



(51) МПК

C07K 1/20 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/363 (2013.01); C07K 1/22 (2013.01); C07K 1/18 (2013.01); A61K 38/36 (2013.01); C07K 14/75 (2013.01); C07K 14/745 (2013.01); C07K 1/20 (2013.01); C07K 14/755 (2013.01)

(21) (22) Заявка: 2015126551, 05.12.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.12.2013

Дата регистрации:
23.04.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

05.12.2012 US 61/733,761;

04.02.2013 EP 13153898.5;

14.03.2013 US 13/803,740;

10.04.2013 AU 2013203357

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2017 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 23.04.2019 Бюл. № 12

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 06.07.2015

(86) Заявка РСТ:
AU 2013/001414 (05.12.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/085861 (12.06.2014)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ПХАМ Хунг (AU),
ХЕЙ Джеффри Майкл (AU),
НГУИ Даррен (AU)

(73) Патентообладатель(и):

ЦСЛ БЕРИНГ ГМБХ (DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20050197493 A1, от 24.02.2004.

Jennissen H.P., Demiroglou A. Interaction of
fibrinogen with n-alkylagaroses and its
purification by critical hydrophobicity
hydrophobic interaction chromatography.
Journal of Chromatography A. - 2006. - Vol.
1109. - n. 2. - P. 197-213. US7211650 B2,
24.09.1998. Cooper A.V., Standeven K.F.,
Ariëns R.A.S. (см. прод.)

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ЛЕЧЕБНЫХ БЕЛКОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ снижения уровня по меньшей мере одного белка, выбранного из группы, состоящей из плазминогена и тканевого активатора плазминогена в растворе, содержащем фибриноген. Способ включает пропускание криопреципитата плазмы человека, содержащего фибриноген, через смолу для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда

в условиях, при которых плазминоген и тканевый активатор плазминогена связывается со смолой, и выделение раствора криопреципитата, содержащего фибриноген, который проходит через смолу. Смола для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда мола представляет собой смолу НЕА или РРА. Концентрация по меньшей мере одного белка, выбранного из группы, состоящей из

плазминогена и тканевого активатора
плазминогена, в растворе уменьшается по
меньшей мере на 50% по сравнению с исходным

веществом. 2 н. и 16 з.п. ф-лы, 8 ил., 6 табл., 10
пр.

(56) (продолжение):

Fibrinogen gamma-chain splice variant γ' alters fibrin formation and structure. Blood. - 2003. - Vol. 102. - н. 2. - Р. 535-540. RU 2458067 C2, 10.08.2012.

R U 2 6 8 5 9 5 6 C 2

R U 2 6 8 5 9 5 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(19) **RU** (11)

2 685 956⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.

C07K 1/20 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

(52) CPC

A61K 38/363 (2013.01); *C07K 1/22* (2013.01); *C07K 1/18* (2013.01); *A61K 38/36* (2013.01); *C07K 14/75* (2013.01); *C07K 14/745* (2013.01); *C07K 1/20* (2013.01); *C07K 14/755* (2013.01)

(21) (22) Application: **2015126551, 05.12.2013**

(24) Effective date for property rights:
05.12.2013

Registration date:
23.04.2019

Priority:

(30) Convention priority:
05.12.2012 US 61/733,761;
04.02.2013 EP 13153898.5;
14.03.2013 US 13/803,740;
10.04.2013 AU 2013203357

(43) Application published: **10.01.2017 Bull. № 1**

(45) Date of publication: **23.04.2019 Bull. № 12**

(85) Commencement of national phase: **06.07.2015**

(86) PCT application:
AU 2013/001414 (05.12.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/085861 (12.06.2014)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

PKHAM Khung (AU),
KHEJ Dzheffri Majkl (AU),
NGUI Darren (AU)

(73) Proprietor(s):

TSSL BERING GMBKH (DE)

(54) **METHOD OF PURIFYING THERAPEUTIC PROTEINS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: disclosed is a method for reducing the level of at least one protein selected from a group consisting of plasminogen and tissue plasminogen activator in a solution containing fibrinogen. Method comprises passing human cryoprecipitate plasma containing fibrinogen through a resin for hydrophobic chromatography with charge induction in conditions, in which plasminogen and the tissue plasminogen activator binds to the resin, and recovering a

cryoprecipitate solution containing fibrinogen which passes through the resin. Resin for hydrophobic chromatography with induction of molar charge is HEA or PPA resin.

EFFECT: concentration of at least one protein selected from a group consisting of plasminogen and tissue plasminogen activator in the solution is reduced by at least 50 % compared to the initial substance.

18 cl, 8 dwg, 6 tbl, 10 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к способу снижения уровня примесей в растворе, содержащем, по меньшей мере, один лечебный белок, и к полученным растворам, содержащим лечебный белок. В частности, настоящее изобретение относится к способу снижения уровня плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в исходном соединении, включающем фибриноген, и/или фактор VIII, и/или фактор фон Виллебранда (VWF). Настоящее изобретение в целом также относится к растворам и фармацевтическим композициям, содержащим фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, которые выделены с помощью подобных методов, а также к их применению.

Уровень техники

Современные методы очистки природного или рекомбинантного лечебного белка из раствора, содержащего указанный белок, обычно переносят, по меньшей мере, некоторые примеси в конечный препарат. В определенных случаях присутствие примесей, таких как протеазы, дестабилизирует лечебный белок в растворе, в частности, во время хранения. По указанной причине многие лечебные белки хранятся в виде лиофилизированных или замороженных препаратов.

В то время как дестабилизирующие уровни примесей могут повлиять на многие из различных типов лечебных белков, они, в частности, касаются лечебных белков, которые используются для поддержания гемостаза. Гемостаз является важным физиологическим процессом, который предотвращает кровотечение после возникновения повреждения (например, разрыва) кровеносных сосудов. Существуют три основных механизма, которые способствуют гемостазу: (i) сужение сосудов, (ii) агрегация тромбоцитов в месте разрыва и (iii) коагуляция. Во время коагуляции поврежденные эндотелиальные клетки высвобождают тканевой фактор (фактор III), который, в свою очередь, активирует фактор VII с помощью Ca^{2+} . Фактор XII, который высвобождается активированными тромбоцитами, активирует фактор XI. Активированный фактор VII и фактор XI способствуют протеканию каскада ферментативных реакций, которые ведут к активации фактора X. Активный фактор X (фактор Xa) вместе с фактором III, фактором V, Ca^{2+} и тромбопластическим фактором тромбоцитов (PF_3) активируют активатор протромбина. Активатор протромбина превращает протромбин в тромбин, который превращает фибриноген (фактор I) в фибрин, образующий исходную сетку поверх места повреждения. Исходная сетка под действием фактора XIII затем превращается в плотный фибриновый сгусток, который герметизирует разрыв до тех пор, пока место не будет отремонтировано. Во время протекания каскада реакций свертывания крови тромбин активирует также фактор VIII, прокофактор гликопротеина, который в кровотоке в основном существует в виде комплекса с фактором фон Виллебранда (VWF). Фактор VIII взаимодействует с фактором IXa, вызывая активацию фактора X в присутствии ионов Ca^{2+} и фосфолипидов.

Недостаточность содержания любого одного или нескольких белков, участвующих в коагуляции, в том числе фибриногена, фактора VIII и/или фактора фон Виллебранда (VWF), как врожденная, так и приобретенная, может привести к недостаточной свертываемости крови и риску кровотечения. Современные варианты лечения ограничены введением фармацевтических препаратов из одного или нескольких лечебных белков с целью восстановить эндогенные уровни указанных белков и поддержать гемостаз. Тем не менее, существующие фармацевтические препараты, которые, как правило, получают из донорской плазмы крови или рекомбинантного

источника, включают проферменты и протеазы (в частности, протромбин, плазминоген, тканевой активатор плазминогена (tPA) и/или другие протеазы), которые могут дестабилизировать лечебные белки, такие как фибриноген, фактор VIII или VWF, при хранении. Как следствие, подобные препараты относительно нестабильны в водном растворе, а длительное хранение ограничивается лиофилизированными или замороженными препаратами.

Для клинических применений фибриноген обычно выделяют и очищают из плазмы человека, где он составляет лишь приблизительно 2-5% (1,5-4,0 г/л) от общего количества белков плазмы. Традиционно очистку фибриногена из плазмы осуществляют классическим способом фракционирования плазмы, при этом фибриноген осаждают при низкой температуре из плазмы с последующим осаждением любым реагентом, выбранным из этанола, сульфата аммония, β -аланина/глицина, полимеров (например, полиэтиленгликоля) или из растворов с низкой ионной силой. Подобные способы позволяют достичь относительно высокого выхода и однородности. Если требуется более высокий уровень чистоты, часто используются хроматографические методы. Тем не менее, существующие способы осаждения и хроматографические методы, позволяющие осуществить процессы получения в промышленном масштабе, обычно приводят к получению препаратов фибриногена, которые содержат примесные белки, такие как проферменты или протеазы (в частности, протромбин, тканевой активатор плазминогена (tPA) и плазминоген), которые могут дестабилизировать фибриноген в растворе. Например, когда присутствует протромбин, он может быть активирован в серинпротеазу тромбин, который, в свою очередь, преобразует фибриноген в фибрин. Аналогично, когда присутствуют и tPA, и плазминоген, то tPA может активировать плазминоген в активную форму плазмина, который, в свою очередь, гидролизует фибриноген в фибрин. Как следствие, препараты фибриногена относительно нестабильны в водном растворе, а длительное хранение ограничивается лиофилизированными или замороженными препаратами.

Конкретные загрязняющие вещества могут быть удалены путем абсорбции; например, фибронектин может быть иммобилизован на желатине, а плазминоген может быть иммобилизован на лизине (Vuento et al. 1979, Biochem. J., 183(2):331-337). Однако использование обладающих специфическим сродством смол трудно осуществить в крупномасштабных коммерческих процессах. Причина этого заключается в том, что аффинные смолы сами по себе не являются достаточно прочными, чтобы их можно было использовать многократно, и вносят значительный вклад в увеличение как времени обработки, так и затрат.

EP 1240200 (US 6960463) относится к способам очистки фибриногена из содержащего фибриноген раствора с помощью ионообменной (IEX) хроматографии. В частности, способ включает нанесение содержащего фибриноген раствора на ионообменную матрицу в условиях, которые позволяют фибриногену связаться с матрицей, а затем провести промывку ионообменной матрицы с помощью раствора, содержащего, по меньшей мере, одну омега-аминокислоту. Это делается с целью облегчить дифференцированное удаление плазминогена из смолы. Фибриноген, который связан с матрицей, затем элюируют из матрицы.

В WO 2012038410 предлагается способ очистки фибриногена с использованием анионообменных смол, которые содержат гидроксилсодержащий полимерный носитель с привитыми третичными или четвертичными аминами, которые связывают фибриноген.

EP 1519944 описывает использование иммобилизованной металло-ионной матрицы для аффинной хроматографии в условиях, в которых фибриноген и плазминоген

связываются с матрицей, и селективное элюирование фибриногена и плазминогена по отдельности таким образом, что основная фракция фибриногена содержит приблизительно 600 нг плазминогена на мг белка.

В настоящем изобретении предлагается способ снижения уровня плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в растворе, содержащем фибриноген, и/или фактор VIII и/или VWF. Очищенный(ые) белок(белки) стабильны при хранении в виде жидких препаратов и могут быть использованы для клинических или ветеринарных целей, в том числе для лечения или предотвращения состояний, связанных с недостаточностью уровня указанного(ых) белка(ов).

10 Сущность изобретения

В соответствии с одним аспектом в настоящем изобретении предлагается способ снижения уровня, по меньшей мере, одного белка, выбранного из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, в растворе, содержащем, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и фактора фон Виллебранда (VWF), при этом указанный способ включает:

(i) пропускание исходного вещества, включающего, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, через смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом в условиях, выбранных таким образом, что, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, которая включает плазминоген, тканевой активатор плазминогена и другие протеазы, присутствующий в исходном веществе, связывается со смолой; и

(ii) выделение раствора, содержащего, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, которая включает фибриноген, фактор VIII и VWF, который проходит через смолу, при этом концентрация, по меньшей мере, одного из белков, выбранных из группы, которая включает плазминоген, тканевой активатор плазминогена и другие протеазы, в растворе уменьшается, по меньшей мере, на 50% по сравнению с исходным веществом.

В соответствии с другим аспектом в настоящем изобретении предлагается способ снижения уровня, по меньшей мере, одного белка, выбранного из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, в растворе, содержащем, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и фактора фон Виллебранда (VWF), при этом указанный способ включает:

(i) пропускание исходного вещества, содержащего, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

(ii) выделение раствора, содержащего, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, который проходит через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

(iii) пропускание раствора, который извлекают на стадии (ii), через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом; и

(iv) выделение раствора, содержащего, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, который проходит через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом,

где условия проведения стадий хроматографии таковы, что, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, присутствующий в исходном веществе, связывается с

первой и/или второй смолой, и где концентрация, по меньшей мере, одного белка, выбранного из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, в растворе, который выделяют на стадии (iv), уменьшается, по меньшей мере, на 50% по сравнению с исходным веществом.

5 В соответствии с другим аспектом предлагается раствор, содержащий, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, выделенный по способу настоящего изобретения, как указано в данном описании.

В соответствии с другим аспектом предлагается сосуд, содержащий, по меньшей мере, 5 мл стабильного фармацевтически приемлемого раствора фибриногена, где
10 концентрация фибриногена составляет, по меньшей мере, 20 мг/мл.

В соответствии с другим аспектом предлагается фармацевтический препарат, представляющий собой раствор, содержащий, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, извлеченный по способу настоящего изобретения, как указано в данном описании, и фармацевтически
15 приемлемый носитель.

В соответствии с другим аспектом в настоящем изобретении предлагается раствор, содержащий:

(a) по меньшей мере, 75% фибриногена от общего количества белка;

(b) менее чем 50 пг/мг тканевого активатора плазминогена от общего количества
20 белка; и/или

(c) менее чем 1 мкг/мг плазминогена от общего количества белка.

В соответствии с другим аспектом в настоящем изобретении предлагается раствор, содержащий:

(a) по меньшей мере, 90% фибриногена от общего количества белка;

25 (b) менее чем 50 пг/мг тканевого активатора плазминогена от общего количества белка; и/или

(c) менее чем 150 нг/мг плазминогена от общего количества белка.

В соответствии с другим аспектом в настоящем изобретении предлагается раствор, содержащий:

30 (a) по меньшей мере, 90% фибриногена от общего количества белка;

(b) менее чем 20 пг/мг тканевого активатора плазминогена от общего количества белка; и/или

(c) менее чем 10 нг/мг плазминогена от общего количества белка.

В соответствии с другим аспектом предлагается способ лечения или предотвращения
35 состояния, связанного с недостаточностью фибриногена, при этом указанный способ включает введение нуждающемуся субъекту раствора или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, как указано в данном описании.

В соответствии с другим аспектом предлагается применение раствора по настоящему изобретению, как указано в данном описании, для приготовления лекарственного
40 средства, предназначенного для лечения или предотвращения состояния, связанного с недостаточностью фибриногена.

В соответствии с другим аспектом предлагается фибриновый клей, содержащий раствор по настоящему изобретению, как указано в данном описании.

В соответствии с другим аспектом предлагается способ получения стабильного
45 жидкого раствора фибриногена, при этом указанный способ включает:

(i) пропускание исходного вещества, включающего фибриноген, через смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом в условиях, выбранных таким образом, что, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, которая включает

плазминоген, тканевой активатор плазминогена и другие протеазы, присутствующий в исходном веществе, связывается со смолой; и

(ii) выделение раствора, содержащего фибриноген, который проходит через смолу, при этом концентрация, по меньшей мере, одного из белков, выбранных из группы, которая включает плазминоген, тканевой активатор плазминогена и другие протеазы, в растворе уменьшается, по меньшей мере, на 50% по сравнению с исходным веществом.

В соответствии с другим аспектом предлагается способ получения стабильного жидкого раствора фибриногена, при этом указанный способ включает:

(i) пропускание исходного вещества, содержащего фибриноген, через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

(ii) выделение раствора, содержащего фибриноген, который проходит через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

(iii) пропускание раствора, который извлекают на стадии (ii), через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом; и

(iv) выделение раствора, содержащего фибриноген, который проходит через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

где условия проведения стадий хроматографии таковы, что, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, присутствующий в исходном веществе, связывается с первой и/или второй смолой, и где концентрация, по меньшей мере, одного белка, выбранного из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, в растворе, который выделяют на стадии (iv), уменьшается, по меньшей мере, на 50% по сравнению с исходным веществом.

В соответствии с другим аспектом в настоящем изобретении предлагается способ очистки фибриноген, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(i) пропускание раствора, содержащего фибриноген, через смолу для ионообменной хроматографии в условиях, выбранных таким образом, что мономерный фибриноген связывается со смолой;

(ii) элюированием мономерного фибриногена из смолы с помощью элюирующего буферного раствора; и

(iii) фильтрование элюированного мономерного фибриногена со стадии (ii) через фильтр с размером пор в диапазоне от приблизительно 15 нм до приблизительно 35 нм.

Краткое описание чертежей

На фигуре 1 приведен процент извлечения фибриногена, плазминогена и t-РА (тканевого активатора плазминогена) из раствора фибриногена в диапазоне значений pH, когда раствор пропускают через НЕА Hupercel™ в отрицательном режиме работы по отношению к фибриногену. Гистограммы в каждой группе обозначают (слева направо): извлечение фибриногена, извлечение плазминогена и извлечение t-РА.

На фигуре 2 приведен процент извлечения фибриногена, плазминогена, t-РА и фактора II из раствора фибриногена в диапазоне значений pH, когда раствор пропускают через РРА Hupercel™ в отрицательном режиме работы по отношению к фибриногену. Гистограммы в каждой группе обозначают (слева направо): извлечение фибриногена, извлечение плазминогена, извлечение t-РА и фактора II.

