



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118271391 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 02

(21) 申请号 202410192888.7

(22) 申请日 2017.06.19

(30) 优先权数据

62/351,841 2016.06.17 US

(62) 分案原申请数据

201780041530.2 2017.06.19

(71) 申请人 阿雷克森制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 马克·卡巴兹 帕梅拉·B·康利

卢根民

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理

事务所(普通合伙) 44348

专利代理师 何锦标 张玉颖

(51) Int. Cl.

C07K 1/18 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

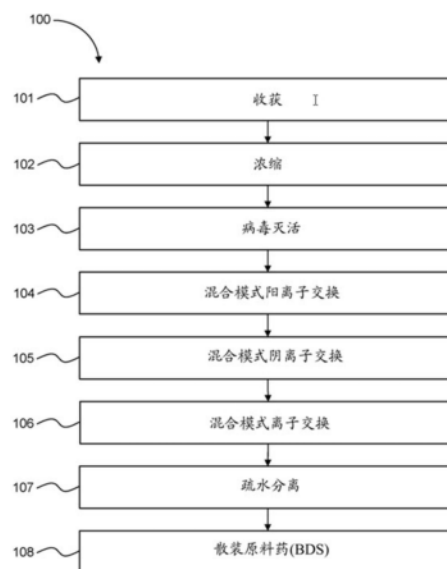
权利要求书3页 说明书19页 附图3页

(54) 发明名称

因子XA衍生物的制备

(57) 摘要

本公开提供了用于大规模制造fXa衍生蛋白从而获得高纯度蛋白质产物的高产率的方法。所述方法可包括将洗涤剂加入含有编码所述蛋白质的多核苷酸构建体的样品中,以及通过基于大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)的亲合色谱、离子交换和混合模式色谱和疏水相互作用来纯化所述蛋白质。



1. 一种用于制备由多核苷酸构建体表达的多肽产物的方法,所述多核苷酸构建体包括SEQ ID NO:7的核酸序列或编码与由SEQ ID NO:7编码的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核酸序列,所述方法包括:

将洗涤剂加入含有所述多核苷酸构建体和由所述多核苷酸构建体表达的多肽产物的样品中;

将所述样品加载到基于大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)的亲和色谱中,并用第一洗脱缓冲液洗脱所述多肽以产生第一洗脱样品,其中所加载的所述样品不含有机溶剂;

将所述第一洗脱样品加载到离子交换和混合模式色谱中,并用包含至少1M无机盐的第二洗脱缓冲液洗脱所述多肽以产生第二洗脱样品;以及

将所述第二洗脱样品加载到疏水相互作用色谱中,并用包含至少2mM氯化钠的第三洗脱缓冲液洗脱所述多肽,

由此制备包含所述多肽产物的纯化的样品。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述洗涤剂包含Triton X-100(聚乙二醇对-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯基醚)。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述第一洗脱缓冲液包含0.5M至2M的精氨酸。

4. 如权利要求3所述的方法,其中所述第一洗脱缓冲液具有约5至5.4的pH。

5. 如任何前述权利要求所述的方法,其中所述离子交换和混合模式色谱包括陶瓷羟基磷灰石I型色谱。

6. 如任何前述权利要求所述的方法,其中所述第二洗脱缓冲液包含至少2M的无机盐。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述无机盐为氯化钠。

8. 如任何前述权利要求所述的方法,其中所述疏水相互作用色谱包括辛基琼脂糖色谱。

9. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包括用阴离子交换色谱的纯化步骤。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述阴离子交换色谱包括Sartobind™离子交换膜。

11. 如任何前述权利要求所述的方法,所述方法还包括用纳米渔网膜过滤器过滤一个或多个所述样品。

12. 如权利要求11所述的方法,其中用所述纳米渔网膜过滤器的所述过滤在将所述样品加载到所述基于STI的亲和色谱之前进行。

13. 如任何前述权利要求所述的方法,其中所述纯化的样品含有小于约1%的不是由所述多核苷酸构建体表达的污染蛋白。

14. 如任何前述权利要求所述的方法,其中所述多肽产物在含有所述多核苷酸构建体的细胞中表达。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述细胞在培养基中在每升培养基产生至少100mg所述多肽产物的条件下生长。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述细胞在培养基中在每升培养基产生至少200mg所述多肽产物的条件下生长。

17. 如权利要求15或16所述的方法,其中所述纯化的样品含有大于约50%的所述培养基中产生的所述多肽产物。

18. 如权利要求15或16所述的方法,其中所述纯化的样品含有大于约100mg的来自每升

所述培养基产品的所述多肽产物。

19. 如任何前述权利要求所述的方法, 其中所述多肽产物是包含轻链和重链的双链多肽。

20. 如权利要求19所述的方法, 其中所述纯化的样品中约20%至50%的所述多肽产物具有由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链。

21. 如权利要求20所述的方法, 其中约5%-95%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的所述重链具有两个O连接的糖基化, 并且约5%-95%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的所述重链具有一个O连接的糖基化。

22. 如权利要求19-21中任一项所述的方法, 其中所述纯化的样品中约40-80%的所述多肽产物具有由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链。

23. 如权利要求22所述的方法, 其中至少约90%的由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的所述重链具有一个O连接的糖基化。

24. 如权利要求19-23中任一项所述的方法, 其中所述纯化的样品中约2%-12%的所述多肽产物具有由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链。

25. 如权利要求19-24中任一项所述的方法, 其中所述纯化的样品中约0.1%-1.5%的所述多肽产物具有由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链。

26. 如权利要求19-25中任一项所述的方法, 其中所述纯化的样品中约2%-8%的所述多肽产物具有由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链。

27. 如权利要求19-26中任一项所述的方法, 其中所述纯化的样品中约35%-60%的所述多肽产物具有由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的轻链。

28. 一种通过如权利要求1-27中任一项所述的方法制备的多肽。

29. 一种药物组合物, 其包含药学上可接受的载体和双链多肽的多肽部分, 其中:

约35%-60%的所述双链多肽具有由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的轻链;

约20%-60%的所述双链多肽具有由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链;

约40%-60%的所述双链多肽具有由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链; 并且

小于10%的所述双链多肽具有由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链。

30. 如权利要求29所述的药物组合物, 其中小于5%的所述双链多肽具有由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链。

31. 如权利要求29所述的药物组合物, 其中小于3%的所述双链多肽具有由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链。

32. 如权利要求29-31中任一项所述的药物组合物, 其中约0.1%-1.5%的所述双链多肽具有由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链。

33. 如权利要求29-32中任一项所述的药物组合物, 其中约2%-8%的所述双链多肽具有由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链。

34. 如权利要求29-33中任一项所述的药物组合物, 其中约30%-70%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的所述重链具有两个O连接的糖基化。

35. 如权利要求29-34中任一项所述的药物组合物, 其中约30%-70%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的所述重链具有一个O连接的糖基化。

