиновую кислоту элюировали с помощью 1500 мл различных элюирующих буферов от 100 мМ NaCl до 475 мМ NaCl, собирая смывые фракции от каждого прогона и помещая их в соответствующие контейнеры. Всю оставшуюся коломиновую кислоту и другие остаточные вещества удаляли с помощью 1500 мл 1 М NaCl и собирали смывые фракции. Затем колонку регенерировали тремя объемами промывочного буфера. Колонку далее хранили в 20% этаноле при комнатной температуре. Длинноцепочечные образцы (снятые элюентом с высокой концентрацией соли) концентрировали до минимального объема в 250 мл концентраторов (Vivacell, Vivascience) при давлении 4 бар и 4°C. Концентраты промывали четыре раза дистиллированной водой (с рН 7,4 доведенной с помощью NaOH). Короткоцепочечные образцы также концентрировали в 50 мл концентраторов (Vivaflow, Vivascience) под давлением, при 4°C. Концентрат промывали четыре раза дистиллированной водой. Анализировали содержание в образцах коломиновой кислоты резорциновым методом. Затем определяли в образцах содержание эндотоксина.

Результаты показали, что уровень эндотоксина был снижен с величины $1,6 \times 10^5$ ЭЕ/мг до 3070 ЭЕ/мг. Это явилось почти 5-кратным снижением содержания эндотоксина.

Сравнительный Пример 2 - аффинная хроматография - очистка с помощью колонки Detoxi gel

Регенерировали колонки Detoxi gel с помощью растворов, не содержащих пирогены, чтобы предотвратить любое попадание эндотоксина в образец. Все растворы были дегазированы перед нанесением на колонку, чтобы предотвратить попадание в колонку пузырьков воздуха и снижение скорости потока. Гель Detoxi-gel endotoxin removing gel можно использовать по меньшей мере 10 раз без потери активности. Температура всех растворов и гелей перед использованием была доведена до комнатной.

Проводили дегазацию гелей, помещая суспензию в верхнюю часть колбы с отсасывающим фильтром, оснащенную магнитной мешалкой. Во время перемешивания суспензии подключали отсасывающее устройство для создания вакуума внутри колбы. Гель дегазировали в течение примерно 15 мин. Дегазированной суспензией упаковывали колонки подходящего размера и оставляли на 30 мин для осаждения геля. Регенерировали гели промыванием с помощью пяти объемов колонки 1% деоксихолата натрия с последующими 3-5 объемами колонки воды, не содержащей пирогенов, для удаления избытка. Гели регенерировали перед каждым применением одним и тем же способом. Затем на колонку наносили образец. Добавляли аликвоты буфера или воды, не содержащие пирогены, и собирали выходящие фракции. Образец выходил из колонки после того, как был завершен сбор мертвого объема колонки (94% от объема наполнителя). Для большей эффективности надевали нижнюю и верхнюю крышки после того, как образец входил в гель. Колонку инкубировали по меньшей мере один час и последовательно снимали верхнюю и нижнюю крышки. Затем добавляли буфер или воду, не содержащие пирогены, чтобы собрать образцы. Во всех этих экспериментах были предприняты меры предосторожности, чтобы предотвратить загрязнение образца за счет пыли или стеклянной посуды сразу после удаления эндотоксина. Затем образцы замораживали и хранили. Колонки регенерировали тем же способом, как описано выше, чтобы удалить весь связанный эндотоксин, и затем хранили в 25% этаноле при 2-8°C.

В первом примере образец является продуктом, полученным способом, раскрытым в Примере 3 WO 2008/012525, коломиновой кислоты, фракционированной способом, описанным в WO 2006/016161, конъюгированной с GCSF. Уровень эндотоксина в конъюгате до обработки с помощью аффинного геля составлял 438 ЭЕ/мг, а после обработки уровень был снижен до 10,5 ЭЕ/мг. Содержание эндотоксина в конъюгатах PSA-белок было снижено вплоть до 35 раз в результате применения этого вида аффинной хроматографии.