На фигуре 3 приведен процент извлечения фибриногена, плазминогена, t-РА и фактор II из раствора фибриногена в диапазоне значений pH, когда раствор пропускают через МЕР Hupercel™ в отрицательном режиме работы по отношению к фибриногену. Гистограммы в каждой группе обозначают (слева направо): извлечение фибриногена,

извлечение плазминогена, извлечение t-РА и фактора II.

На фигуре 4а приведен процент извлечения фибриногена, плазминогена, t-РА и фактор II из раствора, содержащего фибриноген, в диапазоне значений pH, когда раствор пропускают через НЕА Hupercel™ в отрицательном режиме работы по отношению к фибриногену. Гистограммы в каждой группе обозначают (слева направо): извлечение фибриногена, извлечение плазминогена, извлечение t-РА и извлечение фактора II.

На фигуре 4b показана стабильность раствора, содержащего фибриноген, который выделяют из капли в виде фракций из колонки НЕА Hupercel™ (фигура 4а) в течение 6 дней при комнатной температуре (приблизительно 20°C), выраженная в % от начального количества способного свертываться белка. Гистограммы в каждой группе обозначают (слева направо): T=1 день, T=3 дня, T=6 дней.

На фигуре 4с показана стабильность раствора, содержащего фибриноген, который выделяют из капли в виде фракций из колонки НЕА Hupercel™ (фигура 4а) в течение 6 дней при комнатной температуре (приблизительно 20°C), выраженная в % от начального количества способного свертываться белка. Гистограммы в каждой группе обозначают (слева направо): T=1 день, T=3 дня, T=6 дней.

На Фигуре 5 приведен процент технологического извлечения для фибриногена, t-РА, плазминогена и фактора II во фракциях, полученных по способу в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, из криопреципитата плазмы посредством элюирования MacroPrep™-HQ. Гистограммы в каждой группе обозначают (слева направо): фибриноген, фибронектин, плазминоген, t-РА и фактор II.

На фигуре 6 показана чистота мономерного фибриногена, извлеченного из хроматографической смолы MacroPrep™-HQ, которую определяют с помощью аналитической гелепроникающей ВЭЖХ хроматографии.

На фигуре 7 показана фильтрационная способность фибриногена, извлеченного из хроматографической смолы MacroPrep™-HQ, с использованием элюирующих буферных растворов с разной проводимостью (190 mM NaCl, 21,5 мСм/см (ромбы); 200 mM NaCl, 22,5 мСм/см (квадраты); 210 mM NaCl 23,5 мСм/см (треугольники); 1% (масс./масс.) аргинин/200 mM NaCl, 25 мСм/см (крестики)).

На фигуре 8 показана активность фибриногена, как процент от исходной активности фибриногена при t=0, для жидкого фибриногена, извлеченного из хроматографической смолы MacroPrep™-HQ, который хранят либо при 2-8°C (ромбы) в течение 9 недель, либо при 30°C (квадраты) в течение 7 недель.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что в данном описании, если контекст не требует иного, слово "содержать" или его вариации, такие как "содержит" или "содержащий", подразумевают включение указанного элемента или целого или группы элементов или целых, но не исключение любого другого элемента или целого или группы элементов или целых.

Ссылка в данном описании на какую-либо предшествующую публикацию (или полученную из нее информацию) или на любой факт, который известен, не является и не должна пониматься как подтверждение, или принятие, или любая форма утверждения, что предшествующая публикации (или полученная из нее информация) или известный факт является частью известных знаний в данной области науки, к которой относится данная заявка.

Следует отметить, что в описании изобретения формы единственного числа включают множественные аспекты, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на "композицию" включает в себя одну композицию, а также две или большее количество

композиций.

При отсутствии какого-либо указания на обратное ссылку на "%-ное" содержание во всем данном описании следует понимать как означающее % масс./масс. (масса/масса). Например, раствор, содержащий, по меньшей мере, 80% фибриногена общего количества белка, следует понимать как раствор, содержащий фибриноген с концентрацией, по меньшей мере, 80% масс./масс. от общего количества белка. Указанную величину можно рассчитать, например, путем деления количества фибриногена, полученного из анализа белка, способного формировать сгустки, на общее количество белка, полученного из стандартного анализа белка (например, с помощью количественного биуретового анализа содержания белков), и умножения на 100. При анализе белка, способного формировать сгустки, к образцу добавляют тромбин, чтобы сформировать сгусток, который почти целиком состоит из фибрина. Сгусток центрифугированием может быть отделен от надосадочной жидкости, содержащей не способные формировать сгустки белки. Затем сгусток промывают и растворяют в моче щелочной реакции или в других веществах и концентрацию белка определяют с помощью спектрофотометрии.

Поскольку большая часть сгустка представляет собой фибрин, то концентрация белка будет эквивалентна концентрации фибриногена. Следовательно, количество способного формировать сгустки белка в образце эквивалентно разности между общим белком и содержанием не способного формировать сгустки белкового компонента в образце.

Извлечение фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF из исходного вещества (например, из плазмы или надосадочной жидкости клеточной культуры) обычно проводят с помощью обычного фракционирования, при этом фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF осаждают из раствора, используя, например, этанол, сульфат аммония, β-аланин/глицин, полимеры (в частности, полиэтиленгликоль) и/или растворы с низкой ионной силой. Современные методы очистки плазмы, использующие различные этапы хроматографии, позволяют добиться относительного высокого выхода гомогенных препаратов представляющего интерес белка. Однако указанные способы, как правило, приводит к получению препаратов, содержащих остаточные количества примесей, которые могут быть непригодны для приготовления устойчивого жидкого препарата для клинических применений. Такие примеси как протромбин, тканевой активатор плазминогена (tPA) и плазминоген особенно проблематичны, поскольку дестабилизирующие уровни указанных примесей могут гидролизовать фибриноген в водном растворе, таким образом, делая фибриноген нестабильным, особенно в процессе производства и/или при длительном хранении.

Настоящее изобретение основывается, по меньшей мере частично, на том открытии, что пропускание исходного вещества, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, через смолу для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда (HCIC) и выделение раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который проходит через смолу, является эффективной альтернативой существующих способов очистки, с целью снижения дестабилизирующего уровня плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в растворе.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом в настоящем изобретении предлагается способ снижения уровня, по меньшей мере, одного из белков, выбранных из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, в растворе, содержащем, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и фактора фон Виллебранда (VWF), при этом указанный способ включает:

(i) пропускание исходного вещества, включающего, по меньшей мере, один белок,

выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, через смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом в условиях, выбранных таким образом, что, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, которая включает плазминоген, тканевой активатор плазминогена и другие протеазы,

5 присутствующий в исходном веществе, связывается со смолой; и

(ii) выделение раствора, содержащего, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, которая включает фибриноген, фактор VIII и VWF, который проходит через смолу, при этом концентрация, по меньшей мере, одного из белков, выбранных из группы, которая включает плазминоген, тканевой активатор плазминогена и другие протеазы, в растворе уменьшается, по меньшей мере, на 50% по сравнению с исходным веществом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в извлеченном растворе, содержащем фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, 15 уменьшается, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80% или, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% или, по меньшей мере, на 98% по сравнению с исходным веществом.

В соответствии с другим аспектом предложен способ получения стабильного жидкого раствора фибриногена, при этом указанный способ включает:

20 (i) пропускание исходного вещества, включающего фибриноген, через смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом в условиях, выбранных таким образом, что, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, которая включает плазминоген, тканевой активатор плазминогена и другие протеазы, присутствующий в исходном веществе, связывается со смолой; и

25 (ii) выделение раствора, содержащего фибриноген, который проходит через смолу, при этом концентрация, по меньшей мере, одного белка, выбранного из группы, которая включает плазминоген, тканевой активатор плазминогена и другие протеазы, в растворе уменьшается, по меньшей мере, на 50% по сравнению с исходным веществом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация 30 плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в выделенном растворе, содержащем фибриноген, уменьшается, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80 % или, по меньшей мере, на 90%, или, по меньшей мере, на 95%, или, по меньшей мере, на 98% по сравнению с исходным веществом.

35 В хроматографических процессах обычно используют твердый носитель, который в данном описании взаимозаменяемо обозначается также как смола или матрица. Пригодные твердые носители должны быть знакомы специалистам в данной области техники. Примеры включают неорганические носители, такие как стекло и силикагель, органические, синтетические или натуральные носители, такие как агароза, целлюлоза, 40 декстран, полиамид, полиакриламиды, виниловые сополимеры бифункциональных акрилатов и различных гидроксилсодержащих мономеров и т. п. Коммерчески доступные носители продаются в виде смол с названиями Sephadex™, Sepharose™, Hypercel™, Capto™, Fractogel™, MacroPrep™, Unosphere™, GigaCap™, Trisacryl™, Ultrogel™, Dynospheres™, Macrosorb™ и XAD™.

45 Хроматографические стадии обычно проводят в условиях, препятствующих денатурации, и при подходящих температурах в диапазоне от приблизительно +10°C до +30°C, как правило, приблизительно при комнатной температуре.

Хроматографические стадии могут для удобства осуществляться порционно или

непрерывно. Может быть использован любой удобный способ разделения, такой как разделение на колонке, центрифугирование, фильтрация, декантация и т. п.

Гидрофобная хроматография с индукцией заряда (НСИС), которую часто также называют либо хроматографией со смешанным режимом работы, либо хроматографией с комбинированным режимом работы, известна специалистам в данной области техники. НСИС использует связывающие функциональные группы, присоединенные к твердому носителю, при этом связывающие функциональные группы могут обладать специфичностью по отношению к одному или нескольким белкам, которые, в соответствии со способом по настоящему изобретению, представляют собой примеси в исходном соединении (например, проферменты и протеазы, такие как протромбин, tPA и плазминоген).

Может быть использована любая подходящая смола для НСИС, известная специалистам из данной области техники. В одном варианте осуществления настоящего изобретения смола НСИС включает лиганд, выбранный из группы, состоящей из меркаптоэтилпиридина (4-меркаптоэтилпиридина, например, МЕР Hypercel™), н-гексиламина (например, НЕА Hypercel™) и фенилпропиламина (например, РРА Hypercel™). В одном варианте осуществления настоящего изобретения смола для НСИС включает н-гексиламин.

Лиганды для НСИС, такие как НЕА, МЕР и РРА, имеют то преимущество, что они позволяют осуществить разделение, используя свойство гидрофобности поверхности белков, но не требуют добавления лиотропных солей, которые часто применяются в других процессах очистки фибриногена с помощью гидрофобной хроматографии (например, хроматографии с гидрофобными взаимодействиями; НИС). В отличие от традиционной хроматографии с гидрофобными взаимодействиями, метод НСИС основан на величине рН, а не на концентрации соли. Смолы для НСИС обеспечивают также высокую связывающую способность и высокие скорости потока, что идеально подходит как для лабораторной очистки, так для и очистки в промышленных масштабах.

Смолами для НСИС часто заполняют колонки с высотой слоя от приблизительно 2 см до приблизительно 40 см. В промышленном масштабе высота слоя, как правило, составляет не менее 10 см и, как правило, меняется в диапазоне от приблизительно 15 см до 25 см. Диаметр используемых в промышленности колонок может меняться в диапазоне от 20 см до приблизительно 1,5 м. Подобные колонки работают при скоростях потока, в соответствии с инструкциями производителя смолы НСИС, при этом типичные скорости потока равны 50-100 см/час. Верхний предел скорости потока частично определяется ограничениями давления для смолы НСИС. Например, для смолы НЕА верхний предел рабочего давления равен <3 бар (<300 кПа). Типичная динамическая связывающая способность (10%-ный проскок связываемого белка) для смол НСИС равна от приблизительно 20 до 30 мг связанного белка на миллилитр смолы. В соответствии с настоящим изобретением указанное позволяет загрузить в колонку НСИС относительно большое количество белка, поскольку имеющиеся в большом избытке белки, такие как фибриноген, могут пройти через колонку, в то время как менее распространенные белки, такие как плазминоген, и/или тканевой активатор плазминогена, и/или другие протеазы связываются смолой для НСИС. Это удобно для организации производства в промышленном масштабе, поскольку для обработки партии потребуются как колонки меньшего размера, так и меньшее количество рабочих циклов колонки.

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что рН раствора или исходного вещества, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, которые проходят

через смолу для HСIC, в соответствии со способами по настоящему изобретению, можно регулировать, с целью контролирования извлечения фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF и удаления примесей. Так, в варианте осуществления настоящего изобретения, приведенного в данном описании, раствор или исходное вещество, содержащие фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, которые проходят через смолу для HСIC, имеют рН в диапазоне от приблизительно 6,0 до приблизительно 9,5. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения указанный раствор или исходное вещество, содержащие фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, пропускают через смолу для HСIC предпочтительно при рН, приблизительно равном 4,0; 5,0; 5,25; 5,5; 5,75; 6,0; 6,25; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75; 9,0; 9,25; 9,5 или 10,0. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения раствор или исходное вещество, содержащие фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, которые пропускают через смолу HСIC, имеют рН приблизительно 7,0. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения смолу для HСIC уравнивают перед загрузкой раствора или исходного вещества при рН, приблизительно равном 4,0; 5,0; 5,25; 5,5; 5,75; 6,0; 6,25; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75; 9,0; 9,25; 9,5 или 10,0.

В способе по настоящему изобретению, в случае необходимости, может также использоваться больше чем одна дополнительная стадия хроматографии, с целью удаления дополнительных примесей и, таким образом, повышения чистоты конечного препарата. В соответствии с настоящим изобретением, дополнительные стадии хроматографической очистки можно осуществить как до, так и после очистки фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF на смоле для HСIC. Например, раствор, содержащий фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который извлекают из смолы для HСIC на стадии (ii), можно пропустить через другую хроматографическую смолу.

При проведении дополнительных стадий хроматографической очистки может использоваться другая смола для HСIC. Так, в соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается способ снижения уровня, по меньшей мере, одного белка, выбранного из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, в растворе, содержащем, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и фактора фон Виллебранда (VWF), при этом указанный способ включает:

(i) пропускание исходного вещества, содержащего, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

(ii) выделение раствора, содержащего, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, который проходит через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

(iii) пропускание раствора, который извлекают на стадии (ii), через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом; и

(iv) выделение раствора, содержащего, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, фактора VIII и VWF, который проходит через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом,

где условия проведения стадий хроматографии таковы, что, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, присутствующий в исходном веществе, связывается с первой и/или второй смолой, и где концентрация, по меньшей мере, одного белка, выбранного из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, в растворе, который выделяют на стадии (iv), уменьшается, по меньшей мере,

мере, на 50% по сравнению с исходным веществом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в растворе, содержащем фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который извлекают на стадии (iv), снижается, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80% или, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% или, по меньшей мере, на 98% по сравнению с исходным веществом.

В соответствии с другим аспектом предлагается способ получения стабильного жидкого раствора фибриногена, при этом указанный способ включает:

(i) пропускание исходного вещества, содержащего фибриноген, через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

(ii) выделение раствора, содержащего фибриноген, который проходит через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

(iii) пропускание раствора, который извлекают на стадии (ii), через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом; и

(iv) выделение раствора, содержащего фибриноген, который проходит через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

где условия проведения стадий хроматографии таковы, что, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, присутствующий в исходном веществе, связывается с первой и/или второй смолой, и где концентрация, по меньшей мере, одного белка, выбранного из группы, состоящей из плазминогена, тканевого активатора плазминогена и других протеаз, в растворе, который выделяют на стадии (iv), уменьшается, по меньшей мере, на 50% по сравнению с исходным веществом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в растворе, содержащем фибриноген, который извлекают на стадии (iv), уменьшается, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80% или, по меньшей мере, на 90%, или, по меньшей мере, на 95%, или, по меньшей мере, на 98% по сравнению с исходным веществом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, приведенном в данном описании, вторая смола для HСIC отлична от первой смолы для HСIC. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, приведенном в данном описании, первая и вторая смолы для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда одинаковы. Если раствор, содержащий фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который выделяют из смолы для HСIC на стадии (ii), пропускают через ту же самую смолу для HСIC, то может оказаться желательным промыть смолу для HСIC после стадии (ii) и перед новым пропусканием выделенного раствора через смолу для HСIC на стадии (iii) с тем, чтобы удалить любые примеси, которые могут быть связаны смолой.

Дополнительная смола для хроматографии может быть также смолой для анионообменной хроматографии. В анионообменной хроматографии отрицательно заряженные молекулы притягиваются к положительно заряженному твердому носителю. Положительно заряженный твердый носитель может быть получен любыми способами, известными специалистам в данной области техники, и обычно включает ковалентное присоединение отрицательно заряженного функционального лиганда к твердому носителю. Пригодные отрицательно заряженные функциональные лиганды всегда зависят от молекулы, которая должна быть выделена из раствора. Примерами подходящих анионообменных смол являются такие смолы, которые содержат группу

функционального четвертичного амина (Q), и/или группу третичного амина (DEAE), или диэтиламинопропильную группу (ANX). Коммерчески доступные матрицы для анионообменной хроматографии включают, однако этим не ограничиваясь, целлюлозу DEAE, Poros™ PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50 от компании Applied Biosystems, MonoQ™, MiniQ™, Source™ 15Q и 30Q, Q, DEAE и ANX Sepharose Fast Flow™, Q Sepharose High Performance™, QAE SEPHADEX™ и FAST Q SEPHAROSE™ от компании GE Healthcare, WP PEI™, WP DEAM™, WP QUAT™ от компании J. T. Baker, Hydrocell™ DEAE и Hydrocell™ QA от компании Biochrom Labs Inc., UNOsphere™ Q, Macro-Prep™ DEAE и Macro-Prep™ High Q от компании Biorad, Ceramic HyperD™ Q, Ceramic HyperD™ DEAE, Q HyperZ™, Trisacryl™ M and LS™ DEAE, Spheredex™ LS DEAE, QMA Spherosil™ LS, QMA Spherosil™ M от компании Pall Technologies, DOWEX™ Fine Mesh Strong Base Type I and Type II Anion Matrix и DOWEX™ MONOSPHER E 77, слабую анионное основание от компании Dow Liquid Separations, Matrex Cellufine™ A200, A500, Q500 и Q800 от компании Millipore, Fractogel™ EMD TMAE₃ Fractogel™ EMD DEAE и Fractogel™ EMD DMAE от компании EMD, Amberlite™ слабые и сильные ионообменные смолы типа I и II, DOWEX™ слабые и сильные ионообменные смолы типа I и II, Diaion™ слабые и сильные ионообменные смолы типа I и II, Duolite™ от компании Sigma-Aldrich, гель TSK™ Q и DEAE 5PW и 5PW-HR, Toyopearl™ SuperQ-650S, 650M и 650C₃ QAE-26 550C и 650S, DEAE-650M b 650C от компании Tosoh и QA52™, DE23™, DE32™, DE51™, DE52™, DE53™, Express-Ion™ D и Express-Ion™ Q от компании Whatman.