36. 如权利要求29-35中任一项所述的药物组合物, 其中至少约90%的由SEQ ID NO:8

的氨基酸序列组成的所述重链具有一个O连接的糖基化。

37. 如权利要求29-36中任一项所述的药物组合物,其中所述制品是冻干的。

38. 如权利要求29-37中任一项所述的药物组合物,其还包含L-精氨酸盐酸盐或L-精氨酸乙酸盐。

39. 如权利要求29-38中任一项所述的药物组合物,其还包含蔗糖。

40. 如权利要求29-39中任一项所述的药物组合物,其还包含甘露糖醇。

41. 一种用于在用因子Xa抑制剂进行抗凝治疗的患者中逆转或抑制抗凝的方法,其包括向所述患者施用权利要求29-40中任一项所述的药物组合物。

## 因子XA衍生物的制备

[0001] 本申请为2019年01月03日进入中国国家阶段、申请号为201780041530.2、申请日为2017年06月19日、发明名称为“因子XA衍生物的制备”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请的交叉引用

本申请要求2016年6月17日提交的美国临时专利申请序列号62/351,841的权益,其各自的内容以引用的方式整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 已经开发了因子Xa (fXa) 蛋白的修饰衍生物,其可用作靶向fXa的抗凝剂的解毒剂。正在开发所述衍生物作为患者的通用逆转剂,所述患者用口服或可注射因子Xa抑制剂进行抗凝并且需要使所述抗凝逆转。

### 发明内容

[0004] 本公开提供了用于大规模制造fXa解毒多肽从而获得高纯度蛋白质产物的高产率的方法。在一个实施方案中,提供了一种用于制备由多核苷酸构建体表达的多肽产物的方法,所述多核苷酸构建体包括SEQ ID NO:7的核酸序列或编码与由SEQ ID NO:7编码的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核酸序列。所述方法可包括将洗涤剂加入含有多核苷酸构建体的样品中,以及通过基于大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)的亲和色谱、离子交换和混合模式色谱和/或疏水相互作用来纯化所编码的解毒蛋白。

[0005] 在一个实施方案中,提供了一种用于制备由多核苷酸构建体表达的多肽产物的方法,所述多核苷酸构建体包括SEQ ID NO:7的核酸序列或编码与由SEQ ID NO:7编码的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核酸序列,所述方法包括将洗涤剂加入含有多核苷酸构建体和由多核苷酸构建体表达的多肽产物的样品中;将样品加载到基于大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)的亲和色谱中,并用第一洗脱缓冲液洗脱多肽以产生第一洗脱样品,其中所加载的样品不含有机溶剂;将第一洗脱样品加载到离子交换和混合模式色谱中,并用包含至少1M无机盐的第二洗脱缓冲液洗脱多肽以产生第二洗脱样品;以及将第二洗脱样品加载到疏水相互作用色谱中,并用包含至少2mM氯化钠的第三洗脱缓冲液洗脱多肽,由此制备包含多肽产物的纯化的样品。

[0006] 在一些实施方案中,洗涤剂包含Triton X-100 (聚乙二醇对-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯基醚)。在一些实施方案中,第一洗脱缓冲液包含0.5M至2M精氨酸。在一些实施方案中,第一洗脱缓冲液具有约5至5.4的pH。在一些实施方案中,离子交换和混合模式色谱包括陶瓷羟基磷灰石I型色谱。

[0007] 在一些实施方案中,第二洗脱缓冲液包含至少2M的无机盐。在一些实施方案中,无机盐为氯化钠。在一些实施方案中,疏水相互作用色谱包括辛基琼脂糖凝胶色谱。

[0008] 在一些实施方案中,所述方法还包括用阴离子交换色谱的纯化步骤。在一些实施方案中,阴离子交换色谱包含Sartobind™离子交换膜。

[0009] 在一些实施方案中,所述方法还包括用纳米渔网膜(nanofleece)过滤器过滤一个

或多个样品。在一些实施方案中,用纳米渔网膜过滤器的过滤在将样品加载到基于STI的亲色和色谱之前进行。

[0010] 在一些实施方案中,纯化的样品含有小于约1%的不是由多核苷酸构建体表达的污染蛋白。在一些实施方案中,多肽产物在含有多核苷酸构建体的细胞中表达。在一些实施方案中,细胞在培养基中在每升培养基产生至少100mg多肽产物的条件下生长。在一些实施方案中,细胞在培养基中在每升培养基产生至少200mg多肽产物的条件下生长。在一些实施方案中,纯化的样品含有大于约50%的培养基中产生的多肽产物。在一些实施方案中,纯化的样品含有大于约100mg来自每升培养基产品的多肽产物。

[0011] 在一些实施方案中,多肽产物是包含轻链和重链的双链多肽。在一些实施方案中,纯化的样品中约20%至50%的多肽产物具有由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,约5%-95%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链具有两个O连接的糖基化,并且约5%-95%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链具有一个O连接的糖基化。在一些实施方案中,纯化的样品中约40%-80%的多肽产物具有由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,至少约90%的由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链具有一个O连接的糖基化。在一些实施方案中,纯化的样品中约2%-12%的多肽产物具有由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,纯化的样品中约0.1%-1.5%的多肽产物具有由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,纯化的样品中约2%-8%的多肽产物具有由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,纯化的样品中约35%-60%的多肽产物具有由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的轻链。

[0012] 在一个实施方案中,还提供了通过所述实施方案中任一项所述的方法制备的多肽。

[0013] 在一个实施方案中,提供了一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体和双链多肽的多肽部分,其中:约35%-60%的双链多肽具有由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的轻链;约20%-60%的双链多肽具有由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链;约40%-60%的双链多肽具有由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链;并且小于10%的双链多肽具有由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链。

[0014] 在一些实施方案中,小于5%的双链多肽具有由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,小于3%的双链多肽具有由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,约0.1%-1.5%的双链多肽具有由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,约2%-8%的双链多肽具有由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,约30%-70%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链具有两个O连接的糖基化。在一些实施方案中,约30%-70%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链具有一个O连接的糖基化。在一些实施方案中,至少约90%的由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链具有一个O连接的糖基化。

[0015] 在一些实施方案中,将制品冻干。在一些实施方案中,组合物还包含L-精氨酸盐酸盐或L-精氨酸乙酸盐。在一些实施方案中,组合物还包含蔗糖。在一些实施方案中,组合物还包含甘露糖醇。

[0016] 在一个实施方案中,还提供了一种用于在用因子Xa抑制剂进行抗凝治疗的患者中

逆转或抑制抗凝的方法,其包括向患者施用本公开的实施方案中任一项所述的药物组合物。

## 具体实施方式

### [0017] 定义

以下描述阐述了本技术的示例性实施方案。然而,应当认识到,此类描述并非旨在限制本公开的范围,而是作为示例性实施方案的描述而提供。

[0018] 所有数字指示,例如pH、温度、时间、浓度以及分子量(包括范围)都是变化(+)或(-)0.1%或10%的增量的近似值。应当了解,尽管并非总是明确说明,但是在所有数字指示之前都有术语“约”。还应当了解,尽管并非总是明确说明,但是本文所述的试剂仅仅是示例性的并且这些试剂的等同物是本领域已知的。

[0019] 除非上下文另外明确规定,否则如在本说明书和权利要求书中所用,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数个提及物。例如,术语“一种药学上可接受的载体”包括多种药学上可接受的载体,包括其混合物。