Во втором примере образцом являлась неразбавленная СА, использованная в следующих условиях:

Композиция	PSA (мг/мл) [резорциновый анализ]	Количество PSA (мг)	Объем	РН
PSA 19,3 кДа (Marukin)	0,1749	0,1547 В буфере Hepes (20 мМ Hepes, 150 мМ NaCl; pH 7,4)	0,9 мл	7,4

Содержание эндотоксина было снижено до 4,2 ЭЕ/мг с исходной величины 16000 ЭЕ/мг. Выход составил более 90%.

В третьем иллюстративном примере исходным материалом являлся раствор, полученный в Сравнительном Примере 1, при следующих условиях. Результаты приведены ниже:

Композиция	PSA (мг/мл) [резорциновый анализ]	Количество PSA (мг)	Объем	Содержание эндотоксина (ЭЕ/мг)
СА 7 кДа	0,374	1,84	5 мл	66,04
СА 7 кДа	0,160	0,8	5 мл	178,75

Исходное содержание эндотоксина в образце было 3070 ЭЕ/мг. Снижение содержания было вплоть до 47 раз.

Заключение

Эндотоксин-специфичная аффинная хроматография может быть использована для удаления эндотоксина из полисиаловой кислоты и ее конъюгатов, т.е. мы показали, что можно подобрать условия, при которых эндотоксин связывается с колонкой, в то время как PSA не связывается, но может быть получена в удобной форме и с очень низким уровнем эндотоксина. Таким образом, эта стадия может быть полезной для обработки продуктов PSA, полученных в результате обработки основанием (или поверхностно-активным веществом).

Сравнительный Пример 3 - удаление эндотоксина с помощью аффинной колонки (Cellufine)

Этот Пример подобен Сравнительному Примеру 2, но здесь применяется другая аффинная колонка, удаляющая эндотоксин. Колонку Cellufine ET clean (S beads) регенерировали промыванием 5 объемами колонки 0,2 М NaOH, 2М NaCl, а затем воды, не содержащей пирогены. Затем колонку уравнивали 5 объемами колонки подходящего буфера, не содержащего эндотоксин (буфер HEPES). Далее наносили на колонку раствор коломиновой кислоты в буфере HEPES (1 мг/мл), полученный в Сравнительном Примере 1, при скорости потока 0,1-0,2 мл/мин при 21°C. Общее нанесенное количество составило 218 мкг. Затем колонку инкубировали в течение одного часа, после чего собирали фракции, элюированные буфером HEPES.

Проводили резорциновый анализ элюированных проб для определения количества коломиновой кислоты, присутствующей в образцах, и определяли содержание эндотоксина в пуле элюированных образцов, содержащих коломиновую кислоту. Уровень эндотоксина был снижен с 3070 до 75 ЭЕ/мг, т.е. примерно в 40 раз.

Этот способ повторяли, используя конъюгат GCSF-PSA, который применялся в качестве исходного материала в Сравнительном Примере 2, часть 1, с уменьшением уровня эндотоксина от 438 до 12,4 ЭЕ/мг.

Мы делаем вывод, что колонку Cellufine можно применять для удаления эндотоксина из PSA.

Сравнительный Пример 4 - удаление эндотоксина с помощью аффинной колонки (EndoTrap Red)

В этом способе применяется еще одна аффинная колонка для адсорбции эндотоксина. Колонку Endotrap Red регенерировали и уравнивали с помощью деионизированной воды с рН 7,4. Готовили 10 мл раствора коломиновой кислоты (50 мг/мл), загрязненной эндотоксином. Устанавливали две последовательные колонки. Раствор образца наносили на колонку и собирали мертвый объем (~1/3 объема колонки). Затем собирали оставшийся нанесенный раствор. Далее промывали колонку 6 объемами колонки деионизированной воды рН 7,4 и собирали фракции по 1 мл каждая. Проводили резорциновый анализ для всех фракций, чтобы определить количество присутствующей коломиновой кислоты, и определяли содержание эндотоксина в образцах, содержащих коломиновую кислоту.