Если необходимо, вместо матрицы анионообменной хроматографии может быть использована мембрана для анионообменной хроматографии. Коммерчески доступные анионообменные мембраны включают, однако этим не ограничиваясь, Sartobind™ Q от компании Sartorius, Mustang™ Q от компании Pall Technologies и мембрану Intercept™ Q от компании Millipore.

В варианте осуществления настоящего изобретения, приведенном в данном описании, анионообменная смола является сильной анионообменной смолой. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, приведенном в данном описании, сильная анионообменная смола содержит функциональный лиганд четвертичного амина (в частности, $-N^+(CH_3)_3$, как указано, например, для MacroPrep™-HQ; Bio-Rad Laboratories). В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения анионообменная смола, такая как GigaCap Q-650M[®], включает триметиламиновые группы, привитые к гидроксилсодержащему метакриловому полимеру посредством связующей группы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения анионообменную хроматографию проводят в положительном режиме по отношению к фибриногену, и/или фактору VIII, и/или VWF. В частности, используемые условия таковы, что, когда раствор или исходное вещество, содержащие фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, пропускают через анионообменную хроматографическую смолу, то фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF связывается с положительно заряженными функциональными группами, присоединенными к смоле, позволяя примесям в растворе пройти через смолу в виде проточной (сквозной) фракции, после чего они могут быть отброшены или извлечены для других целей. После того как проточная фракция проходит через смолу, смолу для анионообменной хроматографии можно промыть подходящим промывочным буфером, известным специалистам из данной области техники. Составные части промывочного буфера и условий проведения стадии промывки, как правило, выбираются таким образом, чтобы сохранить фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF связанным со смолой в течение всей стадии промывки.

Специалисту в данной области также должно быть понятно, что ссылка на промывочный буферный раствор, буфер раствор для элюирования или аналогичное вещество, касающееся хроматографии, может включать растворы, которые практически не обладают буферной способностью.

5 В одном варианте осуществления настоящего изобретения перед элюированием фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF из смолы для анионообменной хроматографии, смолу промывают промывочным раствором, содержащим эпсилон-аминокапроновую кислоту (ϵ -ACA). Добавление ϵ -ACA в промывочный буферный раствор может способствовать элюированию протеаз (таких как, плазминоген), которые
10 могут связываться со смолой для анионообменной хроматографии во время первого прогона. Пример подходящей стадии промывки описан в патенте США № 6960463.

Для элюирования фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF, который остается связанным со смолой для анионообменной хроматографии, может быть использован любой подходящий элюирующий буферный раствор, известный специалистам из данной
15 области техники. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что при удалении плазминогена, и/или t-PA, и/или других протеаз из раствора, включающего фибриноген, элюирующий буферный раствор, содержащий от приблизительно 150 мМ до приблизительно 300 мМ NaCl, позволяет элюировать мономерный фибриноген из анионообменной смолы, сводя к минимуму элюирование агрегатов фибриногена и/или
20 других белков (например, фактора VIII, VWF, фибронектина или протеаз), которые также могут быть связаны со смолой. Таким образом, в варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, фибриноген элюируют из анионообменной смолы с помощью элюирующего буферного раствора, включающего от приблизительно 150 мМ до приблизительно 300 мМ NaCl. Это эквивалентно
25 элюирующему буферному раствору, имеющему проводимость в диапазоне от приблизительно 18 мСм/см (150 мМ NaCl) до приблизительно 32 мСм/см (300 мМ NaCl).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фибриноген элюируют из анионообменной смолы с помощью элюирующего буферного раствора, содержащего от приблизительно 150 мМ до приблизительно 270 мМ NaCl. Это эквивалентно
30 элюирующему буферному раствору, имеющему проводимость в диапазоне от приблизительно 18 мСм/см (150 мМ NaCl) до приблизительно 29 мСм/см (270 мМ NaCl).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фибриноген элюируют из анионообменной смолы с помощью элюирующего буферного раствора, содержащего от приблизительно 170 мМ до приблизительно 230 мМ NaCl. Это эквивалентно
35 элюирующему буферному раствору, имеющему проводимость в диапазоне от приблизительно 19 мСм/см (170 мМ NaCl) до приблизительно 25 мСм/см (230 мМ NaCl).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фибриноген элюируют из анионообменной смолы с помощью элюирующего буферного раствора, содержащего от приблизительно 200 мМ до приблизительно 220 мМ NaCl. Это эквивалентно
40 элюирующему буферному раствору, имеющему проводимость в диапазоне от приблизительно 22 мСм/см (200 мМ NaCl) до приблизительно 24 мСм/см (220 мМ NaCl).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фибриноген элюируют из анионообменной смолы с помощью элюирующего буферного раствора, содержащего от приблизительно 190 мМ до приблизительно 210 мМ NaCl.

45 В другом варианте осуществления настоящего изобретения фибриноген элюируют из анионообменной смолы с помощью элюирующего буферного раствора, содержащего от приблизительно 150 мМ до приблизительно 190 мМ NaCl.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный

раствор имеет проводимость в диапазоне от 18 до 32 мСм/см; или от 20 до 25 мСм/см; или от 21 до 23,5 мСм/см; или от 22 до 23 мСм/см. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения проводимость элюирующего буферного раствора равна приблизительно 22,5 мСм/см.

5 В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, элюирующий буферный раствор содержит свободную аминокислоту с концентрацией, которая способствует элюированию мономерного фибриногена по отношению к его агрегатам. В другом варианте осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный раствор содержит свободную аминокислоту с концентрацией
10 от приблизительно 0,5 до 10% (масс./масс.). В этом качестве может быть использована любая подходящая свободная аминокислота. В одном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислотой является аргинин. В другом варианте осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный раствор содержит аргинин в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 10% (масс./масс.).

15 В других вариантах осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный раствор содержит 200 мМ NaCl, 0,5% (масс./масс.) аргинина; или 160 мМ NaCl, 1% (масс./масс.) аргинина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения анионообменную хроматографию проводят в отрицательном режиме по отношению к фибриногену и в
20 положительном режиме по отношению к фактору VIII и/или VWF. Так, используемые условия таковы, что когда раствор или исходное вещество, содержащие фибриноген и фактор VIII и/или VWF, пропускают через смолу для анионообменной хроматографии, фактор VIII и/или VWF связывается с положительно заряженными функциональными группами, присоединенными к смоле, позволяя находящемуся в растворе фибриногену
25 пройти через смолу вместе с проточной (сквозной) фракцией. После того как содержащая фибриноген проточная фракция проходит через смолу, смолу для анионообменной хроматографии можно промыть подходящим промывочным буферным раствором, известным специалистам из данной области техники. Составные части промывочного буферного раствора и условий стадии промывки обычно выбирают таким образом,
30 чтобы сохранить фактор VIII и/или VWF связанными со смолой в течение стадии промывки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения раствор или исходное вещество, содержащие фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, пропускают через смолу для анионообменной хроматографии в присутствии от приблизительно 150 мМ
35 до приблизительно 270 мМ NaCl. Это соответствует проводимости в диапазоне от приблизительно 18 мСм/см (150 мМ NaCl) до приблизительно 29 мСм/см (270 мМ NaCl). В указанных условиях фибриноген, в особенности фибриноген в мономерной форме, проходит через смолу для анионообменной хроматографии, в то время как фибриноген, содержащий агрегаты и другие примеси, такие как IgG и фибронектин, связывается со
40 смолой. В других вариантах осуществления настоящего изобретения раствор или исходное вещество, содержащие фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, пропускают через смолу для анионообменной хроматографии в присутствии от приблизительно 170 мМ до приблизительно 230 мМ NaCl (приблизительно от 19 мСм/см до приблизительно 25 мСм/см) или от приблизительно 200 мМ до приблизительно 220 мМ
45 NaCl (от приблизительно 22 мСм/см до приблизительно 24 мСм/см). В данных условиях можно ожидать, что фактор VIII и/или VWF связывается со смолой для анионообменной хроматографии.

Фактор VIII и/или VWF можно элюировать из анионообменной смолы элюирующим

буферным раствором, содержащим, по меньшей мере, 300 мМ соли, такой как NaCl. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения фактор VIII и/или VWF элюируют из анионообменной смолы с помощью приблизительно 500 мМ NaCl. В том случае, когда фибриноген и фактор VIII и/или VWF связаны с анионообменной смолой, стадию элюирования можно провести таким образом, чтобы вначале элюировать фибриноген (например, с использованием условий, изложенных в приведенных выше вариантах осуществления настоящего изобретения), а затем может быть элюирован фактор VIII и/или VWF с использованием более высокой концентрации соли, например, 500 мМ NaCl.

Когда используют стадию анионообменной хроматографии, ее можно провести либо до, либо после пропускания исходного вещества, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, через смолу для HCIC. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, способ дополнительно включает пропускание раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который выделяют на стадии (ii), через смолу для анионообменной хроматографии. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, где применяют первую и вторую стадию HCIC хроматографии, как указано в данном описании, способ дополнительно включает пропускание раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который выделяют на стадии (ii) и/или стадии (iv), через смолу для анионообменной хроматографии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, способ дополнительно перед стадией (i) включает пропускание исходного вещества, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, через смолу для анионообменной хроматографии.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что количество дополнительных стадий хроматографии, используемых в соответствии с настоящим изобретением, будет зависеть от степени чистоты, необходимой для конечного препарата. Например, способ по настоящему изобретению может включать 2, 3, 4 или 5 стадии хроматографии, как раскрыто в данном описании. Например, если способ включает 2 стадии хроматографии, то последовательность стадий будет представлять собой HCIC/LEX, или HCIC/HCIC, или IEX/HCIC; если способ включает 3 стадии хроматографии, то последовательность стадий будет представлять собой HCIC/LEX/HCIC, или HCIC/HCIC/LEX, или HCIC/HCIC/HCIC, или HCIC/LEX/LEX, или IEX/HCIC/HCIC, или IEX/HCIC/LEX, или IEX/LEX/HCIC; если способ включает 4 стадии хроматографии, то последовательность стадий будет представлять собой HCIC/LEX/HCIC/HCIC, или HCIC/HCIC/LEX/HCIC, или HCIC/HCIC/HCIC/LEX, или HCIC/HCIC/HCIC/HCIC, или HCIC/LEX/LEX/HCIC, или HCIC/LEX/LEX/LEX, или HCIC/HCIC/LEX/LEX, или HCIC/LEX/HCIC/LEX, или IEX/HCIC/LEX/HCIC, или IEX/HCIC/HCIC/LEX, или IEX/HCIC/HCIC/HCIC, или IEX/HCIC/LEX/LEX, или IEX/LEX/HCIC/HCIC или IEX/LEX/HCIC/LEX, или IEX/LEX/LEX/HCIC; и так далее (где "IEX" обозначает анионообменную хроматографию). Требуемый уровень чистоты может определяться предполагаемым использованием раствора (например, для лечения пациента с недостаточностью фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF) и/или требуемым длительным периодом хранения в виде водного препарата.

Хроматографию можно осуществить с использованием любых средств, известных специалистам в данной области техники. Например, в соответствии с настоящим изобретением, на стадиях хроматографии можно использовать колонки с аксиальным потоком, такие как колонки, доступные от компаний GE Healthcare, Pall Corporation и

Bio-Rad, или колонки с радиальным потоком, таких как колонки, доступные от компании Proxys. Хроматографические стадии, в соответствии с настоящим изобретением, также можно проводить с использованием технологий неплотного придонного слоя.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения концентрация плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в извлеченном растворе, содержащем фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, уменьшается, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, или, по меньшей мере, на 90%, или, по меньшей мере, на 95% по сравнению с исходным веществом.

Способы, которые максимально увеличивают удаление примесей, таких как плазминоген, и/или тканевой активатор плазминогена, и/или других протеаз, наиболее предпочтительны, поскольку стабильность и эффективность фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF в растворе существенно улучшается, в особенности при длительном хранении. Хранение в жидком виде особенно предпочтительно для растворов, содержащих фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, потому что имеется возможность немедленного его использования для пациента. Этим оно отличается от использования лиофилизированных препаратов очищенного фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF, которые требуют восстановления лиофилизованного(ых) белка(ов) в подходящем буферном растворе и/или воде для инъекций непосредственно перед введением нуждающемуся пациенту.

Преимущество уменьшения содержания протеаз или их проферментов (например, плазминогена) в растворе, содержащем фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, заключается в том, что оно сводит к минимуму необходимость в добавлении анти-фибринолитических агентов, с целью ингибирования любой остаточной протеазы и/или профермента (например, плазмина или плазминогена). Примеры подобных агентов включают апротинин, бычий белковый ингибитор плазмина; или транексамовую кислоту, синтетический ингибитор плазмина, которая вызывает нейротоксические побочные эффекты.

Еще одна преимущественная особенность заключается в том, что плазминоген, который был выделен из раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, с помощью HCIC, может быть подвергнут дополнительно обработке с получением содержащего плазминоген концентрата, например, для клинического применения. Таким образом, HCIC может быть использован для получения как плазминогена, так и растворов, содержащих фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, из одного исходного раствора.

Еще одна преимущественная особенность заключается в том, производственные затраты на смолу для HCIC гораздо меньше, чем стоимость лизин-Sepharose™ или смолы с иммобилизованным лизином, которые используются в методах аффинной хроматографии.

Еще одна преимущественная особенность заключается в том, что HCIC может быть использована для замены стадий с использованием гидроксида алюминия (в частности, Alhydrogel™) для удаления протеаз (например, фактора II). Alhydrogel™ в настоящее время широко используется в промышленном производстве фактора VIII и VWF. Однако указанное вещество является относительно дорогим, а на обработку одной партии обычно используют 100 кг. Кроме того, Alhydrogel™ часто требует проведения ручных операций, и вещество выбрасывают после однократного использования. Напротив, стадии осуществления HCIC могут быть полностью автоматизированы, а смола может быть использована при обработке нескольких партий.

Еще одним преимуществом является то, что смола для НСІС совместима с 1М раствором NaOH, который может быть использован для инактивации и удаления патогенов, включая вирусы и прионы, во время чистки колонки и при проведении процедур санитарной обработки смолы.

5 Жидкие препараты, полученные с помощью способов по настоящему изобретению, также обладают преимуществами перед использованием замороженных препаратов, которые требуют дорогостоящего хранения и использования специальных транспортных средств и которые необходимо размораживать непосредственно перед использованием. Даже в том случае, когда фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF хранят в виде
10 лиофилизованного или замороженного препарата, необходимо, чтобы восстановленный или размороженный белок был устойчив в течение большего времени. Это очевидно, например, для случая, когда вещество восстанавливают в качестве меры предосторожности, с целью проведения медицинской процедуры, однако его использование не потребовалось по медицинским соображениям. Подобное вещество
15 обычно выбрасывают, поскольку фибриноген устойчив лишь в течение короткого периода времени из-за присутствия протромбина, и/или t-PA, и/или других протеаз.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения жидкие препараты по настоящему изобретению, содержащие фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, хранятся в виде жидкости или в виде лиофилизованного или замороженного препарата.

20 В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается способ очистки фибриногена, при этом указанный способ включает стадии:

(i) пропускание раствора, содержащего фибриноген, через смолу для ионообменной хроматографии в условиях, выбранных таким образом, что мономерный фибриноген связывается со смолой;

25 (ii) элюирование мономерного фибриногена из смолы с помощью элюирующего буферного раствора; и

(iii) фильтрование элюированного мономерного фибриногена со стадии (ii) через фильтр с размером пор в диапазоне от приблизительно 15 нм до приблизительно 35 нм.

30 В одном варианте осуществления настоящего изобретения раствор, содержащий фибриноген (стадия (i)), выделяется после пропускания исходного вещества, содержащего фибриноген, через смолу для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда в условиях, выбранных таким образом, что плазминоген, и/или тканевой активатор плазминогена, и/или другие протеазы связываются со смолой, а фибриноген
35 проходит через смолу.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения смола для ионообменной хроматографии выбрана из смолы для анионообменной хроматографии или смолы для катионообменной хроматографии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения смола для анионообменной хроматографии представляет собой сильную смолу для анионообменной хроматографии или слабую смолу для анионообменной хроматографии. В одном варианте осуществления настоящего изобретения смола для анионообменной хроматографии содержит группу четвертичного амина. Примеры включают четвертичный алкиламин и четвертичный алкилалканолламин, или амин, диэтиламин, диэтиламинопропил, амина,
40 триметиламмонийметил, триметилбензиламмоний, диметилэтанолбензиламмоний и полиамин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения смолой для анионообменной хроматографии является полимерный носитель с привитыми третичными или четвертичными аминами или гидроксилсодержащий полимерный

носитель с привитыми третичными или четвертичными аминами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения смола для анионообменной хроматографии включает полимерный носитель на основе метакрилата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения смола для анионообменной хроматографии представляет собой MacroPrep™ HQ. В другом варианте осуществления настоящего изобретения смола для анионообменной хроматографии представляет собой GigaCap™ Q-650M. В других вариантах осуществления настоящего изобретения смолой для анионообменной хроматографии предварительно заполняют колонку.