[0020] 如本文所用,术语“包含”意图是指组合物和方法包括所述要素,但不排除其他要素。“基本上由……组成”在用于限定组合物和方法时应当意指排除对用于预期用途的组合具有任何其他意义的其他要素。因此,基本由本文定义的要素组成的组合物将不排除来自分离和纯化方法的痕量杂质和药学上可接受的载体,诸如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等等。“由……组成”应当意指排除超过痕量的其他成分的要素和用于施用本公开的组合物基本方法步骤。由这些过渡术语中的每一个所限定的实施方案落入本公开的范围。

[0021] 术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用,并且在其最广泛的意义上,是指两个或更多个亚单位氨基酸、氨基酸类似物或肽模拟物的化合物。所述亚单位可通过肽键连接。在另一个实施方案中,亚单位可通过其他键连接,例如酯、醚等。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸并且可构成蛋白质的序列或肽的序列的氨基酸的最大数量没有限制。如本文所用,术语“氨基酸”是指天然氨基酸和/或非天然或合成氨基酸,所述氨基酸包括甘氨酸以及D型光学异构体和L型光学异构体两者、氨基酸类似物以及拟肽。天然存在的氨基酸的单字母缩写和三字母缩写列于下文中。

[0022] “因子Xa”或“fXa”或“fXa蛋白”是血液凝固途径中的丝氨酸蛋白酶,其由无活性的因子X(fX, SEQ ID NO.1, 表1)产生。编码人类因子X(“fX”)的核苷酸序列可以登录号“NM\_000504”在基因库中找到。在催化裂解重链的开头52个残基时,fX被活化成fXa。fXa含有轻链和重链。轻链的开头45个氨基酸残基(SEQ ID NO.1的残基1至45)被称为G1a结构域,因为它含有11个翻译后修饰的 $\gamma$ -羧基谷氨酸残基(G1a)。它还含有短的(6个氨基酸残基)芳族堆叠序列(SEQ ID NO.1的残基40-45)。胰凝乳蛋白酶消化选择性地去除第1-44个残基,从而产生无G1a结构域的fXa。fXa的丝氨酸蛋白酶催化结构域位于C末端重链处。fXa的重链与其他丝氨酸蛋白酶(诸如凝血酶、胰蛋白酶和活化的蛋白C)是高度同源的。

[0023] “天然fXa”或“野生型fXa”是指天然存在于血浆中或以其原始未修饰的形式分离的fXa,所述fXa处理活化凝血酶原的生物活性,因此促进血凝块的形成。所述术语包括从组织样品中分离的天然存在的多肽以及重组产生的fXa。“活性fXa”是指具有活化凝血酶原的促凝血活性的fXa。“活性fXa”可以是天然fXa或保留促凝血活性的修饰的fXa。

[0024] 如本文所用,“fXa解毒剂”、“解毒剂”或“fXa衍生物”是指修饰的fXa蛋白,其在组装成凝血酶原酶复合物方面不与fXa竞争,并且具有降低的促凝血活性或没有促凝血活性,并且还结合和/或大致上中和抗凝剂,诸如fXa抑制剂。在一些方面,fXa蛋白或fXa衍生物的“促凝血活性”是指野生型活性fXa多肽所携带的酶活性。fXa衍生物的实例在美国专利号8,153,590和PCT公开W02009/042962和W02010/056765中提供,并且在本文进一步提供,诸如SEQ ID NO:2和3以及其生物等同物。

[0025] fXa多肽或其衍生物的“酶活性”是指多肽通过与底物直接相互作用催化与所述底物的生化反应的能力。

[0026] SEQ ID NO:2相对于野生型fXa含有3个突变。第一个突变是fX的G1a结构域中6-39aa的缺失。第二个突变是用-RKR-替换活化肽序列143-194aa。这产生了连接轻链(SEQ ID NO:4)和重链(SEQ ID NO:5)的-RKRRKR-(SEQ ID NO:6)接头。在分泌时,此接头被裂解,从而产生双链多肽SEQ ID NO:3(r-解毒剂)。第三个突变是活性位点残基S379突变成Ala残基。此氨基酸取代分别对应于SEQ ID NO:1和3的氨基酸296和290。

[0027] 解毒剂的实例是“r-解毒剂”,其是指在裂解接头后,SEQ ID NO:2的加工的双链多肽加工产物。这由SEQ ID NO:3表示。r-解毒剂公开于例如US 8,153,590中,其内容以引用的方式并入本公开。r-解毒剂包括轻链(SEQ ID NO:4)和重链(SEQ ID NO:5),其与轻链的半胱氨酸98(Cys98)和重链的半胱氨酸108(Cys108)之间的单个二硫键连接。如同野生型fXa,在某些生产批次中,所述r-解毒剂经历翻译后修饰,从而引起某些氨基酸残基处的糖基化,例如所述轻链的Ser56、Ser72、Ser76和Thr82以及所述重链的Thr249,和所述轻链的修饰残基,即Asp29处的(3R)-3-羟基Asp。此外,除了链间二硫键之外,在所述轻链的半胱氨酸16与27、21与36、38与47、55与66、62与75和77与90之间以及在所述重链的半胱氨酸7与12、27与43、156与170和181与209之间还可以形成链内二硫键。

[0028] 表1.无活性的人类因子X的多肽序列(SEQ ID NO:1)

|     |            |            |            |            |             |             |
|-----|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 1   | ANSFLEEMKK | GHLERECMEE | TCSYEEAREV | FEDSDKTNEF | WNKYKDGQDC  | ETSPCQNQGK  |
| 61  | CKDGLGEYTC | TCLEGFEGKN | CELFTKRLCS | LDNGDCDQFC | HEEQNSVVCS  | CARGYTLADN  |
| 121 | GKACIPTGPY | PCGKQTLERR | KRSVAQATSS | SGEAPDSITW | KPYDAADLDP  | TENPFDLLDF  |
| 181 | NQTQPERGDN | NLTRIVGGQE | CKDGECPWQA | LLINEENEGF | CGGTILSEFY  | ILTAAHCLYQ  |
| 241 | AKRFKVRVGD | RNTEQEEGGE | AVHEVEVVIK | HNRFTKETYD | FDIAVLRLLKT | PITFRMNVAP  |
| 301 | ACLPERDWAE | STLMTQKTGI | VSGFGRTHEK | GRQSTRLKML | EVPLYVDRNSC | KLSSSFIIITQ |
| 361 | NMFCAGYDTK | QEDACQGDAG | GPHVTRFKDT | YFVTGIVSWG | EGCARKGKYG  | IYTKVTAFLK  |
| 421 | WIDRSMKTRG | LPAKASHAPE | VITSSPLK   |            |             |             |