Данные для 16 кДа коломиновой кислоты показали снижение уровня эндотоксина с 564 до 6 ЭЕ/мг, примерно 90-кратное снижение.

Этот способ применяли также для загрязненного эндотоксином конъюгата инсулин-PSA, полученного способом, описанным в WO 2008/012528. Содержание эндотоксина было снижено с 111 до 12,5 ЭЕ/мг, 9-кратное снижение.

Эти примеры показывают, что может применяться еще одна колонка для удаления эндотоксина из PSA и ее конъюгатов.

Сравнительный Пример 5 - Удаление эндотоксина посредством аффинной колонки с помощью буфера HEPES

Колонку Endotrap Red (объем колонки 1 мл) регенерировали с помощью буфера для регенерации Buffer Red, поставляемого вместе с колонкой. Затем уравнивали колонку с помощью 5 объемов колонки подходящего буфера 20 мМ HEPES, не содержащего эндотоксина. Затем раствор загрязненной эндотоксином PSA в буфере HEPES (750 мкг/мл) наносили на колонку при скорости потока 0,1-0,2 мл/мин при 21°C. Затем проводили элюирование с колонки с помощью 0,3 мл 20 мМ буфера HEPES. Проводили резорцин/белковый анализ элюированных образцов, чтобы определить количество коломиновой кислоты, присутствующей в образцах, и определяли содержание эндотоксина в пуле элюированных образцов, содержащих коломиновую кислоту. Результаты показали, что уровень эндотоксина может быть снижен примерно в 2-7 раз, и это зависит от используемой величины загрузки PSA (более низкие загрузки колонки приводят к лучшему снижению) при таких уровнях загрузки, при которых достигается 100% выход PSA.

Сравнительный Пример 6 - удаление эндотоксина, белков, ДНК и клеточных остатков с помощью анионообменной колонки с использованием 30% IPA

Путем центрифугирования, снятия супернатанта, диафильтрации и ультрафильтрации готовили культуральный бульон с концентрацией коломиновой кислоты 35 мг/мл и измеряли его рН. Промывали колонку HiTrap QFF 10 объемами колонки деионизированной воды (рН 7,4) и уравнивали колонку с помощью 10 объемов колонки 20 мМ ТЕА. Измеряли электропроводность раствора образца и разбавляли его 20 мМ буфером ТЕА таким образом, чтобы достичь значения электропроводности буферного раствора. Затем наносили раствор образца со

скоростью 1 мл/мин, фракции собирали отдельно. Затем собирали 1 мл фракций. Далее промывали колонку с помощью 30% IPA и собирали промывочные фракции по 1 мл каждая. Затем элюировали образец с помощью 1 М NaCl в 20 мМ ТЕА и собирали фракции. Проводили резорциновый анализ элюированных образцов, чтобы
 5 определить количество коломиновой кислоты, присутствующей в образцах, и определяли содержание эндотоксина в пуле элюированных образцов, содержащих коломиновую кислоту. Исходное содержание эндотоксина в экстракте бульона было $3,2 \times 10^4$ ЭЕ/мг, а конечное содержание - $1,8 \times 10^3$ ЭЕ/мг, т.е. содержание
 10 эндотоксина было снижено в 18 раз.

Источники информации

Bishop, R.E., In Russell W, Herwald H (eds) Concepts in Bacterial Virulence: Contrib Microbiol Basel, Karger, 12 (2005) 1-27.

15 Bendele, A., Seely, J., Richey, C, Sennello, G., Shopp, G., Renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol conjugated proteins, Toxicological sciences, 42 (1998) 152-157.

Beranova, M., Wasserbauer, R., Vancurova, D., Stifter, M., Ocenaskova, J., Mora, M., Biomaterials, 11 (2000) 521-524.

20 Cheng T, Wu, M., Wu, P., Chern, J, Roffer, SR., Accelerated clearance of polyethylene glycol modified proteins by anti-polyethylene glycol IgM. Bioconjugate chemistry, 10 (1999) 520-528.