Если необходимо, вместо смолы для анионообменной хроматографии может быть использована мембрана для анионообменной хроматографии. Коммерчески доступные мембраны для анионообменной хроматографии включают, однако этим не ограничиваясь, Sartobind™ Q от компании Sartorius, Mustang™ Q от компании Pall Technologies и мембрану Intercept™ Q от компании Millipore.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения смола для катионообменной хроматографии является сильной смолой для катионообменной хроматографии или слабой смолой для катионообменной хроматографии.

Коммерчески доступные смолы для катионообменной хроматографии включают, например, однако этим не ограничиваясь, смолы, которые содержат группу на основе сульфонатов (в частности, MonoS, MiniS, Source™ 15S и 30S, SP Sepharose Fast Flow™, SP Sepharose High Performance™ от компании GE Healthcare, Toyopearl™ SP-650S и SP-650M от компании Tosoh, Macro-Prep High™ S от компании BioRad, Ceramic HyperD™ S, Trisacryl™ M и LS™ SP и Spherodex™ LS SP от компании Pall Technologies); группу на основе сульфозтила (в частности, Fractogel™ SE от компании EMD, Poros™ S-10 и S-20 от компании Applied Biosystems); группу на основе сульфопропила (в частности, TSK™ Gel SP 5PW и SP-5PW-HR от компании Tosoh, Poros™ HS-20 и HS 50 от компании Applied Biosystems); группу на основе сульфоизобутила (в частности, Fractogel™ EMD SO3" от компании EMD); группу на основе сульфоксиэтила (в частности, SE52, SE53 и Express-Ion S от компании Whatman), группу на основе карбоксиметилцеллюлозы (в частности, CM Sepharose Fast Flow™ от компании GE Healthcare, Hydrocell™ CM от компании Biochrom Labs Inc., Macro-Prep™ CM от компании BioRad, Ceramic HyperD™ CM, Trisacryl™ M CM, Trisacryl™ LS CM от компании Pall Technologies, Matrex Cellufme™ C500 и C200 от компании Millipore, CM52™, CM32™, CM23™ и Express™-Ion C от компании Whatman, Toyopearl™ CM-650S, CM-650M и CM-650C от компании Tosoh); группу на основе сульфокислоты и карбоновой кислоты (в частности, BAKERBOND™ Carboxy-Sulfon от компании J. T. Baker); группу на основе карбоновой кислоты (в частности, WP™ CBX от компании J. T. Baker, DOWEX MAC-3 от компании Dow Liquid Separations, Amberlite Weak Cation Exchangers, DOWEX™ Weak Cation Exchanger и Diaion™ Weak Cation Exchangers от компании Sigma-Aldrich и Fractogel™ EMD COO- от компании EMD); группу на основе сульфоновой кислоты (в частности, Hydrocell™ SP от компании Biochrom Labs Inc., DOWEX™ Fine Mesh Strong Acid Cation Matrix от компании Dow Liquid Separations, UNOsphere™ S, WP Sulfonic от компании J. T. Baker, мембрану Sartobind™ S от компании Sartorius, Amberlite™ Strong Cation Exchangers, DOWEX™ Strong Cation и Diaion Strong Cation Exchanger от компании Sigma-Aldrich); и группу на основе ортофосфата (в частности, PI 1 от компании Whatman). Если необходимо, вместо катионообменной матрицы может быть использована мембрана для катионообменной хроматографии, в частности, Sartobind™ S (Sartorius; Edgewood, Нью-Йорк).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения содержащий фибриноген раствор имеет pH в диапазоне от приблизительно pH 7 до pH 10. В одном варианте

осуществления настоящего изобретения рН раствора, содержащего фибриноген, равен приблизительно 8. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения смолу для анионообменной хроматографии вначале предварительно уравнивают и промывают после загрузки фибриногена с использованием буфера(ов), имеющего

5 (их) рН, аналогичный рН раствора, содержащего фибриноген.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный раствор имеет проводимость в диапазоне от приблизительно 18 до приблизительно 30 мСм/см. Например, проводимость элюирующего буферного раствора может быть в диапазоне от приблизительно 18 до приблизительно 25 мСм/см, или от приблизительно

10 19 до приблизительно 24 мСм/см, или от приблизительно от 20 до 24 мСм/см или от приблизительно 21 до приблизительно 23 мСм/см. В одном варианте осуществления настоящего изобретения проводимость элюирующего буферного раствора равна приблизительно 22 мСм/см. В других вариантах осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный растворный раствор содержит NaCl. В одном варианте

15 осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный растворный раствор содержит NaCl с концентрацией в диапазоне от приблизительно 180 до приблизительно 230 мМ, или от приблизительно 190 мМ до приблизительно 210 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация NaCl в элюирующем буферном растворе равна приблизительно 200 мМ.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный раствор, включающий фибриноген, содержит белок с концентрацией от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация белка в элюирующем буферном растворе, содержащем фибриноген, равна в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 8 мг/мл. В

25 конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный раствор, содержащий фибриноген, имеет концентрацию приблизительно 6 мг/мл.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения до проведения фильтрации (стадия (iii)) готовят композицию элюируемого мономерного фибриногена с одной или несколькими аминокислотами. В одном варианте осуществления настоящего изобретения

30 аминокислота представляет собой аргинин или глицин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация аминокислоты в элюирующем буферном растворе, содержащем фибриноген, равна в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 10% (масс./масс.). В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация аминокислоты в элюирующем

35 буферном растворе, содержащем фибриноген, равна от приблизительно 1% до приблизительно 6% (масс./масс.), или от приблизительно 2% до приблизительно 6% (масс./масс.), или от приблизительно 2% до приблизительно 5% (масс./масс.). В одном варианте осуществления настоящего изобретения элюирующий буферный раствор, содержащий фибриноген, смешивают с приблизительно 2%, или приблизительно 3%,

40 или приблизительно 4%, или приблизительно 5% (масс./масс.) аргинина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения элюируемый мономерный фибриноген имеет рН от приблизительно рН 7 до рН 9.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фильтр на стадии (ii) имеет размер пор в интервале от приблизительно 15 нм до приблизительно 35 нм, или

45 от приблизительно 15 нм до приблизительно 30 нм, или от приблизительно 15 нм до приблизительно 25 нм, или от приблизительно 15 нм до приблизительно 20 нм.

Удаление вирусов с помощью фильтрации может быть осуществлено либо с использованием тангенциальной проточной фильтрации (TFF), либо с использованием

"тупикового" фронтального фильтрования (также известного как прямая фильтрация). Фильтры для удаления вирусов были первоначально разработаны для использования в TFF, где подаваемый поток примыкает к верхнему поверхностному слою асимметричной полимерной мембраны. TFF обеспечивает высокую скорость потока за счет зачистки поверхности мембраны, уменьшающей поляризацию концентрации и образование загрязнений. Тем не менее, простота и низкие капитальные затраты на проведение "тупикового" фронтального фильтрования привели к широкому использованию для удаления вирусов специально разработанных фильтров для "тупикового" фронтального фильтрования. В отличие от TFF, указанные фильтры для "тупикового" фронтального фильтрования обычно работают с более открытой стороной мембраны, обращенной к потоку поступающего вещества, что позволяет захватить белковые агрегаты и другие крупные загрязняющие вещества в макропористой субструктуре, тем самым защищая удерживающий вирусы поверхностный слой полимерной мембраны. Преимущества использования одноразовых фильтров для "тупикового" фронтального фильтрования заключаются в том, что они упрощают как разработку, так и проверку системы, снижая затраты труда и капитала.

"Тупиковое" фронтальное фильтрование, как правило, включает использование одного насоса, необходимого, чтобы продавить жидкость от поверхности через мембрану.

Тангенциальная фильтрация обычно требует использованием одного насоса для поддержания постоянной скорости потока на поверхности мембранного фильтра, а второй насос переносит белок через мембрану путем создания отрицательного давления в задней части мембраны.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фильтрации осуществляют по методу "тупикового" фронтального фильтрования.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения процесс фильтрации осуществляют по методу "тупикового" фронтального фильтрования либо с использованием фильтрации с постоянным давлением, либо с использованием фильтрации с постоянной скоростью. В одном варианте осуществления настоящего изобретения процесс "тупикового" фронтального фильтрования осуществляют с использованием постоянного давления при фильтрации.

Фильтрацию, как правило, проводят под фильтрационным давлением, величина которого соответствует нижнему уровню давления, которое мембрана может выдержать, в зависимости от материала мембраны для удаления вирусов, использованной в настоящем изобретении, например при давлении от приблизительно 0,2 до приблизительно 3,4 бар. В одном варианте осуществления настоящего изобретения давление фильтрации поддерживают в диапазоне от приблизительно 0,2 бар до приблизительно 3,4 бар. В другом варианте осуществления настоящего изобретения давление фильтрации поддерживают в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 3 бар; или от приблизительно от 1 до 2 бар; или от приблизительно 1,2 до приблизительно 2 бар. В другом варианте осуществления настоящего изобретения давление фильтрации поддерживают на уровне от приблизительно 1,5 бар до приблизительно 1,9 бар.

Температура может оказывать влияние на вязкость раствора белка и на поток при фильтрации с использованием мембраны для удаления вирусов. Специалистам в данной области должно быть понятно, что раствор для использования на стадии фильтрации, как правило, имеет температуру в диапазоне от приблизительно 0°C до температуры, при которой денатурирует представляющий интерес белок. Температура раствора

предпочтительно находится в диапазоне от приблизительно 10°C до приблизительно 50°C. В одном варианте осуществления настоящего изобретения температура раствора находится в диапазоне от приблизительно 18°C до приблизительно 35°C. В другом варианте осуществления настоящего изобретения раствор фильтруют при комнатной температуре, равной от приблизительно 18°C до приблизительно 26°C.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения емкость фильтра для удаления вирусов составляет, по меньшей мере, 0,20 кг или, по меньшей мере, 0,50 кг или, по меньшей мере, 0,75 кг или, по меньшей мере, 1,00 кг или, по меньшей мере, 1,25 кг или, по меньшей мере, 1,50 кг или, по меньшей мере, 2 кг фибриногена на м² поверхности фильтра.

Перед фильтрацией для удаления вирусов, с целью удалить макроразмерные частицы, необязательно может быть осуществлена предфильтрация или стадия осветляющего фильтрования. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предфильтрация осуществляется с использованием предфильтра, содержащего мембрану с порами большего диаметра, чем поры мембраны для удаления вирусов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предфильтр представляет собой мембранный фильтр с размерами пор приблизительно 0,1 мкм. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предфильтр выбран из мембранного фильтра Pall Nylon (SKL 7002 NTP 0,1 мкм или FTKNI) или других коммерчески доступных предфильтров, обладающих аналогичными свойствами для удаления белковых агрегатов и/или частиц. Предфильтрация может проводиться либо соосно с фильтром для удаления вирусов, либо со смещением по отношению к фильтру для удаления вирусов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предфильтрацию осуществляют соосно по отношению к фильтру для удаления вирусов.

Подходящие фильтры для удаления вирусов методом фильтрации, в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, известны специалистам в данной области техники. Пример включает, в частности, Planova BioExTM. Подобные фильтры иногда называют фильтрами для удаления "малых вирусов".

В одном варианте осуществления настоящего изобретения мембранный фильтр представляет собой плоскую мембрану или мембрану из полых волокон. Примеры плоских мембран включают гидрофилизированные мембранные фильтры из поливинилидендифторида (PVDF), такие как фильтры для удаления малых вирусов PegasusTM Grade SV4 (Pall Corporation). В одном варианте осуществления настоящего изобретения фильтр представляет собой PegasusTM Grade SV4.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения фильтр представляет собой мембрану из полых волокон. Мембрана из полых волокон может содержать пучок соломообразных полых волокон, при этом стенка каждого полого волокна включает 3-мерную паутинную структуру пор, состоящую из пустот, которые соединены друг с другом тонкими капиллярами. Примеры фильтров из полых волокон включают фильтры PlanovaTM BioEXTM (Asahi Kasei Corporation), которые содержат гидрофильный модифицированный поливинилидендифторид (PVDF) в формате мембраны из полых волокон. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фильтр представляет собой PlanovaTM BioEXTM.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения два или несколько фильтров для удаления малых вирусов используют последовательно. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фильтрацию осуществляется с помощью двух последовательно установленных фильтров, имеющих размер пор в диапазоне от приблизительно 15 до приблизительно 20 нм. Подобные стадии фильтрации позволяют

получить фибриноген, по меньшей мере, с 6,9 log LRV для парвовирусов типа MVM.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения содержащий фибриноген раствор пропускают через смолу для ионообменной хроматографии в условиях, выбранных таким образом, что содержащийся в растворе фибриноген проходит через смолу. Так, ионообменную хроматографию проводят в отрицательной режиме по отношению к фибриногену в таких условиях, что, когда раствор пропускают через смолу, то примеси, такие как агрегаты фибриногена, плазминоген и фибронектин, присутствующие в растворе, связываются с заряженными функциональными группами, присоединенными к смоле, позволяя присутствующему в растворе фибриногену, в частности мономерному фибриногену, пройти через смолу вместе с проточной (сквозной) фракцией. После того как содержащая фибриноген проточная фракция проходит через смолу, смолу для ионообменной хроматографии можно промывают подходящим промывочным буферным раствором, известным специалистам из данной области. Составные части промывочного буферного раствора и условия стадии промывки, как правило, выбраны таким образом, чтобы примеси оставались связанными со смолой в течение стадии промывки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения смолу для ионообменной хроматографии выбирают из смолы для анионообменной хроматографии или смолы для катионообменной хроматографии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения раствор, содержащий фибриноген, пропускают через смолу для анионообменной хроматографии в присутствии от приблизительно 150 mM до приблизительно 270 mM NaCl. Это соответствует проводимости в диапазоне от приблизительно 18 мСм/см (150 mM NaCl) до приблизительно 29 мСм/см (270 mM NaCl). В указанных условиях фибриноген, в частности, его мономерная форма, проходит через смолу для анионообменной хроматографии, в то время как фибриноген, содержащий агрегаты и другие примеси, такие как плазминоген и фибронектин, связываются со смолой. В других вариантах осуществления настоящего изобретения раствор, содержащий фибриноген, пропускают через смолу для анионообменной хроматографии в присутствии от приблизительно 170 mM до приблизительно 230 mM NaCl (от приблизительно 19 мСм/см до приблизительно 25 мСм/см) или от приблизительно 200 mM до приблизительно 220 mM NaCl (от приблизительно 22 мСм/см до приблизительно 24 мСм/см). Ожидается, что в данных условиях примеси связываются со смолой для анионообменной хроматографии, позволяя фибриногену проходить через смолу вместе с проточной фракцией.

Раствор, содержащий фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, выделяют с использованием способов по настоящему изобретению, которые являются предпочтительными, поскольку они обеспечивают получение фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF, обладающего более высокой устойчивостью, чем существующие лиофилизированные препараты, даже при комнатной температуре. Это может быть особенно выгодно в случае длительных транспортных маршрутов, когда низкие температуры, когда они потребуются, не могут быть обеспечены при транспортировке и/или хранении. Стабильное хранение фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF в растворе также облегчает во многих отношениях их производство, использование, транспортировку и введение нуждающемуся пациенту. Благодаря повышенной устойчивости фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF, приготовленного в соответствии с настоящим изобретением, можно во многих фармацевтических препаратах обойтись без добавления повышающих стабильность агентов, таких как ингибиторы фибринолиза или фибриногенолиза, которые могут в

некоторых случаях привести к нежелательным побочным эффектам или которых следует избегать, чтобы уменьшить потенциальные риски.

Термин "стабильный" в данном описании означает, что наблюдается небольшая потеря или не наблюдается практически никакая существенная потеря активности фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF после определенного периода времени при хранении по сравнению с уровнем активности фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF перед хранением (в частности, по сравнению с уровнем активности, определенным сразу после выделения раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, в соответствии с настоящим изобретением). В варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытого в данном описании, раствор, содержащий фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, сохраняет, по меньшей мере, 70% активности, предпочтительно, по меньшей мере, 80% активности, более предпочтительно, по меньшей мере, 90% активности, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 95% активности и наиболее предпочтительно 100% активности после периода хранения при температуре от приблизительно 0°C до приблизительно 30°C. Специалисту в данной области должно быть понятно, что активность фибриногена может быть определена для препарата фибриногена непосредственно перед началом периода хранения, и указанное изначальное значение может быть использовано для установления величины 100% активности, по сравнению с которой может быть сравнена активность фибриногена, определенная в различные моменты времени в течение периода хранения, и выражена в процентах от указанного изначального значения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, фибриноген, выделенный с помощью способов по настоящему изобретению, сохраняет приблизительно от 90% до 100% активности после, по меньшей мере, 4 недель хранения в растворе при температуре от приблизительно 2°C до 8°C, предпочтительно сохраняет приблизительно 90% активности после 4 недель хранения в растворе при температуре от приблизительно 2°C до 8°C. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, фибриноген сохраняет от приблизительно 60% до приблизительно 80% активности после, по меньшей мере, 4 недель хранения в растворе при температуре приблизительно 30°C, предпочтительно сохраняет от приблизительно 60% до приблизительно 70% активности после 5 недель хранения в растворе при температуре приблизительно 30°C. Уровень активности фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF можно определить с помощью любых средств, известных специалистам из данной области техники. Примеры подходящих способов определения активности фибриногена, например, собраны в документе Mackie et al. (British J. Haematol. 121:396-404, 2003). Конкретные методы включают метод Клаусса (Clauss, 1957, Acta-Haematol. 17, 237-246) и/или способный формировать сгустки белок (Jacobsson K., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1955; 7 (supp 14): 1-54 или Fibrin sealant Ph. Eur. Monograph. 903, 2012). Результаты могут быть представлены в виде % белка, способного формировать сгустки; % от первоначального количества белка, способного формировать сгустки, и/или % от первоначальной активности фибриногена, как определяют по методу Клаусса или аналогичному методу.