表2.在去除-RKRRKR-(SEQ ID NO:6)接头之前r-解毒剂前体的多肽序列(SEQ ID NO:2)

|                  |            |            |            |            |             |                       |
|------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----------------------|
| 轻链(SEQ ID NO: 4) |            |            |            |            |             |                       |
| 1                | ANSFL      |            |            |            | F           | WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK |
| 61               | CKDGLGEYTC | TCLEGFEGKN | CELFTKRLCS | LDNGDCDQFC | HEEQNSVVCS  | CARGYTLADN            |
| 121              | GKACIPTGPY | PCGKQTLER  |            |            |             |                       |
| 接头(SEQ ID NO: 6) |            |            |            |            |             |                       |
|                  | RKRRKR     |            |            |            |             |                       |
| 重链(SEQ ID NO: 5) |            |            |            |            |             |                       |
| 181              |            | IVGGQE     | CKDGECPWQA | LLINEENEGF | CGGTILSEFY  | ILTAAHCLYQ            |
| 241              | AKRFKVRVGD | RNTEQEEGGE | AVHEVEVVIK | HNRFTKETYD | FDIAVLRLLKT | PITFRMNVAP            |
| 301              | ACLPERDWAE | STLMTQKTGI | VSGFGRTHEK | GRQSTRLKML | EVPLYVDRNSC | KLSSSFIIITQ           |
| 361              | NMFCAGYDTK | QEDACQGDAG | GPHVTRFKDT | YFVTGIVSWG | EGCARKGKYG  | IYTKVTAFLK            |
| 421              | WIDRSMKTRG | LPAKASHAPE | VITSSPLK   |            |             |                       |

表3在去除-RKRRKR-(SEQ ID NO:6)接头之后人类因子Xa三重突变体的多肽序列(SEQ ID NO:3)

|                                                                        |                         |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 轻链 (SEQ ID NO: 4)                                                      |                         |
| 1 ANSFL                                                                | F WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK |
| 61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCs LDNGDCDQFC HEEQNSVVCs CARGYTLADN   |                         |
| 121 GKACIPTGPY PCGKQTLER                                               |                         |
| 重链 (SEQ ID NO: 5)                                                      |                         |
| 181 IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ                 |                         |
| 241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP |                         |
| 301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKML EVPYVDRNSC KLSSTFIITQ   |                         |
| 361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK  |                         |
| 421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK                                     |                         |

表4. 编码r-解毒剂前体的核苷酸序列 (SEQ ID NO:7)

|             |            |            |            |            |             |            |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| ATGGGGCGCC  | CACTGCACCT | CGTCCTGCTC | AGTGCCTCCC | TGGCTGGCCT | CCTGCTGCTC  | GGGAAAAGTC |
| TGTTTCATCCG | CAGGGAGCAG | GCCAACAACA | TCCTGGCGAG | GGTCACGAGG | GCCAATTCCT  | TTCTTTTCTG |
| GAATAAATAC  | AAAGATGGCG | ACCAGTGTGA | GACCAATCCT | TGCCAGAAC  | AGGGCAAATG  | TAAAGACGGC |
| CTCGGGGAAT  | ACACCTGCAC | CTGTTTAGAA | GGATTGGAAG | GCAAAAAGT  | TGAATTATTC  | ACACGGAAGC |
| TCTGCAGCCT  | GGACAACGGG | GACTGTGACC | AGTTCTGCCA | CGAGGAACAG | AACTCTGTGG  | TGTGCTCCTG |
| CGCCCGCGGG  | TACACCTTGG | CTGACAACGG | CAAGGCCTGC | ATTCCACAG  | GGCCCTACCC  | CTGTGGGAAA |
| CAGACCTTGG  | AACGCAGGAA | GAGGAGGAAG | AGGATCGTGG | GAGGCCAGGA | ATGCAAGGAC  | GGGAGTGTG  |
| CCTGGGAGGC  | CCTGCTCATC | AATGAGGAAA | ACGAGGGTTT | CTGTGGTGGA | ACCATTTCTGA | GCGAGTTCTA |
| CATCTTAACG  | GCAGCCCACT | GTCTCTACCA | AGCCAAGAGA | TTCAAGGTGA | GGGTAGGGGA  | CCGGAACACG |
| GAGCAGGAGG  | AGGGCGGTGA | GGCGGTGCAC | GAGGTGGAGG | TGGTCATCAA | GCACAACCGG  | TTCAAAAAGG |
| AGACCTATGA  | CTTCGACATC | GCCGTGCTCC | GGCTCAAGAC | CCCCATCACC | TTCCGCATGA  | ACGTGGCGCC |
| TGCCTGCCTC  | CCCGAGCGTG | ACTGGGCCGA | GTCCACGCTG | ATGACGCAGA | AGACGGGGAT  | TGTGAGCGGC |
| TTCCGGGCGCA | CCCACGAGAA | GGGCCGGCAG | TCCACCAGGC | TCAAGATGCT | GGAGGTGCCC  | TACGTGGACC |
| GCAACAGCTG  | CAAGCTGTCC | AGCAGCTTCA | TCATCACCCA | GAACATGTTT | TGTGCCGGCT  | ACGACACCAA |
| GCAGGAGGAT  | GCCTGCCAGG | GGGACGCAGG | GGGCCCGCAC | GTCAACCGCT | TCAAGGACAC  | CTACTTCGTG |
| ACAGGCATCG  | TCAGCTGGGG | AGAGGGCTGT | GCCCGTAAAG | GGAAGTACGG | GATCTACACC  | AAGGTACCCG |
| CCTTCCTCAA  | GTGGATCGAC | AGGTCCATGA | AAACCAGGGG | CTTGCCCAAG | GCCAAGAGCC  | ATGCCCCGGA |
| GGTCATAACG  | TCCTCTCCAT | TAAAGTGA   |            |            |             |            |

其他示例解毒剂可以是r-解毒剂(或其前体,由SEQ ID NO:2表示)的生物等同物,或者可选地是与SEQ ID NO:3具有某些序列同一性的多肽。一方面,此类生物等同物保留SEQ ID NO:3的结构特征,即修饰的活性位点以及缺失或修饰的Gla结构域。另一方面,此类生物等同物保留SEQ ID NO:3的功能特征,即在组装成凝血酶原酶复合物方面不与fXa竞争并且具有降低的促凝血活性(例如酶活性或催化活性)或没有促凝血活性(例如酶活性或催化活性)。

[0029] 术语“活性位点”是指酶或抗体中发生化学反应的部分。“修饰的活性位点”是如下的活性位点,其在结构上已被修饰以为所述活性位点提供增加或降低的化学反应性或特异性。活性位点的实例包括但不限于人类因子X的包含第235-488个氨基酸残基的催化结构域以及人类因子Xa的包含第195-448个氨基酸残基的催化结构域。修饰的活性位点的实例包括但不限于人类因子Xa的包含SEQ ID NO:1中的第195-448个氨基酸残基的催化结构域,其中在位置Arg306、Glu310、Arg347、Lys351、Lys414或Arg424处具有至少一个氨基酸取代。

#### [0030] 解毒剂的制备

实验实施例(实施例1和2)证明了用于制备fXa解毒剂的培养和纯化方法的发展。培养的细胞包括多核苷酸构建体,其包含SEQ ID NO:7的核酸序列或编码与由SEQ ID NO:7所编码的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性)的氨基酸序列的核酸序列。细胞通常是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0031] 一种纯化方法在图1中示出。在将细胞收获(步骤101)并使用深度过滤器澄清以去除高分子量(HWM)杂质之后,将样品浓缩(例如约10倍)(步骤102)。浓缩步骤可使用再生纤