Christ WJ, Asano O, Robidoux AL, Perez M, Wang YA, Dubuc GR, Gavin WE, Hawkins LD, McGuinness PD, Mullarkey MA, Lewis MD, Kishi Y, Kawata T, Bristol JR, Rose JR, Rossignol
 25 DP, Kobayashi S, Hishinuma L, Kimura A, Asakawa N, Katayama K, Yamatsu I: E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency. Science, 268 (1995) 80-83.

30 Convers, C.D., Lej3Ene, L., Shum, K., Gilbert, C., Shorr, R.G.L, Physiological effect of polyethylene glycol conjugation on stroma-free bovine hemoglobin in the conscious dog after partial exchange transfusion, Artificial organ, 21 (1997) 369-378.

Gregoriadis, G, Spotlight: Lipoxen pie The Drug and Vaccine Delivery Company. Controlled release society newsletter, 23(2) (2006) 9-10.

35 Hreczuk-Hirst, D., Jain, S., Genkin, D., Laing, P., Gregoriadis, G., Preparation and properties of polysialylated interferon- α -2b, AAPS Annual Meeting, 2002, Toronto, Canada, M1056 Hunter, A.C, Moghimi, S.M., Therap3Etic synthetic polymers: a game of Russian Roulette. Drug Discovery Today, 7 (2002) 998-1001.

40 Jain, S., Hirst, D.H., McCormack, B., Mital, M., Epenetos, A., Laing, P., Gregoriadis, G., Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo, Biochemica et. Biophysica Acta, 1622 (2003) 42-49.

Jain, S., Hirst, D.H., Laing, P., Gregoriadis, G., Polysialylation: The natural way to improve the stability and pharmacokinetics of protein and peptide drugs, Drug Delivery Systems and Sciences, 4 (2) (2004) 3-9.

45 Jennings, H.J., Lugowski, C, Immunogenicity of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugates, Journal of Immunology, 127 (1981)1011-1018.

Kluger, MJ., et. al., (1985). Polymyxin B use does not ensure endotoxin-free solution. J.Immunol. Meth. 83: 201-7.

50 Moe, D. and Granoff, G Infect. Immun. 2005, 73(4) 2123-2128 Muklenhoff et. al., (1988) Curr. Opin. Struct. Bio. 8, 558-564

Roth, J., Rutishauser, U., Troy, F.A. (Eds.), Polysialic acid: from microbes to man, BirkhauserVerlag, Basel, Advances in Life Sciences, 1993.

Wicks, I.P., et.al. (1995). Bacterial lipopolysaccharide copurifies with plasmid DNA:

Implications for animal and human gene therapy. Human Gene Therapy 6: 317-23.