Специалисту должно быть понятно, что концентрация плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в выделенном растворе, содержащем фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, может определять длительность хранения и/или условия хранения (например, температуру). Например, должно быть понятно, что препарат, в котором концентрация плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз в выделенном растворе снижается на 80% по

сравнению с исходным веществом, может храниться в течение более длительного периода времени и/или при более высоких температурах без значительной дестабилизации активности фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF по сравнению с препаратом, в котором концентрация плазминогена, и/или тканевого активатора

5 плазминогена, и/или других протеаз в восстановленном растворе, содержащем фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, уменьшается лишь на 50% по сравнению с исходным веществом.

Хотя способы по настоящему изобретению могут быть осуществлены в лабораторном масштабе, их можно масштабировать до промышленного уровня без значительных

10 изменений в условиях осуществления. Так, в варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, способы по настоящему изобретению осуществляют в промышленном или коммерческом масштабе. Способы по настоящему изобретению предпочтительно пригодны для производства фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF в промышленном масштабе. Например, при использовании фракции

15 плазмы в качестве исходного вещества в способе по настоящему изобретению производство в промышленном масштабе будет включать использование фракции плазмы, полученной, по меньшей мере, приблизительно из 500 кг плазмы. Более предпочтительно исходную фракцию плазмы выделяют, по меньшей мере, из приблизительно 5000 кг, 7500 кг, 10000 кг и/или 15000 кг плазмы на одну партию

20 продукта. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения растворы и фармацевтические композиции, содержащие фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, по настоящему изобретению изготавливают в промышленных масштабах из фракции плазмы или рекомбинантного исходного вещества.

В том случае, когда раствор, содержащий фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF,

25 должен быть использован для клинических или ветеринарных целей (например, для введения субъекту с недостаточностью фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF или для использования в качестве фибринового клея), специалистам в данной области техники должно быть понятно, что может оказаться желательным снизить уровень содержания активного вирусов (титра вирусов) и других потенциальных инфекционных

30 агентов (например, прионов) в растворе. Это может оказаться особенно необходимым, когда сырье, содержащее фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF (то есть исходное вещество), получено из плазмы крови. Методы снижения титра вирусов в растворе известны специалистам из данной области техники. Примеры включают пастеризацию (например, инкубирование раствора при 60°C в течение 10 час в присутствии больших

35 концентраций стабилизаторов, таких как глицин (например, 2,75 М) и сахараза (например, 50%), и/или других выбранных вспомогательных веществ или солей), сухую термообработку, фильтрацию для удаления вирусов (путем пропускания раствора через нанофильтр; например, фильтр с отсечкой 20 нм) и/или обработку раствора подходящим органическим растворителем и моющим средством в течение подходящего времени и

40 в подходящих условиях, с целью инактивировать вирус в растворе. Моющий растворитель используют в течение 20 лет для инактивации оболочечных вирусов, в особенности в веществах, выделенных из плазмы, в том числе в фибриногене и факторе VIII и/или VWF. Так, процесс можно осуществить с использованием различных реагентов и способов, известных в данной области техники (см., например, патент США № 4540573 и патент США № 4764369, которые включены в данное описание посредством ссылки). Подходящие растворители включают три-н-бутил фосфат (TnBP) и эфир, предпочтительно TnBP (обычно приблизительно 0,3%). Подходящие моющие средства включают полисорбат Tween 80, полисорбат Tween 20 и Triton X-100 (как правило,

приблизительно 0,3%). Выбор условий обработки, включая концентрации растворителя и моющего средства, частично зависит от свойств исходного вещества, при этом менее чистые исходные вещества, как правило, требуют более высоких концентраций реагентов и более экстремальных условий проведения обработки. Предпочтительным моющим средством является полисорбат 80 и особенно предпочтительной комбинацией является сочетание полисорбата 80 и TnBP. Исходное вещество можно перемешивать с растворителем и моющими реагентами при температуре и в течение времени, достаточных для инактивации любых оболочечных вирусов, которые могут присутствовать. Например, обработку моющим растворителем можно провести в течение приблизительно 4 час при 25°C. Моющие растворители впоследствии удаляют, например, путем адсорбции на хроматографических средах, таких как гидрофобные смолы C-18, или путем элюирования в виде проходной фракции из ионообменных смол в условиях, в которых адсорбируется представляющий интерес белок.

Стадию инактивации вирусов можно проводить на любом подходящем этапе осуществления раскрытых в данном описании способов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения исходное вещество, содержащее фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, подвергают операции инактивации вирусов перед проведением стадии (i). В другом варианте осуществления настоящего изобретения раствор, содержащий фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который выделяют из смолы для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда (т. е. со стадий (ii) и/или (iv)) подвергают обработке для инактивации вирусов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, стадия инактивации вирусов включает пастеризацию или обработку органическим растворителем и моющим средством. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, этап инактивации вирусов включает фильтрацию для удаления вирусов. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что если используют фильтрацию для удаления вирусов, то добавление свободной аминокислоты (например, аргинина) до проведения стадии фильтрации может значительно повысить скорость потока и улучшить выделение фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF с помощью фильтра. Пример подобного способа описан в патенте США № 7919592.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, исходное вещество или раствор, содержащие фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, подвергают стадии инактивации вирусов, прежде чем пропускают их через смолу для анионообменной хроматографии. Преимущество использования стадии инактивации вирусов, такой как обработка моющим растворителем, до прохождения обрабатываемого раствора или исходного вещества через смолу для анионообменной хроматографии, заключается в том, что анионообменная смола позволяет удалить органический растворитель и моющее средство из обрабатываемого раствора за счет использования условий, которые способствуют связыванию фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF со смолой и удалению органического растворителя и моющего средства вместе с проточной (сквозной) фракцией.

Пастеризация может приводить к образованию белковых агрегатов и полимеров, в особенности в растворе, содержащем фибриноген (также обозначаемом в данном описании как "раствор фибриногена"). Таким образом, в некоторых случаях может оказаться желательным снизить уровень агрегатов/полимеров в пастеризованном растворе. Указанной цели можно добиться с помощью любых средств, известных специалистам из данной области техники, хотя предпочтительнее проводить указанную операцию путем дальнейшей хроматографической очистки. В одном варианте

осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, пастеризованный раствор или исходное вещество пропускают через смолу для анионообменной хроматографии в положительном режиме по отношению к фибриногену, и/или фактору VIII, и/или VWF, так что любые агрегаты или полимеры удаляются вместе с проточной (сквозной) фракцией.

Термин "исходное вещество" используется в данном описании для обозначения любого раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF. Исходное вещество может также содержать другие белки (например, лечебные белки), известные специалистам из данной области техники. Примеры включают в себя белки, участвующие в каскаде процессов свертывания крови. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, исходное вещество включает фибриноген.

Подходящее исходное вещество, содержащее фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, известно специалистам из данной области техники. Примеры включают в плазму крови или фракции плазмы, такие как солюбилизованный криопреципитат плазмы или солюбилизованная масса Фракции I, полученная из плазмы человека или животного или из фракций плазмы, фракции клеточных культур, полученные методами рекомбинантной технологии, фракции, полученные из молока трансгенных животных, и т. д. В соответствии с настоящим изобретением, для использования в качестве исходного вещества также пригодны источники рекомбинантного белка фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF. Если исходное вещество представляет собой плазму или фракцию плазмы, то оно может представлять собой либо объединенные порции донорской плазмы, либо представлять собой плазму от индивидуального донора. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, исходное вещество, содержащее фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, представляет собой солюбилизованный криопреципитат плазмы. Указанный компонент, либо полученный из цельной крови, либо выделенный с помощью афереза, получают путем контролируемого оттаивания свежзамороженной плазмы в диапазоне температур 1-6°C и выделения преципитата. Нерастворимый на холоду осадок вновь замораживают. Одна единица афереза криопреципитата приблизительно эквивалентна 2 единицам криопреципитата, полученного из цельной крови. Она содержит в основном фибриноген, фактор VIII и VWF вместе с другими белками, такими как фактор XIII и фибронектин из свежзамороженной плазмы. Альтернативным источником фибриногена является преципитат Фракции I, которую можно получить из замороженной плазмы оттаиванием и удалением криопреципитата либо центрифугированием, либо фильтрацией.

Полученный криосупернатант затем смешивают с этанолом, чтобы осадить Фракцию I. Например, преципитат Фракции I можно получить, добавляя приблизительно 8% (об./об.) этанола при pH 7,2 и поддерживая температуру на уровне приблизительно -3°C (Cohn, et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 62: 459-475). В одном варианте осуществления настоящего изобретения исходным веществом, содержащим фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, является криопреципитат.

Ссылка в данном описании на "протеазу" может касаться любой протеазы и/или ее профермента, присутствующей в исходном веществе или растворе, содержащем фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, которая при контакте со смолой для HClC способна связываться со смолой для HClC в условиях, когда фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF проходит через смолу. Протеазы могут быть любого типа, в том числе представлять собой серинпротеазы (в частности, плазмин, тромбин, трипсин), треонинпротеазы, цистеинпротеазы (в частности, катепсин В и катепсин Н), аспартатпротеазы (в частности, пепсин), металлопротеазы (в частности, коллагеназы

и желатиназы) и глутаминпротеазы. Если исходное вещество, содержащее фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, получено из плазмы человека или животного, то протеазы/проферменты могут включать плазминоген, тканевой активатор плазминогена (tPA), тромбин, эластазу, фактор VIIa, фактор IXa, фактор Xa, фактор XIa, фактор XIIa, фактор XIIIa, калликреины плазмы и т. п. Что касается растворов, содержащих фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, наиболее предпочтительно удалять такую протеазу/профермент как плазминоген. Другими протеазами/проферментами, которые предпочтительно должны быть удалены из раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, являются tPA, про- и/или активный тромбин (фактор II/IIa).

Когда исходное вещество, содержащее фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, выделяют из надосадочной жидкости клеточной культуры, то протеаза/профермент может включать в себя любую протеазу клетки-хозяина, такую как серинпротеазы (в частности, казеиназы), металлопротеазы (в частности, желатиназы, матричные металлопротеазы (ММР), в том числе ММР3, ММР10 или ММР12), аспарагинпротеазы (катепсин D) и, среди прочих, кислые протеазы.

В некоторых случаях может оказаться желательным удалить примеси или уменьшить уровень примесей в исходном веществе перед пропусканием исходного вещества через смолу для НСИС на стадии (i). Удаление примесей или снижение уровня примесей в исходном веществе может уменьшить нагрузку на смолу для НСИС во

хроматографической очистки и тем самым повысить эффективность отделения плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз от исходного вещества. Примеси могут быть удалены или их содержанием может быть уменьшено, например, путем осаждения фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF из исходного вещества и выделения осажденного белка. Подходящие способы осаждения фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF из исходного вещества, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, известны специалистам из данной области техники. Пример включает добавление суспензии гидроксида алюминия к исходному веществу, что особенно пригодно для удаления из плазмы или криопреципитата плазмы белков, зависящих от витамина К (например, факторов свертывания крови II, VII, IX и X), и других белков, которые обладают аффинностью связывания к гидроксиду алюминия, таких как протромбин (фактор II) и t-PA.

Так, в варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, перед проведением стадии (i) зависящие от витамина К белки удаляют или уменьшают их количество в исходном веществе. В другом варианте осуществления настоящего изобретения зависящие от витамина К белки удаляют или уменьшают их количество путем добавления гидроксида алюминия к исходному веществу. Гидроксид алюминия может быть в форме Alhydrogel[®], который добавляют к исходному веществу до конечной концентрации от приблизительно 10% до приблизительно 80% масс./масс. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гидроксид алюминия добавляют к исходному веществу до конечной концентрации в диапазоне от приблизительно 10% до приблизительно 50% (масс./масс.). В других вариантах осуществления настоящего изобретения гидроксид алюминия добавляют к исходному веществу до конечной концентрации в диапазоне от приблизительно 10% до приблизительно 30% (масс./масс.). В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация составляет от приблизительно 15% до приблизительно 30% (масс./масс.). Наиболее предпочтительно гидроксид алюминия добавляют к исходному веществу в количестве от приблизительно 15% до приблизительно 25% (масс./масс.), с целью оптимального выделения фибриногена и

удаления примесей, таких как протромбин. В другом варианте осуществления настоящего изобретения зависимые от витамина К белки удаляются из исходного вещества путем дозированной адсорбции с использованием гидроксида алюминия.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается раствор, содержащий фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который выделяют по способу настоящего изобретения, как указано в данном описании. В одном варианте осуществления настоящего изобретения уровень плазминогена, и/или активатора тканевого плазминогена, и/или других протеаз в растворе составляет менее чем 20% от общего количества белка, предпочтительно менее чем 10% от общего количества белка, и более предпочтительно менее чем 5% от общего количества белка, или менее чем 1% от общего количества белка, или менее чем 0,1% общего количества белка, или менее чем 0,01% от общего количества белка, или менее чем 0,001% от общего количества белка, или менее чем 0,0001% от общего количества белка. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что уровень плазминогена, и/или активатора тканевого плазминогена, и/или других протеаз, присутствующих в растворе, содержащем фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, может зависеть от предполагаемого использования раствора или длительности его хранения. Например, если раствор предполагается хранить в течение не менее 4 недель при температуре от приблизительно 0°C до приблизительно 8°C, то может оказаться приемлемым, чтобы раствор содержал больше чем приблизительно 10% плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз (от общего количества белка). Если предполагается хранить раствор в течение не менее 4 недель при температуре приблизительно 30°C, то может быть желательным, чтобы раствор содержал менее чем приблизительно 10% плазминогена, и/или активатора тканевого плазминогена, и/или других протеаз (от общего количества белка).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, предлагается раствор, содержащий фибриноген, который выделен по способу настоящего изобретения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения раствор включает, по меньшей мере, 80% фибриногена от общего количества белка.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается раствор, содержащий:

- (a) по меньшей мере, 75% фибриногена от общего количества белка;
- (b) менее чем 50 пг/мг тканевого активатора плазминогена от общего количества белка; и/или
- (c) менее чем 1 мкг/мг плазминогена от общего количества белка.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения раствор дополнительно содержит меньше $1,5 \times 10^{-5}$ ед./мг фактора II от общего количества белка.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается раствор, содержащий:

- (a) по меньшей мере, 90% фибриногена от общего количества белка;
- (b) менее чем 50 пг/мг тканевого активатора плазминогена от общего количества белка; и/или
- (c) менее чем 150 нг/мг плазминогена от общего количества белка.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения раствор дополнительно содержит:

- (a) менее чем $3,5 \times 10^{-6}$ ед./мг фактора II от общего количества белка; и/или
- (b) менее чем 150 мг/мг фибронектина от общего количества белка.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается раствор,

содержащий:

- (a) по меньшей мере, 90% фибриногена от общего количества белка;
- (b) менее чем 50 пг/мг тканевого активатора плазминогена от общего количества белка; и/или

5 (c) менее 10 нг/мг плазминогена от общего количества белка.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается раствор, содержащий:

- (a) по меньшей мере, 90% фибриногена от общего количества белка;
- (b) менее чем 20 пг/мг тканевого активатора плазминогена от общего количества

10 белка; и/или

(c) менее 10 нг/мг плазминогена от общего количества белка.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения раствор дополнительно содержит:

(a) менее чем $2,7 \times 10^{-6}$ ед./мг фактора II от общего количества белка; и/или

15 (b) менее чем 15 мг/мг фибронектина от общего количества белка.

Концентрация фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF в растворе, выделенном с помощью методов, раскрытых в данном описании, и концентрация примесей (в частности, плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз) может быть определена с помощью любых средств, известных специалистам из данной области техники. Примеры подходящих анализов для определения фибриногена описаны Mackie et al. (Br. J. Haematol. 2003 May; 121(3):396-404). Для измерения концентрации фибриногена, и/или фактора VIII, или примеси в растворе, содержащем фибриноген и/или фактор VIII, также может быть использована высокоэффективная эксклюзионная хроматография (см., например, Cardinali et al. 2010, Arch. Biochem. Biophys. 493(2): 157-168; и Kosloski et al. 2009, AAPS J. 11(3); 424-431). ВЭЖХ также позволяет специалисту отделить мономеры и агрегаты фибриногена. Кроме того, концентрация фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF может отличаться в зависимости от чувствительности используемого анализа. Например, концентрация фибриногена в растворе, измеренная с помощью анализа Клаусса, может быть несколько ниже, чем концентрация, измеренная с помощью ВЭЖХ, в том же самом растворе.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытом в данном описании, концентрация мономерного фибриногена в растворе составляет, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% от общего количества белка, как определяют с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая раствор, включающий фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который выделен с помощью способов, раскрытых в данном описании, а также фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие фармацевтически приемлемые носители, в том числе фармацевтически приемлемые разбавители и/или наполнители, известны специалистам из данной области техники. Примеры включают растворители, дисперсионные среды, антибактериальные и противогрибковые агенты, поверхностно-активные вещества, изотонические средства, поглотители и т. п.

45 Фармацевтическую композицию можно также приготовить путем добавления комбинации подходящих стабилизаторов, например, аминокислоты, углевода, соли и детергента. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения стабилизатор представляет собой смесь сахарного спирта и аминокислоты. Стабилизатор

может включать смесь сахара (например, сахарозы или трегалозы), сахарного спирта (например, маннита или сорбита) и аминокислоты (например, пролина, глицина и аргинина). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция включает аминокислоту, такую как аргинин. В других вариантах осуществления настоящего изобретения композиция включает ионы двухвалентного металла с концентрацией до 100 мМ и комплексообразующий агент, как описано в патенте США № 7045601. Конкретные варианты включают композиции от 1 до 7, описанные в примере 1 патента США № 7045601. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения композицию приготавливают без добавления каких-либо антифибринолитических средств или стабилизирующих белков, таких как альбумин. В вариантах осуществления настоящего изобретения, где композиция содержит фибриноген, величина pH предпочтительно равна от приблизительно 6,5 до 7,5, а осмолярность составляет, по меньшей мере, 240 мосмоль/кг.