生素,但不限于此。在步骤103,可进行病毒灭活(例如用洗涤剂/溶剂;诸如1% Triton X-100、0.3%磷酸三丁酯(终浓度))以使细胞培养物中的包膜病毒灭活。去除病毒之后,进行步骤104(混合模式阳离子交换)、105(混合模式阴离子交换)和106(混合模式离子交换)来去除宿主细胞蛋白质和DNA并捕获解毒剂。在步骤107,可使用疏水相互作用树脂来进一步去除剩余的宿主细胞蛋白质。任选地,在这些纯化步骤之后,可使用最终的病毒去除过滤步骤来去除任何剩余的病毒。

[0032] 在另一个实施方案中,纯化过程如图2所示并在实施例2中展示。在一些实施方案中,所述方法包括将洗涤剂加入含有多核苷酸构建体(例如,SEQ ID NO:7)和由多核苷酸构建体表达的多肽产物(例如,SEQ ID NO:3)的样品中。在一些实施方案中,洗涤剂包括Triton X-100。在一些实施方案中,在样品经历随后的亲和纯化之前,没有溶剂用于处理样品。在一些实施方案中,在样品经历随后的亲和纯化之前,没有有机溶剂用于处理样品。在一些实施方案中,在样品经历随后的亲和纯化之前,未向样品中加入磷酸三丁酯。

[0033] 在一些实施方案中,然后将样品加载到基于大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)的亲和色谱中,并用洗脱缓冲液洗脱以产生洗脱的样品。在一些实施方案中,加载的样品未用有机溶剂处理或不含有有机溶剂。

[0034] “STI”或“大豆胰蛋白酶抑制剂”是指从大豆中分离的胰蛋白酶抑制剂或其生物等同物。胰蛋白酶抑制剂的大小为约20kDa,并且降低胰蛋白酶(蛋白水解酶)以及血浆激肽释放酶、因子Xa和纤溶酶活性。STI可从诸如Life Technologies(Grand Island,NY)的供应商处商购获得。STI的一个实例是来自大豆(*Glycine max*)的KTI3 Kunitz胰蛋白酶抑制剂,其GenBank登录号为NP\_001238611。

[0035] STI可被固定在固体支持树脂上,用于纯化某些蛋白质。除了大豆胰蛋白酶抑制剂之外,还可使用其他胰蛋白酶抑制剂蛋白,诸如从血清、利马豆、牛胰腺或卵类粘蛋白中分离的胰蛋白酶抑制剂蛋白或其修饰形式。还涵盖某些蛋白酶抑制剂,具体地是丝氨酸蛋白酶抑制剂,其可用于制备用于纯化解毒剂目的的亲和树脂。然后可用含有精氨酸的缓冲液洗脱解毒剂。在一些实施方案中,洗脱缓冲液包含至少0.2M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1M、1.1M、1.2M、1.3M、1.4M、1.5M或2M的精氨酸。在一些实施方案中,洗脱缓冲液包含约0.5M至2M的精氨酸,或约0.7M至1.5M的精氨酸,或0.8M至1.2M的精氨酸。在一些实施方案中,洗脱缓冲液的pH为约4.5至6、或4.6至5.6、或4.7至5.5、或4.8至5.4、或5至5.4、或5.1至5.3、或约5.2。在一个实施方案中,洗脱缓冲液包含25mM乙酸钠、1.0M精氨酸,pH 5.2。

[0036] 在一些实施方案中,然后将样品加载到离子交换和混合模式色谱中。离子交换和混合模式色谱的非限制性实例包括陶瓷羟基磷灰石I型色谱。然后可以用包含无机盐的洗脱缓冲液洗脱样品。在一些实施方案中,无机盐是氯化钠或氯化钾。在一些实施方案中,洗脱缓冲液中盐的浓度为至少0.5M、1M、1.5M、2M、2.5M或3M。

[0037] 在一些实施方案中,洗脱需要使用在平衡缓冲液与洗脱缓冲液之间产生的梯度。在一些实施方案中,平衡缓冲液包括较低浓度的盐,例如小于0.2M、小于0.1M、小于50mM、小于20mM、小于10mM。在一些实施方案中,梯度包括盐浓度增加至少5倍、或10倍、或20倍、或50倍、或100倍。在一些实施方案中,平衡缓冲液包含50mM的MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)、5mM的磷酸钠,pH 7.0。在一些实施方案中,洗脱缓冲液包含50mM的MES、5mM的磷酸钠、2M的氯化钠,pH 7.0。在一些实施方案中,梯度以约90%的平衡缓冲液开始,并以约90%的洗脱缓冲

液结束。

[0038] 在一些实施方案中,将样品进一步加载到疏水相互作用色谱中。在一些实施方案中,疏水相互作用色谱包括辛基琼脂糖凝胶色谱。在一些实施方案中,用洗脱缓冲液洗脱样品,所述洗脱缓冲液包含至少2mM的氯化钠,或者可选地至少1M、1.5M、2.5M、3M、4M或5M的氯化钠。

[0039] 在一些实施方案中,用阴离子交换色谱进一步对上述中间样品之一进行纯化步骤。在一些实施方案中,阴离子交换色谱包含Sartobind™离子交换膜。在一些实施方案中,在亲和色谱之后施加阴离子交换色谱。

[0040] 在一些实施方案中,用纳米渔网膜过滤器进一步对上述中间样品之一进行过滤。在一些实施方案中,施加纳米渔网膜过滤之后,将样品加载到基于STI的亲和色谱中。

[0041] 在一些实施方案中,纯化的样品含有少于约1%的不是由多核苷酸构建体表达的污染蛋白,诸如宿主细胞蛋白或从亲和树脂/柱释放的STI。

[0042] 上述实施方案中任一项的纯化过程能够回收至少约50% (或至少约40%、45%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或85%) 的细胞培养物中表达的解毒蛋白。在一些实施方案中,细胞在培养基中在每升培养基产生至少100mg多肽产物的条件下生长。在一些实施方案中,细胞在培养基中在每升培养基产生至少120mg (或至少210mg、220mg、230mg、240mg、250mg、270mg、280mg、290mg、300mg、310mg、320mg、330mg、340mg或350mg) 多肽产物的条件下生长。在一些实施方案中,纯化的样品含有大于约50mg (或至少55mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、110mg、120mg、130mg、140mg、150mg、160mg、170mg、180mg、190mg或200mg) 来自每升培养基产品的多肽产物。

[0043] 纯化的产物中的解毒剂异构体

根据本公开的实施方案中任一项所述的方法,纯化的解毒剂产物被认为包括轻链和重链。然而,培养和纯化过程可能会引入实际蛋白质的变化。

[0044] 如实施例3所示,纯化的样品中约20%至50%的多肽产物具有完整的重链 (SEQ ID NO:5)。在具有完整重链的这些多肽产物中,约5%-95%的重链具有两个O连接的糖基化,并且约5%-95%的重链具有一个O连接的糖基化。

[0045] 在一些实施方案中,纯化的样品中至少约20%、25%、30%、35%、40%或45%的多肽产物具有完整的重链。在一些实施方案中,不超过约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%的多肽产物具有完整的重链。