Формула изобретения

- 5 1. Способ снижения содержания эндотоксина в образце, содержащем полисиаловую кислоту и эндотоксин, включающий следующие стадии:
- (i) добавление к образцу основания, имеющего рКа по меньшей мере 12, чтобы получить основной раствор, имеющий рН по меньшей мере 12; инкубацию раствора в течение предварительно определенного времени при предварительно определенной
- 10 температуре; и
- (ii) извлечение полисиаловой кислоты, имеющей сниженное содержание эндотоксина.
2. Способ согласно п.1, где основание имеет рКа по меньшей мере 13.
3. Способ согласно п.1 или 2, где рН указанного основного раствора составляет по
- 15 меньшей мере 13.
4. Способ согласно п.1, где основанием является NaOH, KOH, Ca(OH)₂ или LiOH.
5. Способ согласно п.4, где основанием является 2н NaOH.
6. Способ согласно п.1, где указанное предварительно определенное время
- 20 находится в пределах от 5 мин до 24 ч, и где предварительно определенная температура находится в пределах от 0°C до 60°C.
7. Способ по любому из пп.1, 2 или 4-6, где указанное предварительно определенное время находится в пределах от от 30 мин до 6 ч.
8. Способ согласно п.1, в котором стадия (ii) включает нижеуказанные
- 25 последовательные подстадии:
- (iii) пропускание образца через анионообменную колонку, в ходе чего полисиаловая кислота адсорбируется на ионообменной смоле;
- (iv) промывание колонки с помощью одного промывочного буфера, в результате
- 30 чего полисиаловая кислота остается адсорбированной на ионообменной смоле; и
- (v) элюирование полисиаловой кислоты с колонки с помощью элюирующего буфера, с тем чтобы получить конечный раствор полисиаловой кислоты, имеющий сниженное содержание эндотоксина.
9. Способ согласно п.8, где образец после стадии (i) нейтрализуют перед стадией (ii).
- 35 10. Способ согласно п.8 или 9, где на стадии (iv) колонку промывают на первой стадии с помощью первого промывочного буфера с низкой ионной силой, с тем чтобы элюировать с колонки эндотоксин, и где элюирующий буфер, используемый на
- стадии (v), имеет относительно более высокую ионную силу.
- 40 11. Способ согласно п.10, где указанный промывочный буфер и/или указанный элюирующий буфер содержит летучее основание.
12. Способ согласно п.8, где на стадии (iv) колонку промывают более чем один раз.
13. Способ согласно п.12, при котором колонку промывают вторым промывочным буфером, который включает NaCl в концентрации по меньшей мере 0,2 М.
- 45 14. Способ согласно п.8, где стадии (i) и от (iii) до (v) повторяют над конечным раствором.
15. Способ согласно п.1, включающий по меньшей мере одну дополнительную стадию, в которой уровень эндотоксина в полисиаловой кислоте снижается в ходе очистки, которую проводят перед стадией (i), или между стадиями (i) и (ii), или после
- 50 стадии (ii), и которая представляет собой ионообменную хроматографию, или хроматографию гидрофобных взаимодействий, или аффинную хроматографию, или эксклюзионную хроматографию или их комбинации.

16. Способ согласно п.15, где перед стадией (i) проводят хроматографию гидрофобных взаимодействий.

17. Способ согласно п.1, где образец полисиаловой кислоты перед стадией (i), или между стадиями (i) и (ii), или после стадии (ii) инкубируют с поверхностно-активным веществом, хелатирующим реагентом, органическим растворителем, окислителем или пероксидазой.

18. Способ согласно п.1, включающий предварительную стадию, в ходе которой культивируют *E.coli* с получением культурального бульона, содержащего полисиаловую кислоту и эндотоксин, возможно включающий промежуточные стадии по удалению белка, липидов, нуклеиновых кислот и/или питательных веществ, для получения указанного образца.

19. Способ согласно п.1, где содержание эндотоксина в полисиаловой кислоте (PSA) в конечном растворе не превышает 1407 ЭЕ/мг PSA согласно измерениям с помощью теста LAL.

20. Способ по п.1, где образец содержит полисиаловую кислоту в форме конъюгата с белком и эндотоксин.

21. Способ по п.8, где сниженное содержание эндотоксина составляет не более 300 ЭЕ/мг.

22. Образец культурального бульона, содержащий эндотоксин, где содержание эндотоксина снижено способом согласно любому из пп.1-20.

23. Образец полисиаловой кислоты (PSA), содержащий эндотоксин, где содержание эндотоксина является приемлемым для введения человеку или животным, предпочтительно не более чем 1407 ЭЕ/мг PSA, согласно измерениям с помощью теста LAL, полученный способом согласно любому из пп.1-21.

24. Образец согласно п.23, имеющий содержание эндотоксина не более чем 300 ЭЕ/мг PSA.

25. Образец согласно п.23 или 24, в котором PSA представляет собой поли(2,8-связанную сиаловую кислоту), поли(2,9-связанную сиаловую кислоту) или чередующуюся 2,8-2,9-связанную полисиаловую кислоту.

26. Образец согласно п.25, где PSA представляет собой коломиновую кислоту (CA) или окисленное, восстановленное, аминированное и/или гидразидное ее производное.