Перед дозированием и длительным хранением фармацевтический препарат может также быть стерилизован путем фильтрации. Предпочтительно препарат практически полностью сохраняет свои первоначальные характеристики стабильности, по меньшей мере, в течение 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 или более месяцев. Например, препараты, которые хранят при 2-8°C или 25°C, обычно могут в значительной степени сохранять то же распределение молекулярного размера, которое определяют с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, при хранении в течение 6 месяцев или дольше. Конкретные варианты фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут быть стабильными и пригодными для коммерческого использования в фармацевтических целях в течение, по меньшей мере, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев, 36 месяцев или даже дольше при хранении при 2-8°C и/или при комнатной температуре.

Растворы и фармацевтические композиции по настоящему изобретению, приведенные в данном описании, могут быть приготовлены в любой из многих возможных лекарственных форм, таких как составы для инъекций. Препараты и их последующее введение (дозирование) находятся в пределах квалификации специалистов в данной области техники. Дозирование зависит от чувствительности субъекта к лечению, но неизменно продолжается до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект (например, возврат к нормальным уровням фибриногена в плазме). Обычные специалисты смогут легко определить оптимальные дозировки, методы дозирования и частоту повторения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, раскрытого в данном описании, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению имеет объем, равный, по меньшей мере, 5 мл, и содержит, по меньшей мере, 5 мг/мл фибриногена. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция имеет объем, равный, по меньшей мере, 5 мл, и содержит, по меньшей мере, 20 мг/мл фибриногена. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция имеет объем, равный, по меньшей мере, 5 мл фибриногена, и содержит фибриноген с концентрацией приблизительно 20 мг/мл, 25 мг/мл, 30 мг/мл, 35 мг/мл, 40 мг/мл, 45 мг/мл, 50 мг/мл, 55 мг/мл, 60 мг/мл, 65 мг/мл, 70 мг/мл, 75 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл или 100 мг/мл. В соответствии с другим аспектом предлагается сосуд, содержащий, по меньшей мере, 5 мл стабильного фармацевтически приемлемого раствора фибриногена, в котором концентрация фибриногена равна, по меньшей мере, 20 мг/мл.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается способ лечения или предупреждения состояния, связанного с недостаточностью фибриногена,

и/или фактора VIII, и/или VWF, при этом способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который выделен по способу настоящего изобретения, как раскрыто в данном описании, или предлагается фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, раскрытая

5 в данном описании.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается применение раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который выделен по способу настоящего изобретения, как раскрыто в данном описании, для

10 приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или предотвращения состояния, связанного с недостаточностью фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF. Специалистам в данной области техники хорошо знакомы различные типы состояний, связанных с недостаточностью фибриногена, и/или фактора VIII, и/или VWF. В одном варианте осуществления настоящего изобретения связанное с фибриногеном состояние, выбранное из группы, включающей афибриногению,

15 гипофибриногению и дисфибриногению. В одном варианте осуществления настоящего изобретения связанное с фактором VIII и/или VWF состояние выбрано из группы, включающей гемофилию А, нарушение свертываемости крови (в частности, нарушение функции тромбоцитов, тромбоцитопению или болезнь фон Виллебранда), повреждение сосудов, кровотечение вследствие травмы или хирургического

20 вмешательства, кровотечение, вызванное антикоагулянтной терапией, кровотечение, вызванное болезнью печени.

Другие состояния, которые можно лечить с помощью раствора, содержащего фибриноген, и/или фактор VIII, и/или VWF, который выделен в соответствии со способами настоящего изобретения, как раскрыто в данном описании, включают

25 серьезные раны и тяжелые кровотечения и ожоги. В случаях гипофибриногении и афибриногении раствор, содержащий фибриноген, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением, может быть введен внутривенно нуждающемуся в этом пациенту с тем, чтобы компенсировать состояние недостаточности фибриногена, а дозировки могут быть определены специалистом в зависимости от степени

30 недостаточности.

Раствор, содержащий фибриноген, выделенный с помощью способов по настоящему изобретению, также имеет преимущества в использовании фибриновых клеев (также известных как фибриновые герметики), благодаря отсутствию дестабилизирующих

35 уровней плазминогена, и/или тканевого активатора плазминогена, и/или других протеаз. tPA превращает плазминоген в активную форму плазмина, который, в свою очередь, расщепляет фибриновый сгусток и таким образом уменьшает тромбообразование при местном применении (например, для гемостаза).

Фибриновые клеи, как правило, включают два компонента: (i) фибриноген (часто вместе с фактором XIII и ингибитором фибринолиза, таким как апротинин) и (ii) тромбин

40 (часто вместе с ионами кальция). Указанные два компонента вновь растворяют, чтобы приготовить готовый к использованию клей. Фибриновый клей находит клиническое и ветеринарное применение, чтобы имитировать последнюю стадию коагуляции путем образования поперечно сшитых фибриновых волокон, за счет использования комбинации фибриногена и тромбина в присутствии кальция и фактора XIII.

45 Фибриновый клей находит различное применение в терапии и ветеринарии, в том числе для гемостаза, ушивания ран, профилактики сращения и заживления ран. Фибриновый клей также может быть использован, для закрытия ран на коже (в том числе при трансплантации кожи), для герметизации нити для сшивания ран и для связывания

соединительных тканей, таких как кости, хрящи и сухожилия. Таким образом, в соответствии с другим аспектом, раскрытым в данном описании, предлагается фибриновый клей, включающий раствор, содержащий фибриноген, который выделен с помощью способов по настоящему изобретению, как раскрыто в данном описании.

5 Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что в изобретение, приведенное в данном описании, могут быть внесены изменениям и модификации, отличные от тех, которые конкретно приведены в данном описании. Следует понимать, что настоящее изобретение включает все подобные изменения и модификации, которые не противоречат сущности изобретения и находятся в пределах объема настоящего
10 изобретения. Настоящее изобретение также включает все стадии, признаки, композиции и соединения, упомянутые или указанные в данном описании, как индивидуально, так и совместно, а также любые и все комбинации любых двух или нескольких из указанных стадий или признаков.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения будут далее описаны со ссылкой на следующие примеры, которые предназначены только для целей иллюстрации, а не для ограничения объема приведенных выше общих замечаний.

Примеры

Пример 1 - Очистка фибриногена с помощью смол HEA, PPA и MER для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда (HCIC)

20 В качестве исходного вещества используют криопреципитат объединенной порции донорской плазмы человека (т. е. содержащее фибриноген исходное вещество). Вкратце криопреципитат из объединенной порции плазмы солибилизируют в буферном растворе для экстракции, содержащем 20 мМ тринатрийцитрата, 200 мМ эпсилон-аминокапроновой кислоты (ϵ -ACA), 60 межд. ед./мл гепарина и 500 мМ NaCl (pH 7,2 \pm 2)
25 при температуре 31 \pm 2 $^{\circ}$ C в течение 30 мин (1 г криопреципитата на 4 г буферного раствора). Затем к солибализованному криопреципитату добавляют 2%-ый (масс./масс.) гидроксид алюминия до концентрации 25% (масс./масс.). После этого гель гидроксида алюминия удаляют либо центрифугированием, либо глубинной фильтрацией и выделяют содержащий фибриноген супернатант для дальнейшего хроматографической очистки
30 через смолу для HCIC.

Содержащий фибриноген супернатант помещают в хроматографические колонки, заполненные с помощью 1,8 мл либо HEA, PPA, либо смолы MER HypercelTM.

Хроматографические колонки предварительно уравнивают в 25 мМ Tris при различной величине pH в диапазоне от 6,5 до 8,5. Содержащий фибриноген супернатант
35 помещают в хроматографическую колонку при соотношении приблизительно 11 мл на один миллилитр смолы. Очистку с помощью HCIC проводят в отрицательном режиме по отношению к фибриногену, при котором фибриногену дают пройти насквозь вместе с проточной фракцией, в то время как большая часть t-PA, плазминогена и фактора II остается связанной со смолой.

40 На фигурах 1-3 показаны стадии извлечения фибриногена, плазминогена, t-PA и фактора II после хроматографической очистки с помощью HEA HypercelTM, PPA HypercelTM и MER HypercelTM. Результаты показывают, что pH мало влияет или вообще не влияет на связывание плазминогена к указанным смолам, в то время как связывание t-PA со смолами наиболее эффективно в нижнем диапазоне pH. Колонка HEA HypercelTM
45 демонстрирует наиболее высокую степень выделения фибриногена в сквозной фракции, и исследованный рабочий диапазон pH, видимо, оказывает небольшое влияние на выделение фибриногена по сравнению с выделением, которое наблюдается для обеих колонок PPA и MER HypercelTM. Обе колонки PPA и MER демонстрируют наибольшую

степень выделения фибриногена в сквозной фракции при pH 8,5.

Пример 2 - Уровень примесей в растворе фибриногена, сниженный пропусканием через HEA Hypercel

Приблизительно 48,5 мл солюбилизованного криопреципитата, содержащего фибриноген, который получают согласно примеру 1, помещают в колонку HEA Hypercel™ с объемом 5 мл, предварительно уравновешенную в 25 mM Tris при любом из pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 или 8,5. Очистку методом HCIS проводят в отрицательном режиме по отношению к фибриногену, при котором фибриногену дают пройти насквозь вместе с проточной фракцией, в то время как t-PA, плазминоген и фактор II остаются связанными со смолой. Фигура 4а показывает стадии выделения фибриногена, плазминогена, t-PA и фактора II в процессе послехроматографической очистки с использованием HEA Hypercel™. Результаты показывают, что pH оказывает небольшое влияние или вообще не влияет на связывание плазминогена и фактора II смолой для HCIS, в то время как связывание t-PA со смолой оказывается наиболее эффективным в нижнем диапазоне pH 6,5-7,0. Выделение фибриногена составляет больше чем 90% в сквозной фракции в различных условиях pH, несмотря на то, что промывку колонки не проводят. Как показано на фигуре 4а, указанные результаты демонстрируют эффективное удаление протеаз из первичного содержащего фибриноген исходного вещества, такого как солюбилизованный криопреципитат, с помощью смолы для HCIS. Например, экспериментальные условия, осуществленные при pH 7,0, показывают снижение на $\geq 99,9\%$ для фактора II, $88,3\%$ для t-PA и $\geq 98,2\%$ для плазминогена в растворе солюбилизованного криопреципитата.

Фибриноген остается устойчивым в растворе в течение, по меньшей мере, 6 дней при комнатной температуре (приблизительно 20°C). Результаты представлены на фигурах 4b и 4c.

Пример 3 - Уровень примесей в растворе фибриногена, очищенном с помощью HEA Hypercel

Приблизительно 500 мл надосадочной жидкости, содержащей фибриноген, полученной после стадии адсорбции на Alhydrogel™, которую проводят в соответствии с примером 1, помещают в колонку ХК 16/30, заполненную с помощью 36 мл смолы HEA Hypercel™ и предварительно уравновешенную в 25 mM Tris при pH 7,0. Сквозную фракцию собирают для выделения фибриногена, плазминогена, t-PA и фактора II для тестирования. Краткое изложение результатов приводится ниже в таблице 1.

Таблица 1						
	Объем (мл)	Белок (мг/мл)	Фибриноген по Клауссу (мг/мл)	Плазминоген (нг/мл)	t-PA (пг/мл)	Фактор II (ед./мл)
Супернатант фибриногена	500	21,8	16,0	53172,0	1716,5	0,00097
Сквозная фракция	540	17,6	13,2	15655,5	706,7	0,00025
% выделения в сквозной фракции		87,2%	89,1%	31,8%	44,5%	27,8%

Пример 4 - Влияние осаждение глицином на уровень примесей в растворе фибриногена, очищенного с помощью HEA Hypercel

Содержащую фибриноген надосадочную жидкость после стадии адсорбции на альгидрогеле, которую проводят в соответствии с примером 1, подвергают дополнительной стадии осаждения, добавляя солевой раствор, содержащий 2,4 М глицина, 2,7М NaCl, 2,1 mM CaCl₂ и 23 mM тринатрийцитрата (pH 6,6-7,3).

Солюбизованный осадок нагревают до 30°C перед добавлением в содержащий глицин буферный раствор, который также инкубируют при 30°C, при этом соотношение

продукта к буферному раствору составляет 1:2. Смесь перемешивают в течение 10 мин, и полученный осадок извлекают из жидкой фазы центрифугированием. Жидкую фазу, которая преимущественно содержит фибронектин и IgG, отбрасывают, а содержащий фибриноген осадок собирают и вновь суспендируют в солубилизирующем буферном растворе, содержащем 100 мМ NaCl, 1,1 мМ CaCl₂, 10 мМ тринатрийцитрата, 10 мМ трис-(гидроксиметил)метиламина и 4,5 мМ сахарозы (pH 7,0). Промежуточный солубилизованный фибриноген (250 мл) осветляют с помощью 1 мкм фильтра, а затем пропускают через колонку ХК 16/30, заполненную с помощью 36 мл смолы НЕА Нуресел™, которую предварительно уравнивают в 25 мМ Tris, pH 7,0. Сквозную фракцию собирают для выделения фибриногена, плазминогена, t-Ра и фактора II для тестирования, и краткое изложение результатов приводится ниже в таблице 2.

Полученные результаты показывают, что связывание плазминогена, t-Ра и фактора II со смолой НЕА Нуресел™ более эффективно в указанных условиях обработки по сравнению с результатами, наблюдаемыми в условиях, приведенных в примере 2.

Полученные результаты показывают, что степень выделения составляет приблизительно 93% для фибриногена, 6% для плазминогена, 12% для t-Ра и 5% для фактора II.

Таблица 2						
	Объем (мл)	Белок (мг/мл)	Фибриноген по Клауссу (мг/мл)	Плазминоген (нг/мл)	t-РА (нг/мл)	Фактор II (ед./мл)
Солубилизованное промежуточное соединение фибриногена	250,0	29,7	30,3	48457,0	3408,4	0,002
Сквозная фракция	285,2	26,4	24,6	2646,8	984,2	0,00008
% выделения в сквозной фракции		101%	92,6%	6,2%	12,3%	4,6%

Пример 5 - Получение очищенного фибриногена из криопреципитата плазмы

Технологическая операция 1 - Солубилизация криопреципитата плазмы

Технологическая операция 2 - Адсорбция на Alhydrogel™ (гидроксид алюминия) (концентрация Alhydrogel™: целевой продукт от 15 до 20% масс./масс., в пределах от 10 до 50% масс./масс.) солубилизованного криопреципитата плазмы и выделение надосадочной жидкости, содержащей фибриноген, с помощью таких методов, как центрифугирование или глубинная фильтрация в присутствии вспомогательного фильтрующего вещества. В качестве альтернативы данную стадию можно заменить либо стадией хроматографии НСІС в отрицательном режиме (сквозное пропускание) по отношению к фибриногену, либо комбинацией НСІС и анионообменной хроматографии, в обоих случаях в отрицательном режиме по отношению к фибриногену. Если используют комбинацию НСІС и анионообменной хроматографии, то технологическая операция 3 является необязательной.

Технологическая операция 3 - Осаждение фибриногена глицином из содержащей фибриноген надосадочной жидкости с технологической операции 2. В качестве альтернативы данную стадию можно заменить анионообменной хроматографией в отрицательном режиме по отношению к фибриногену.

Технологическая операция 4 - Пропускание солубилизованного осажденного глицином осадка с Технологической операцией 3 через хроматографическую смолу для НСІС в отрицательном режиме по отношению к фибриногену.

Технологическая операция 5 - Обработка очищенного раствора фибриногена, выделенного на стадии 4, с помощью растворителя или моющего средства или пастеризации для инактивации патогенов.

Технологическая операция 6 - Пропускание подвергнутого обработке раствора со

стадии 5 через смолу для анионообменной хроматографии в положительном режиме по отношению к фибриногену, вымывание слабо связанных белков из смолы и элюирование фибриногена из смолы.

Технологическая операция 7 - Нанофильтрация (35 нм или 20 нм или комбинация 35/20 нм) фибриногена, элюированного из анионообменной смолы на стадии 6.

Технологическая операция 8 - Ультрафильтрация (на мембранных фильтрах 50, 100, 200 и 300 кДа) подвергнутого фильтрованию фибриногена со стадии 7.

Пример 6 - Получение очищенного фибриногена с использованием комбинации НСІС и анионообменной хроматографии

Проводят три эксперимента в лабораторном масштабе, в которых получают приблизительно 100 г криопреципитата в соответствии со стадиями, описанными в примерах 1-3, с использованием стадии комбинированной хроматографии на колонке с HEA Hypercel™.

Сквозную фракцию из колонки HEA Hypercel™, которая преимущественно содержит фибриноген, обрабатывают в течение ночи растворителем/моющим средством для инактивации вирусов.

Раствор после инактивации вирусов затем разбавляют до значения <10 мСм/см с помощью 25 мМ Tris (pH 8,0), после чего наносят на анионообменную колонку (ХК 50/30, GE Healthcare), заполненную приблизительно с 412 мл смолы MacroPrep™-HQ, которую предварительно уравнивают с помощью 25 мМ Tris (pH 8,0). Проточную фракцию отбрасывают, а колонку MacroPrep™-HQ промывают 4 объемами колонки с использованием промывочного буфера, содержащего 90 мМ NaCl, 50 мМ Tris, 20 мМ ЕАСА (pH 8,0). В данных условиях проведения хроматографии начальная проточная фракция и промывочная фракция содержат преимущественно плазминоген и t-РА, в то время как фибриноген остается связанным с хроматографической смолой. Мономерную форму фибриногена селективно элюируют из колонки MacroPrep™-HQ, используя в качестве элюента буферный раствор, содержащий 200 мМ NaCl, 10 мМ Tris, 10 мМ тринатрийцитрата, 46 мМ сахарозы и 1,1 мМ CaCl₂ (pH 7,0), и в результате агрегаты фибриногена и низкомолекулярные белки остаются связанными со смолой MacroPrep™-HQ.