[0046] 在一些实施方案中,纯化的样品中约40%-80%的多肽产物具有C末端赖氨酸缺失的重链 (SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,SEQ ID NO:8在纯化的样品中占至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施方案中,SEQ ID NO:8在纯化的样品中占不超过约45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。在一些实施方案中,至少约90%的SEQ ID NO:8的重链具有一个O连接的糖基化。

[0047] 在一些实施方案中,纯化的样品中约2%-12%的多肽产物具有13个C末端氨基酸残基缺失的重链 (SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,SEQ ID NO:9在纯化的样品中占至少约0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%或5%。在一些实施方案中,SEQ ID NO:9在纯化的样品中占不超过约2%、3%、4%、5%、7%、10%、15%、17%或20%。

[0048] 在一些实施方案中,纯化的样品中约0.1%-1.5%的多肽产物具有14个C末端氨基

酸残基缺失的重链(SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中,SEQ ID NO:10在纯化的样品中占至少约0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%或0.5%。在一些实施方案中,SEQ ID NO:10在纯化的样品中占不超过约0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%或3%。

[0049] 在一些实施方案中,纯化的样品中约2%-8%的多肽产物具有15个C末端氨基酸残基缺失的重链(SEQ ID NO:11)。在一些实施方案中,SEQ ID NO:11在纯化的样品中占至少约0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%或5%。在一些实施方案中,SEQ ID NO:11在纯化的样品中占不超过约5%、6%、7%、8%、9%或10%。

[0050] 实施例3还示出纯化的样品中约35%-60%的多肽产物具有完整的轻链(SEQ ID NO:4),而其他一些可被修饰或截短。在一些实施方案中,轻链总数中的完整轻链的量为至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施方案中,轻链总数中的完整轻链的量不超过约45%、50%、55%、60%、65%、70%、80%或90%。

[0051] 在一些实施方案中,本公开提供了一种药物制品,其包含药学上可接受的载体和双链多肽的多肽部分,其中约35%-60%的双链多肽具有由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的轻链。在一些实施方案中,约20%-50%的双链多肽具有由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,约40%-80%的双链多肽具有由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,小于10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%或3%的双链多肽具有由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,约0.1%-1.5%的双链多肽具有由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的重链。在一些实施方案中,约2%-8%的双链多肽具有由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链。

[0052] 在一些实施方案中,约5%-95%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链具有两个O连接的糖基化。在一些实施方案中,约5%-95%的由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的重链具有一个O连接的糖基化。在一些实施方案中,至少约90%的由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链具有一个O连接的糖基化。

#### [0053] 制剂、方法和剂量

还提供了用纯化的解毒蛋白质产物制备的制剂。在一些实施方案中,提供了适用于冻干的水性制剂。在一个实施方案中,所述制剂包括解毒剂以及增溶剂、稳定剂和结晶剂。所述制剂还可包含表面活性剂和/或缓冲液。在一些方面,这些药剂中的每一种的存在防止解毒剂在冻干期间塌陷,例如在冷冻干燥温度高于-40°C、-30°C、-20°C、-10°C、0°C、5°C、10°C或15°C,高达20°C或25°C时。

[0054] “结晶组分”是指在冷冻干燥过程期间在包括多肽的制剂中形成结晶基质的分子。结晶组分的非限制性实例包括甘露糖醇和甘氨酸。

[0055] 在一些方面,结晶组分为甘露糖醇(例如结晶甘露糖醇)。一方面,结晶组分在水性制剂中的浓度为至少1% (w/v)。一方面,结晶组分在水性制剂中的浓度为至少1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%或4% (w/v)。一方面,结晶组分在水性制剂中的浓度不高于8%,或可选地不高于7%、6.5%、6%、5.5%、5%、4.5%或4% (w/v)。一方面,结晶组分在水性制剂中的浓度为约1%至约8%、或约2%至约6%、或约3%至约5.5%、或约4.5%至约5.5%、或约4.6%至约5.4%、或约4.7%至5.3%、或约4.8%至约5.2%、或约4.9%至约5.1%,或者约4%、4.5%或5% (w/v)。

[0056] 在一些方面,在水性制剂中包括增溶剂。术语“增溶剂”是指盐、离子、碳水化合物、络合剂、聚合物以及其他化合物,当存在于溶液中时,它们增加另一种分子(例如活性成分)在溶液中的溶解度。增溶剂的非限制性实例包括精氨酸和柠檬酸根。一方面,所述增溶剂为精氨酸。一方面,所述增溶剂为柠檬酸根。

[0057] 增溶剂的存在可用于保持fXa多肽在制剂中是可溶的和稳定的。在一些方面,增溶剂(例如精氨酸)的浓度为至少10mM,或可选地为至少20mM、25mM、30mM、36mM或40mM。在一些方面,增溶剂(例如精氨酸)的浓度不高于100mM、96mM、90mM、80mM、70mM、60mM或50mM。在一些方面,增溶剂的浓度为约10mM或20mM至约60mM、约10mM或20mM至约55mM、约35mM至约55mM、约40mM至约50mM、约41mM至约49mM、约42mM至约48mM、约43mM至约47mM、约44mM至约46mM,或为约40mM、45mM或50mM。应当注意,如本文所用,术语精氨酸是指所述氨基酸及其盐(例如精氨酸盐酸盐)。精氨酸具有约174.2道尔顿的分子量并且精氨酸盐酸盐(例如L-精氨酸盐酸盐、L-精氨酸乙酸盐)具有约210.7道尔顿的分子量。

[0058] 在一个实施方案中,增溶剂为柠檬酸根或其盐。柠檬酸根的盐为柠檬酸钠。一方面,柠檬酸根包括约1.0mM至约200.0mM的浓度。另一方面,柠檬酸根的浓度为约25mM。另一方面,柠檬酸根的浓度为约50mM。在另一个实施方案中,柠檬酸根的浓度为约5mM、10mM、或20mM。在另一个实施方案中,柠檬酸根包括约0.05M至约0.2M的浓度。

[0059] 在一些方面,在水性制剂中包括稳定剂。术语“稳定剂”代表药学上可接受的赋形剂,其在制造、储存以及应用期间保护活性成分(例如fXa衍生多肽)和/或制剂免受化学降解和/或物理降解。稳定剂的实例可包括蔗糖、精氨酸、柠檬酸根、甘露糖醇、海藻糖、甘氨酸、氯化钠、葡聚糖和葡萄糖。一方面,稳定剂为蔗糖。

[0060] 一方面,稳定剂(例如蔗糖)在水性制剂中的浓度为至少约0.5% (w/v)。一方面,稳定剂(例如蔗糖)在水性制剂中的浓度为至少约0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%或约2% (w/v)。一方面,稳定剂(例如蔗糖)在水性制剂中的浓度不大于约5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%或2% (w/v)。一方面,稳定剂(例如蔗糖)在水性制剂中的浓度为约1%至约5%、或约1%至约4%、或约1%至约3%、或约1.5%至约2.5%、或约1.6%至约2.4%、或约1.7%至2.3%、或约1.7%至约2.2%、或约1.9%至约2.1%,或者约1%、1.5%、2%、2.5%或3% (w/v)。

[0061] 在一些方面,水性制剂还可包含表面活性剂、缓冲液、张力剂、冷冻保护剂、表面活性剂、冻干保护剂、防腐剂或其组合。

[0062] 在一些方面,水性制剂具有6或更高、或6.5或更高、或7或更高、或7.5或更高的pH。在一些方面,pH不高于9、8.5或8。在一些方面,pH处于6与9之间、6.5与8.5之间、7与8.5之间、7.5与8.2之间、7.6与8.1之间、7.7与7.9之间,或为约7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8。

[0063] 一方面,水性制剂包含约45mM的精氨酸、约2%的蔗糖(w/v)、约5%的甘露糖醇(w/v)以及约10mg/mL的双链r-解毒剂,其中所述制剂具有约7.8的pH。一方面,水性制剂包含约45mM的精氨酸、约2%的蔗糖(w/v)、约5%的甘露糖醇(w/v)以及约20mg/mL的双链r-解毒剂,其中所述制剂具有约7.8的pH。一方面,水性制剂包含约45mM的精氨酸、约2%的蔗糖(w/v)、约5%的甘露糖醇(w/v)以及约40mg/mL的双链r-解毒剂,其中所述制剂具有约7.8的pH。一方面,水性制剂还包含0.01% - 0.02% (w/v)的聚山梨酸酯80和缓冲液。

[0064] 在一些方面,还提供了通过将本公开的水性制剂冻干所制备的冻干组合物。基于

每种药剂在水性制剂中的浓度,可以容易地确定所述药剂在冻干组合物中的相对含量。

[0065] 一方面,冻干组合物包含至少5%,或可选地至少10%、15%、20%、25%、30%或35% (w/w) 的fXa解毒剂。然后,在其他主要成分中,例如,L-精氨酸盐酸盐:蔗糖:甘露糖醇的重量比可以在(0.5-1.4):(1-3):(2-6)的范围内。在一些方面,L-精氨酸盐酸盐:蔗糖:甘露糖醇的重量比在(0.9-1):(1.5-2.5):(4.5-5.5)、或(0.91-0.99):(1.6-2.4):(4.6-5.4)、或(0.92-0.98):(1.7-2.3):(4.7-5.3)、(0.93-0.97):(1.8-2.2):(4.8-5.2)或(0.94-0.96):(1.9-2.1):(4.9-5.1)的范围内。在一些方面,冻干组合物还包含表面活性剂和/或缓冲液的固体部分。

[0066] 本公开还涉及在接受用fXa抑制剂进行的抗凝疗法的受试者中治疗、预防或减少出血的治疗方法,所述治疗方法包括在将冻干制剂溶解在合适的溶剂中时向受试者施用有效量的所述冻干制剂。考虑的是,本公开的解毒剂或衍生物可以是待用于选择性情况或紧急情况下的短持续时间药物,其可以安全地和特异性地中和fXa抑制剂的常规抗凝特性,而不会引起有害的血液动力学副作用或对损伤的增殖性血管应答的恶化。

[0067] 如本文所用,术语“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等在本文用于意指获得所需的药理学和/或生理学效果。所述效果就完全或部分预防病症或其体征或症状而言可能是预防性的,并且/或者就部分或完全治愈病症和/或可归因于所述病症的不利影响而言可能是治疗性的。

[0068] “治疗”还涵盖哺乳动物病症的任何治疗,并且包括:(a)在可能易患病症但可能尚未被诊断为患有所述病症的受试者中预防所述病症发生,例如在有抗凝剂给药过量的患者中预防出血;(b)抑制病症,即阻止它发展,例如抑制出血;或(c)减轻或缓解所述病症,例如减少出血。

[0069] 如本文所用,“治疗”还包括与病理相关的症状的全身性改善和/或症状发作的延迟。“治疗”的临床证据和亚临床证据将随病理、个体以及治疗而变化。

[0070] “施用”可以在一次给药中在整个治疗过程中连续地或间歇地进行。确定最有效的施用方式和剂量的方法是本领域技术人员已知的,并且将随用于疗法的组合物、疗法的目的、所治疗的靶细胞以及所治疗的受试者而变化。可以使用由治疗医师选择的给药水平和模式进行单次施用或多次施用。施用药剂的合适的剂量制剂和方法是本领域已知的。诊断或治疗的“受试者”为细胞或哺乳动物,包括人类。诊断或治疗的非人类动物受试者包括例如鼠类(诸如大鼠、小鼠)、犬科动物(诸如狗)、兔类(诸如兔)、家畜、竞技动物以及宠物。

[0071] 本公开的药剂和组合物可用于制造药物并且可用于通过根据常规规程进行施用来治疗人类和其他动物,诸如药物组合物中的活性成分。

[0072] 本公开的药剂可通过任何合适的途径,特别是通过肠胃外(包括皮下、肌肉、静脉内以及真皮内)施用进行施用以用于疗法。还将理解,优选的途径将随接受者的情况和年龄以及所治疗的疾病而变化。

[0073] 短语“药学上可接受的聚合物”是指可与在此所述的一种或多种多肽缀合的一组化合物。考虑的是,聚合物与多肽的缀合能够延长所述多肽在体内和体外的半衰期。非限制性实例包括聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、纤维素衍生物、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、糖、多元醇及其混合物。

[0074] “抗凝血剂”或“抗凝剂”是抑制血凝块形成的药剂。抗凝血剂的实例包括但不限于

凝血酶、因子IXa、因子Xa、因子XIa、因子XIIa或因子VIIa的特异性抑制剂,肝素和衍生物,维生素K拮抗剂以及抗组织因子抗体。凝血酶的特异性抑制剂的实例包括水蛭素、比伐卢定(Angiomax®)、阿加曲班以及来匹卢定(Refludan®)。肝素和衍生物的实例包括未分级肝素(UFH),低分子量肝素(LMWH),诸如依诺肝素(Lovenox®)、达肝素(Fragmin®)和达那肝素(Organan®);以及合成五糖,诸如磺达肝癸(Arixtra®)。维生素K拮抗剂的实例包括华法林(Coumadin®)、苯香豆素(phenocoumarol)、醋硝香豆素(Sintrom®)、氯茛二酮、双香豆素、二苯茛酮、双香豆素乙酸乙酯、苯丙香豆素、苯茛二酮和噻氯香豆素。在一个实施方案中,抗凝剂为因子Xa的抑制剂。在一个实施方案中,抗凝剂为贝曲沙班。

[0075] “抗凝疗法”是指向患者施用以预防不期望的血凝块或血栓形成的治疗方案。抗凝疗法包括以适用于在患者中治疗或预防不期望的血凝块或血栓形成的剂量和方案施用两种或更多种抗凝血剂或其他药剂中的一种或组合。