Промежуточные продукты, полученные из солюбилизированного криопреципитата путем элюирования через хроматографическую колонку MacroPrep™-HQ, исследуют на содержание фибриногена, t-РА, плазминогена, фибронектина и фактора II и определяют степень выделения для каждого из указанных белков на разных стадиях процесса. Результаты, приведенные в таблице 3, представляют собой средние значения из трех отдельных партий, приготовленных в лабораторных масштабах. Общая степень выделения для фибриногена и совместно очищаемых белков, исходя из криопреципитата плазмы и заканчивая элюатом из MacroPrep™-HQ, приведена на фигуре 5.

Чистота фибриногена, выделенного из хроматографической смолы MacroPrep™-HQ, превышает 95%, как показывает эксклюзионная ВЭЖХ хроматография. Примерный ВЭЖХ профиль фибриногена, проанализированный на приборе TSKgel™ G4000SWXL (Tosoh Corporation), приведен на фигуре 6. Как показано на фигуре 6, мономерный фибриноген элюируется со временем удерживания приблизительно 17,4 мин и составляет 96,6% от общей площади пика, в то время как димер фибриногена и/или другие высокомолекулярные белки элюируются со временем удерживания приблизительно 14,8 мин.

Дальнейшие партии фибриногена изготавливают в экспериментальном масштабе (эквивалент 81 кг плазмы) в соответствии со способом, описанным в примерах 5 и 6.

Характеристики препаратов фибриногена приведены в таблице 4.

Таблица 3												
Стадии процес-са	Белок мг/мл (n=3)		Белок, способ-ный формиро-вать сгустки (n=3)		Плазминоген (n=3)		t-PA (n=3)		Фактор II (n=3)		Фибронектин (n=3)	
	Конц. (мг/мл)	Степень выделе-ния (%)	Конц. (мг/мл)	Степень выделе-ния (%)	Конц. (мкг/мл)	Степень выделе-ния (%)	Конц. (нг/мл)	Степень выделе-ния (%)	Конц. (ед./мл)	Степень выделе-ния (%)	Конц. (мг/мл)	Степень выделе-ния (%)
Солнобилизovaný криопреципитат	31,0		23,5		65,44		9,00		0,28041		8,15	
Фильтрат солнобилизovanного криопреципитата после обработки с помощью Al(OH) ₃	15,8	81%	11,6	80%	39,04	96%	2,20	39%	0,00057	0,3%	3,47	70%
Солнобилизovaný осажденный глицином солевой преципитат	30,3	76%	27,6	95%	45,78	46%	5,55	101%	0,00025	26,0%	3,18	37%
Сквозная фракция HEA Hypercel	22,7	93%	20,5	92%	2,20	6%	0,98	22%	0,00008	39%	2,79	97%
SD инкубирования и хроматография MacroPrep-HQ	7,4	80%	6,7	79%	0,04	5%	0,13	38%	<0,00002	0%	0,09	8%

Таблица 4				
Партия №	1	2	3	4
% белка, способного формировать сгустки	96	94	95	94
tPA на мг белка (пг/мг)	12	24	17	21
Плазминоген на мг белка (пг/мг)	5	6	5	6
Фактор II на мг белка (инт. ед./мг)	$3,3 \times 10^{-7}$	$3,9 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-7}$	$9,6 \times 10^{-7}$

Пример 7 - Фильтрация очищенного фибриногена для удаления вирусов

Способность к фильтрации через 20 нм фильтр для удаления вирусов исследуют для препаратов фибриногена, полученных в соответствии со способом примера 6, где на стадии элюирования из колонки MacroPrep™-HQ используют либо буферный раствор, содержащий 190 мМ NaCl (21,5 мСм/см), 200 мМ NaCl (22,5 мСм/см), 210 мМ NaCl (23,5 мСм/см), либо буферный раствор 200 мМ NaCl, содержащий 1% (масс./масс.) аргинина (25 мСм/см).

Способ заключается в приготовлении препарата, содержащего 3% (масс./масс.) аргинина при pH 7,5 (концентрация белка в образцах равна приблизительно 6 г/л). Приготовленные препараты затем фильтруют с помощью фильтра 0,1 мкм перед проведением стадии фильтрации для удаления вирусов. Стадию фильтрации для удаления вирусов проводят с использованием 47 мм фильтра Pall SV4™ в режиме "тупикового" фронтального фильтрования при постоянном давлении 1,8 бар. Результаты показывают, что препараты фибриногена, полученные из колонки MacroPrep™-HQ с использованием любого из растворов 190 мМ, 200 мМ или 210 мМ дают схожие характеристики фильтрования. Напротив, препарат фибриногена, элюированный из колонки MacroPrep™-HQ с использованием буферного раствора 200 мМ NaCl, содержащего 1% (масс./масс.) аргинина, быстро приводит к загрязнению фильтра (фигура 7).

Пример 8 - Исследование стабильности

Очищенный раствор фибриногена извлекают по способу, приведенному выше в

примере 5, стерилизуют фильтрованием и исследуют на стабильность в течение 9/7 недель при температуре 2°-8°С или 30°С. Жидкий препарат фибриногена, который хранят при 2°-8°С, сохраняет приблизительно 90% от своей первоначальной активности, как измеряют по методу Клаусса после 9 недель хранения. Жидкий препарат фибриногена, который хранят при температуре 30°С, сохраняет приблизительно 70% от своей первоначальной активности после 2-недельного хранения и не теряет в дальнейшем свою активность в течение, по меньшей мере, 5 недель. Дальнейшее снижение активности до уровня ниже 60% наблюдается после 7 недель инкубирования при 30°С. Потерю активности фибриногена при 30°С, вероятно, следует отнести к тепловой денатурации, а не протеолитической деградации, поскольку добавление ингибитора протеазы (С1 эстеразы) не подавляет потерю активности фибриногена после 5-недельного периода хранения. Суммарные данные о стабильности приведены на фигуре 8.

Пример 9 - Снижение с помощью НЕА Hypercel уровней протеаз плазмы в растворе, содержащем фактор VIII и/или VWF

Данный пример показывает, что стадия хроматографии НСІС также может быть использована для уменьшения протеаз в препаратах, содержащих фактор VIII и/или VWF. Способ включает осветление раствора, содержащего фибриноген, который получают в примере 4, с использованием глубинного фильтрования до пропускания осветленного раствора через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда (НСІС). Стадию НСІС проводят в условиях, позволяющих протеазам, таким как плазминоген, связываться со смолой, в то время как фактор VIII и VWF способны проходить через смолу. В частности, колонку ХК 50/30 заполняют с помощью 340 мл смолы НЕА Hypercel™. Колонку предварительно уравнивали в 50 мМ Tris, рН 6,7. Осветленный раствор фибриногена, приготовленный в соответствии с примером 4, затем помещают в колонку и колонку промывают с помощью 50 мМ Tris, рН 6,7. Сквозную фракцию собирают и определяют уровни фактора VIII, VWF, плазминогена и t-PA (VWF:RCo = ристоцетиновый кофактор Виллебранда). Сводка средних результатов, полученных из 4 индивидуальных экспериментов, приведена в таблице 5. Полученные результаты показывают, что хроматографическая стадия НСІС эффективно удаляет такие протеазы, как плазминоген и tPA из фракций, содержащих фактор VIII и VWF. Кроме того, наблюдаются хорошие степени выделения фактора VIII и VWF.

Таблица 5

	Объем (мл)	Фактор VIII (инт. ед./мл)	VWF:RCo (инт. ед./мл)	Плазминоген (нг/мл)	t-PA (пг/мл)
До НЕА Hypercel	3377,7	10,9	11,9	28617,1	2957,4
Сквозная фракция после Hypercel	3949,3	8,7	10,6	1874,0	683,5
% выделения в сквозной фракции		93%	104%	8%	27%

Пример 10 - Сравнительное изучение фибриногена, очищенного различными способами

Препарат фибриногена, приготовленный по способу настоящего изобретения, как описано в примере 6, сравнивают с препаратами фибриногена, приготовленными по способам, описанным в WO 2001048016, WO 2012038410 и WO 2013135684.

(а) Препарат фибриногена, полученный по предпочтительному варианту осуществления способов, раскрытых в WO 2001048016.

Если кратко, то способ включает суспендирование массы Фракции I в экстракционном буферном растворе (0,8М NaCl, 5 мМ ЕАСА (эпсилон-аминокапроновая кислота), 20

мМ Na-цитрата, 60 инт. ед./мл гепарина, pH 7,3) (1 г Фракции I к 8,33 г экстракционного буферного раствора). Затем раствор перемешивают при 37°C в течение 1,5 час и добавляют 50 г 2%-ного раствора $Al(OH)_3$ (Alhydrogel) на грамм Фракции I (10,8%).

Смесь перемешивают в течение 15 минут при комнатной температуре, а затем центрифугируют при 5000 g в течение 10 минут и осадок отбрасывают. К обработанной альгидрогелем надосадочной жидкости добавляют буферный раствор глицин/NaCl (2,1М глицина, 20 мМ Na-цитрата, 3,6М NaCl и 2,4 мМ $CaCl_2$) (оба раствора предварительно уравнивают до 30°C). Добавление надосадочной жидкости к буферному раствору завершают в течение приблизительно 4,5 мин (1 часть надосадочной жидкости на 2,05 частей буферного раствора). Затем смесь перемешивают в течение 20 минут при температуре 30°C и центрифугируют в течение 10 минут при 5010 g (надосадочную жидкость отбрасывают). Затем осадок солибилизируют в буферном растворе D (100 мМ NaCl, 1,1 мМ $CaCl_2$, 10 мМ Na-цитрата, 10 мМ Tris, 45 мМ сахарозы, pH 6,9) при перемешивании при комнатной температуре в течение 2 часов (1/3 объема, который используют для повторного суспендирования Фракции I) (Пример 1, разделы 1.1.1-1.1.6, WO 0148016). Вновь солиблизованный раствор, содержащий фибриноген, затем помещают в колонку MacroPrep™HQ (ХК26 со слоем высотой 20 см). Колонку предварительно уравнивают, по меньшей мере, 1,5 объемами колонки (CV) с помощью буферного раствора MQ (50 мМ Tris, 100 мМ NaCl, 20 мМ EACA, pH 8,0 при 10 мл/мин (113 см/час). Уравнивание продолжают до тех пор, пока величина проводимости после колонки не составит 90-110% от приготовленного буферного раствора. Затем в колонку помещают раствор фибриногена и колонку промывают с помощью 6 CV буферного раствора MQ. Фибриноген элюируется в виде единственного пика с помощью буферного раствора ME (500 мМ NaCl, 1,1 мМ $CaCl_2$, 10 мМ Na-цитрата, 10 мМ Tris и 45 мМ сахарозы, pH 7,0). Колонку можно регенерировать с помощью 2CV 1М раствора NaCl (Пример 2, WO 2001048016).

(b) Препарат фибриногена, полученный по предпочтительному варианту осуществления способов, ранее раскрытых в WO 2012038410 и WO 2013135684.

Криопреципитат, полученный из плазмы известными способами, восстанавливают или растворяют приблизительно при нейтральном значении pH, подвергают адсорбции на $Al(OH)_3$ и образовавшийся гель удаляют путем центрифугирования. Затем инактивируют вирусы в надосадочной жидкости обработкой растворителем/моющим средством (S/D). Используемые S/D соединения, Тритон и TnBP, экстрагируют растительным маслом и водную фазу помещают на Fractogel® EMD-TMAE. Используют такие хроматографические условия (значение pH 6,9-7,1 и осмолярность 570-610 мосмол/л), при которых фибриноген не связывается с гелем и, следовательно, будет найден в проточной фракции или в надосадочной жидкости. К раствору несвязанного фибриногена добавляют глицин (до конечной концентрации 1 моль/л при pH=7,4) и 20 мМ ЭДТК и перемешивают в течение приблизительно 90 мин, чтобы осадить фибриноген. Осадок, содержащий фибриноген, отделяют центрифугированием и получают промежуточную массу фибриногена. Промежуточную массу фибриногена вновь суспендируют в буферном растворе 20 мМ Tris (pH=8,0). Полученную суспензию фильтруют и подвергают ультра/диафильтрации. Полученный раствор, содержащий фибриноген, затем наносят на GigaCap Q-650M® и хроматографический гель или смолу предварительно уравнивают тем же буфером Tris, который используют для повторного суспендирования перед нанесением раствора фибриногена. Слабо связанные

вещества вымывают уравнивающим буферным раствором, а затем промывают промывочным буферным раствором (1,5 г/л цитрата натрия, 6,0 г/л хлорида натрия, рН приблизительно 7,0 и проводимость приблизительно 12,0 мСм/см). После этого фибриноген элюируют из хроматографической колонки с помощью элюирующего 5 буферного раствора (1,5 г/л цитрата натрия и 10,0 г/л глицина, доводят значение рН до той же величины, что и в промывочном буферном растворе, и регулируют величину проводимости, используя приблизительно 7,0 г/л NaCl, до получения значения 13,1-15 мСм/см).

Содержащие фибриноген растворы, полученные способами, раскрытыми в WO 10 2001048016, WO 2012038410 и WO 2013135684, исследуют на содержание общего белка (используя количественный биуретовый анализ содержания белков), фибронектина и плазминогена. Кроме того, образцы испытывают на устойчивость при 2-8°C и 30°C.

Сравнение свойств препаратов фибриногена приведено в таблице 6. Результаты исследования показывают, что фибриноген, приготовленный по способам настоящего 15 изобретения, содержат более низкие уровни плазминогена по сравнению с другими способами.

Таблица 6			
Препараты фибриногена	Способ по примеру 6	Способ по WO 2001048016	Способ по WO 2012038410/ WO 2013135684
Фибронектин (мкг/мг белка)	12	11	0,09
Плазминоген (нг/мг белка)	5	54	791

(57) Формула изобретения

1. Способ снижения уровня по меньшей мере одного белка, выбранного из группы, 25 состоящей из плазминогена и тканевого активатора плазминогена, в растворе, содержащем фибриноген, при этом указанный способ включает:

(i) пропускание исходного вещества, которое представляет собой криопреципитат плазмы человека, включающего по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, через смолу для гидрофобной хроматографии с 30 индуцированным зарядом, уравнивленную при рН 6,5-8,5 в условиях, выбранных таким образом, что по меньшей мере один белок, выбранный из группы, которая включает плазминоген и тканевой активатор плазминогена, присутствующий в исходном веществе, связывается со смолой; и

(ii) выделение раствора криопреципитата, содержащего по меньшей мере один белок, 35 выбранный из группы, которая включает фибриноген, который проходит через смолу, при этом концентрация по меньшей мере одного из белков, выбранных из группы, которая включает плазминоген и тканевой активатор плазминогена, в растворе уменьшается по меньшей мере на 50% по сравнению с исходным веществом, причем смола представляет собой смолу HEA или PPA.

2. Способ снижения уровня по меньшей мере одного белка, выбранного из группы, 40 состоящей из плазминогена и тканевого активатора плазминогена, в растворе, содержащем по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, при этом указанный способ включает:

(i) пропускание исходного вещества, которое представляет собой криопреципитат 45 плазмы человека, содержащего по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом, уравнивленную при рН 6,5-8,5;

(ii) выделение раствора криопреципитата, содержащего по меньшей мере один белок,

выбранный из группы, состоящей из фибриногена, который проходит через первую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом;

(iii) пропускание раствора криопреципитата, который извлекают на стадии (ii), через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом,

5 уравновешенную при pH 6,5-8,5; и

(iv) выделение раствора криопреципитата, содержащего по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, который проходит через вторую смолу для гидрофобной хроматографии с индуцированным зарядом,

10 где условия проведения стадий хроматографии таковы, что по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из плазминогена и тканевого активатора плазминогена, присутствующий в исходном веществе, связывается с первой и/или второй смолой, и где концентрация по меньшей мере одного белка, выбранного из группы, состоящей из плазминогена и тканевого активатора плазминогена, в растворе, который выделяют на стадии (iv), уменьшается по меньшей мере на 50% по сравнению с исходным
15 веществом, причем смола представляет собой смолу HEA или PPA.

3. Способ по п. 2, где первая и вторая смолы для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда одинаковы.

4. Способ по п. 1, дополнительно включающий пропускание раствора, содержащего по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, который
20 выделен на стадии (ii), через смолу для анионообменной хроматографии.

5. Способ по п. 2, дополнительно включающий пропускание раствора, содержащего по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, который выделен на стадии (ii) и/или стадии (iv), через смолу для анионообменной хроматографии.

6. Способ по п. 4, где анионообменная смола представляет собой сильную
25 анионообменную смолу.

7. Способ по п. 4, где фибриноген элюируют из смолы для анионообменной хроматографии с помощью элюирующего буферного раствора, содержащего от приблизительно 150 мМ до приблизительно 300 мМ NaCl.

8. Способ по п. 6, где фибриноген элюируют из смолы для анионообменной
30 хроматографии с помощью элюирующего буферного раствора, содержащего свободную аминокислоту с концентрацией приблизительно 0,5-10% масс./масс, причем свободной аминокислотой является аргинин.

9. Способ по п. 1, где исходное вещество подвергают стадии инактивации вирусов перед проведением стадии (i).

35 10. Способ по п. 1, где раствор, содержащий по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, который выделяют из смолы для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда, подвергают стадии инактивации вирусов.

11. Способ по п. 4, где исходное вещество или раствор, содержащие по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, подвергают стадии
40 инактивации вирусов перед пропусканием через смолу для анионообменной хроматографии.

12. Способ по п. 11, где стадия инактивации вирусов включает пастеризацию или обработку с помощью органического растворителя и моющего средства.

13. Способ по п. 1, где исходное вещество представляет собой солюбилизованный
45 криопреципитат плазмы.

14. Способ по п. 1, где перед проведением стадии (i) из исходного вещества удаляют зависимые от витамина К белки или уменьшают их содержание в исходном веществе.

15. Способ по п. 14, где зависимые от витамина К белки удаляют или уменьшают их

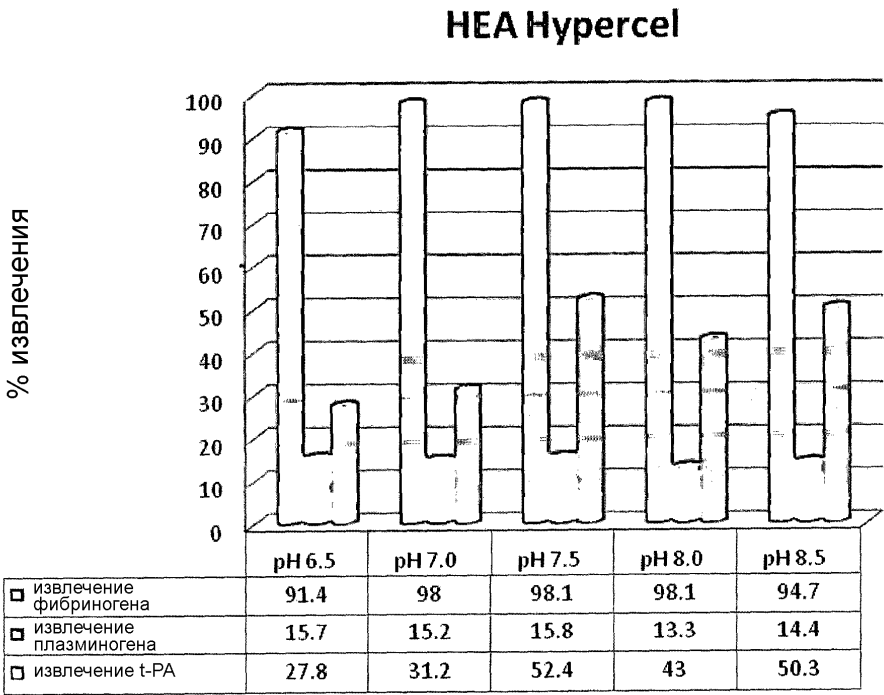
содержание осаждением зависящих от витамина К белков из исходного вещества путем добавления гидроксида алюминия к исходному веществу.

16. Способ по п. 1, дополнительно включающий осаждение по меньшей мере одного белка, выбранного из группы, состоящей из фибриногена, из исходного вещества путем добавления глицина к исходному веществу перед проведением стадии (i), выделение осажденного белка, солюбилизацию осажденного белка и пропускание солюбилизованного белка на стадии (i) через смолу для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда.

17. Способ по п. 1, где исходное вещество или раствор, содержащие по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из фибриногена, который проходит через смолу для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда, имеют рН от приблизительно 6,5 до приблизительно 8,5.

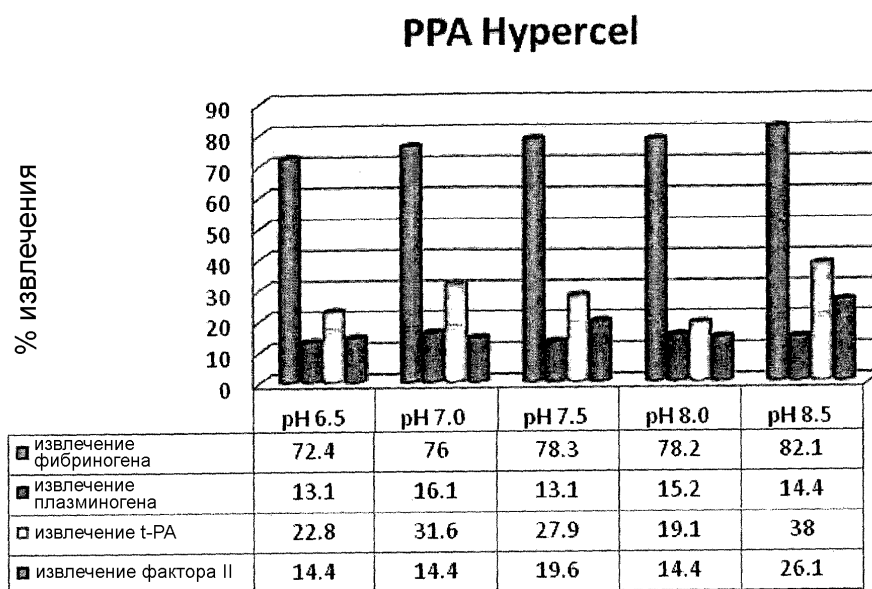
18. Способ по п. 1, где смола для гидрофобной хроматографии с индукцией заряда содержит н-гексиламин.

1

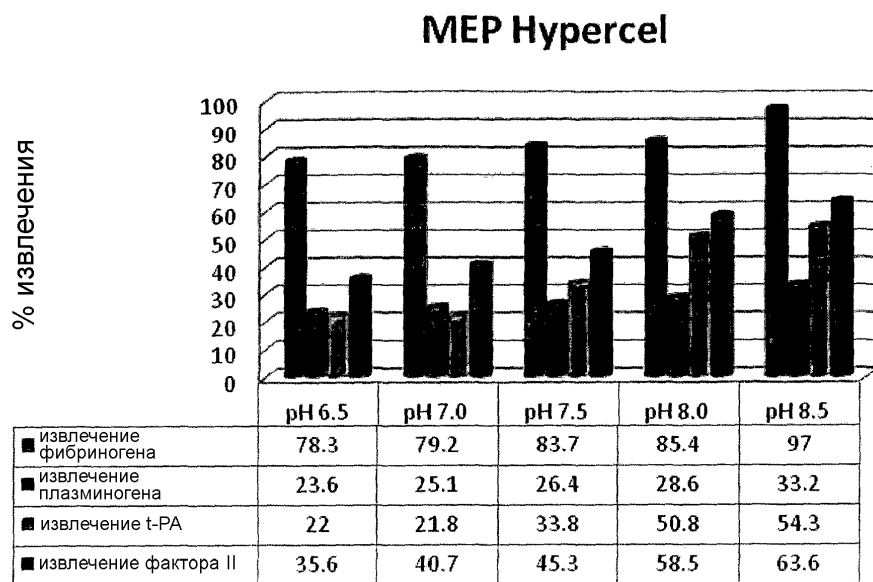


Фиг. 1

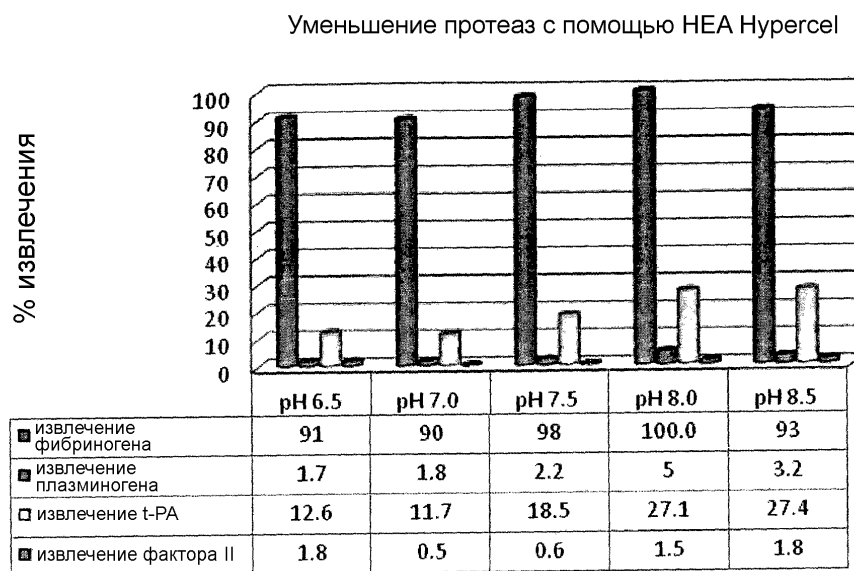
2



Фиг. 2

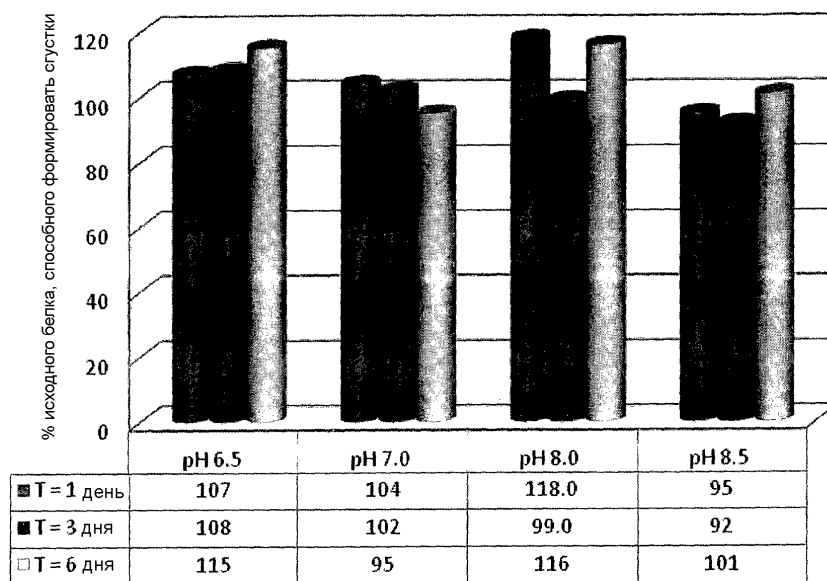


Фиг. 3



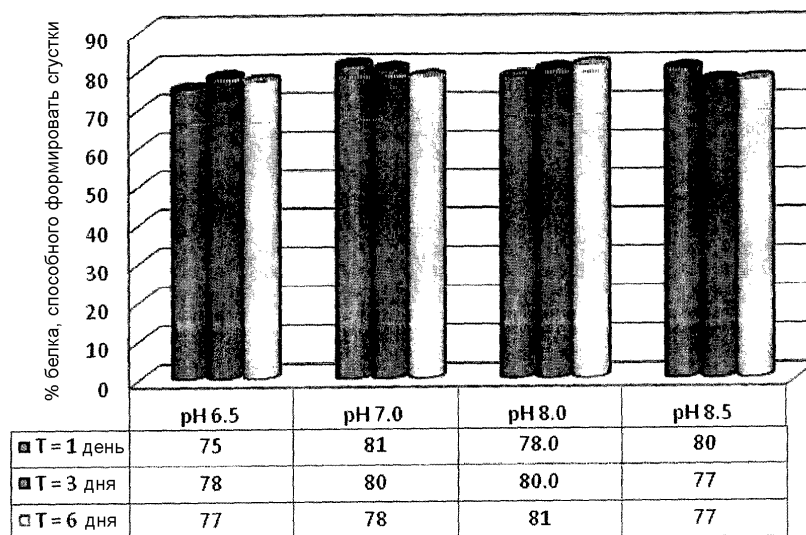
Фиг. 4а

Стабильность солюбилизированного криопреципитата
после адсорбции на HEA Hypercel при комнатной температуре

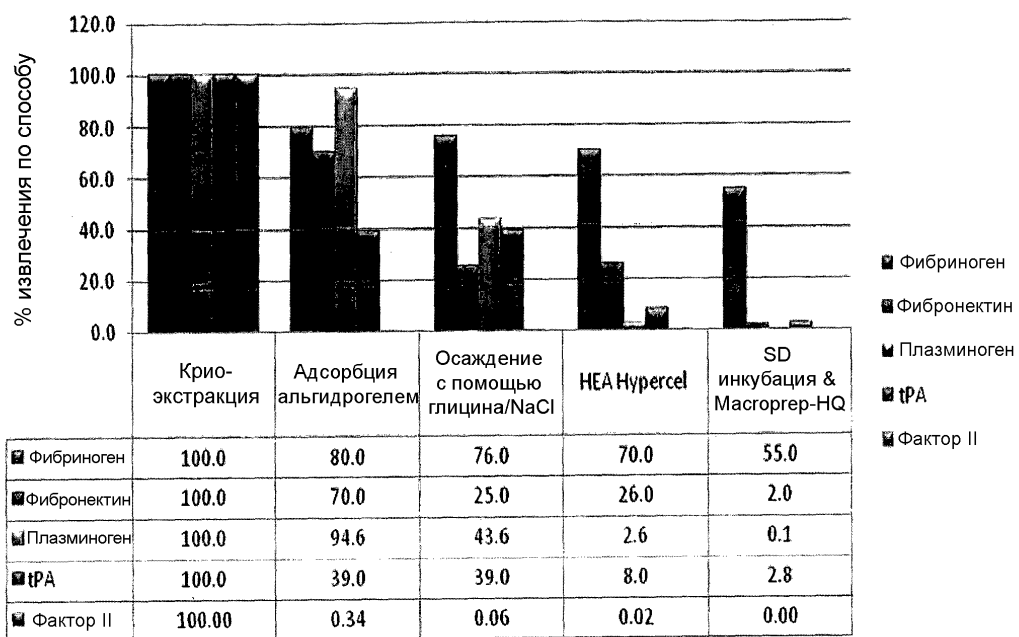


Фиг. 4b

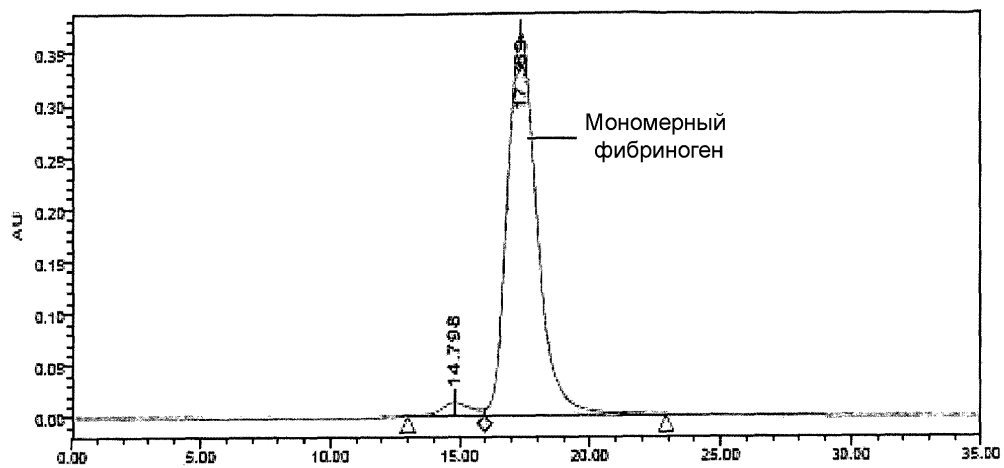
Стабильность солюбилизированного криопреципитата
после адсорбции на HEA Nupersel при комнатной температуре



Фиг. 4с



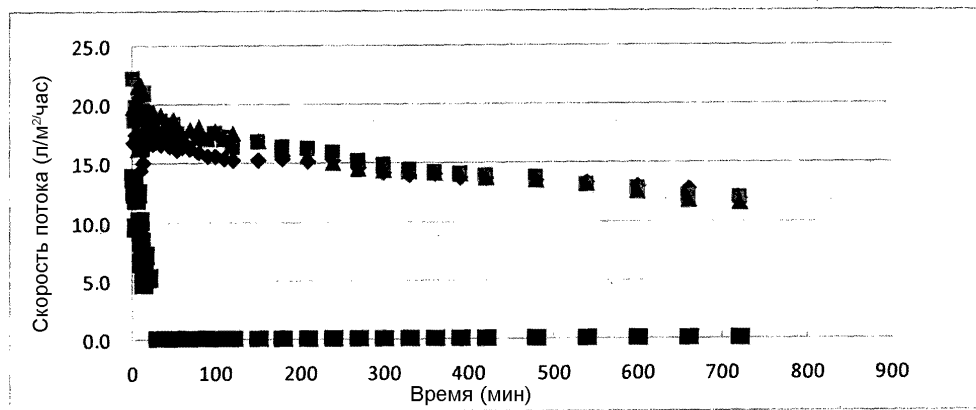
Фиг. 5



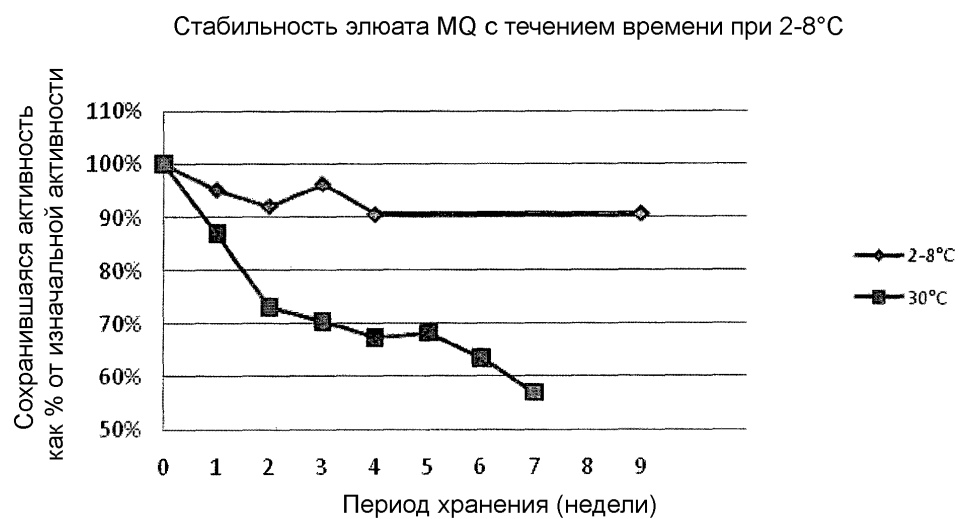
Проявленный канал: 280 нм

	Проявленный канал	Время удержания (мин)	Площадь	% площади	Высота
1	280 нм	14.798	1035217	3.42	12701
2	280 нм	17.369	29360277	96.58	367205

Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8