[0076] 术语“因子Xa抑制剂”或“因子Xa的抑制剂”是指可直接或间接抑制凝血因子Xa在体外和/或体内催化凝血酶原转化成凝血酶的活性的化合物。

[0077] “直接因子Xa抑制剂”直接结合fXa,并且非限制性实例包括NAP-5、rNAPc2、组织因子途径抑制剂(TFPI)、DX-DX-9065a(如在例如Herbert, J.M.,等, J Pharmacol Exp Ther. 1996 276 (3):1030-8中所述)、YM-60828(如在例如Taniuchi, Y.,等, Thromb Haemost. 199879 (3):543-8中所述)、YM-150(如在例如Eriksson, B.I.等, Blood 2005;106 (11), Abstract 1865中所述)、阿哌沙班、利伐沙班、TAK-442、PD-348292(如在例如Pipeline Insight:Antithrombotics-Reaching the Untreated Prophylaxis Market, 2007中所述)、奥米沙班、依度沙班(如在例如Hylek EM, Curr Opin Invest Drugs 2007 8 (9):778-783中所述)、LY517717(如在例如Agnelli, G.,等, J. Thromb. Haemost. 2007 5(4):746-53中所述)、GSK913893、雷扎沙班、贝曲沙班或其药学上可接受的盐以及其组合。在一个具体方面,直接因子Xa抑制剂为利伐沙班。在一些方面,直接fXa抑制剂为小分子化合物。

[0078] “间接因子Xa抑制剂”对fXa活性的抑制是由一种或多种其他因子介导的。间接因子Xa抑制剂的非限制性实例包括磺达肝癸、依达肝素、生物素化的依达肝素、依诺肝素、法安明、亭扎肝素、低分子量肝素(“LMWH”)以及其组合。在一个具体方面,间接因子Xa抑制剂为依诺肝素。

[0079] 在一个实施方案中,因子Xa抑制剂选自贝曲沙班、利伐沙班、LMWH、DX-9065a、YM-60828、YM-150、PD-348292、奥米沙班、依度沙班、LY517717、GSK913893、雷扎沙班、阿哌沙班以及其组合。

[0080] 术语“贝曲沙班”是指化合物“[2-({4-[(二甲基氨基)亚氨基甲基]苯基}羰基氨基)-5-甲氧基苯基]-N-(5-氯(2-吡啶基))甲酰胺”或其药学上可接受的盐。贝曲沙班在美国专利6,376,515、6,835,739和7,598,276中描述,所述专利的内容以引用的方式并入本文。已知贝曲沙班是因子Xa的特异性抑制剂。

[0081] “中和”、“逆转”或“抵消”fXa抑制剂的活性或相似短语是指抑制或阻断因子fXa抑制或fXa抑制剂的抗凝功能。此类短语是指在体外和/或体内部分抑制或阻断功能以及抑制或阻断大部分或全部的fXa抑制剂活性。

[0082] “有效量”是指足以诱导所需的生物学结果和/或治疗结果的衍生物的量。所述结

果可以是减轻疾病的体征、症状或病因,或者生物体系的任何其他所需的改变。在本公开中,所述结果通常将涉及以下中的一种或多种:中和已向患者施用的fXa抑制剂、逆转fXa抑制剂的抗凝活性、从血浆中去除fXa抑制剂、恢复止血以及减少或停止出血。有效量将根据所使用的特定解毒剂、已向受试者施用的特定fXa抑制剂、fXa抑制剂的给药方案、解毒剂的施用时间、所治疗的受试者和疾病状况、受试者的体重和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式等而变化,所有这些因素可以容易地由本领域的普通技术人员确定。

[0083] 在某些方面,施用所述溶液以递送约10毫克(mg)至约2克(g)的量的fXa解毒剂。使用的r-解毒剂的其他量包括约100mg至约1.5g;约200mg至约1g;以及约400mg至约900mg。在一些方面,使用的r-解毒剂的量为约400mg或960mg。在一些方面,使用的r-解毒剂的量为约10mg至约100mg;约15mg至约95mg;以及约20mg至约80mg。

[0084] 在施用,所述制剂将因子Xa抑制剂中和至少约20%、或至少约50%、或至少约75%、或至少约90%、或至少约95%。

[0085] 可以通过许多体外测定(诸如凝血酶产生测定)和临床凝血测定(诸如aPTT、PT和ACT)来确定是否实现了所述方法,即抑制或逆转因子Xa抑制剂。

[0086] 本公开的一个方面涉及在接受用fXa抑制剂进行的抗凝疗法的受试者中选择性地结合并抑制外源施用的fXa抑制剂的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的冻干制剂的溶液。适用于此疗法的患者先前已接受抗凝疗法,例如,他们已接受一种或多种抗凝剂,诸如直接或间接fXa抑制剂。

[0087] 另一方面,本文提供的方法在接受用因子Xa抑制剂进行的抗凝疗法的受试者中选择性地结合并抑制外源施用的因子Xa抑制剂,所述方法包括向所述受试者施用冻干制剂的溶液。所述受试者可以是细胞或哺乳动物,诸如人类。

[0088] 将受益于本文所述的溶解的冻干制剂的施用和所附方法的受试者包括正经历或易患临床大出血事件或临床上有意义的非大出血事件的那些受试者。临床大出血事件的实例选自由以下组成的组:出血、重要器官中的出血、需要再次手术或新治疗规程的出血以及出血指数 $\geq 2.0$ 伴有相关明显出血。(Turpie AGG,等,NEJM,2001,344:619-625.)此外,所述受试者可能正经历或易患非大出血事件,其选自由以下组成的组:持续性的或复发性的并且大量的或在没有干预的情况下将不会停止的鼻出血、不会上升到需要治疗规程的水平直肠或泌尿道出血、自发或在轻微创伤的情况下发生的注射部位或其他地方的显著血肿、超过通常与不需要引流的手术程序相关的大量失血以及需要非计划性输血的出血。

[0089] 在一些实施方案中,在fXa抑制剂给药过量之后或在可能使受试者暴露于出血风险的手术之前施用溶解的冻干制剂。

#### 实施例

[0090] 包括以下实施例以证明本公开的具体的实施方案。本领域技术人员应当理解以下实施例中公开的技术表示在本公开的实践中发挥良好作用的技术,并且因此可以被认为构成本发明实践的优选模式。然而,按照本公开,本领域技术人员应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下可以在已公开并仍获得类似或相似结果的指定实施方案中做出许多改变。

[0091] 实施例1:从细胞培养物中纯化r-解毒剂

此实施例证明了用于制造r-解毒剂的培养条件和下游纯化过程的发展。针对用构

建体转染的CHO细胞测试针对CHO细胞定制的商业培养基,所述构建体含有编码r-解毒剂前体(SEQ ID NO:2)的核酸序列(SEQ ID NO:7),所述前体在去除-RKRRKR-接头(SEQ ID NO:6)时产生双链r-解毒剂(SEQ ID NO:3)。在合适的条件下,ProCHO™培养基能够产生高达75-95mg/L的滴度。

[0092] 开发了下游纯化过程(“下游过程”)以从培养的细胞中纯化解毒剂。在一些初始开发运行中,测试了各种膜和柱。

[0093] 在两次测试运行中,发现澄清的收获物在通过超滤(UF)浓缩产物时会污染膜,或者在绕过UF而通过第一色谱步骤浓缩产物时会污染色谱介质。执行实验以确定污染的原因并确定消除污染的步骤,因为认为在所述过程的早期需要浓缩产物。随后确定污染是由细胞培养期间分泌到培养基中的高分子量(HMW)蛋白杂质引起的。此HMW蛋白仅部分溶于澄清的收获物中,并且在浓缩物变得越来越不可溶时,导致UF膜或色谱柱的不可接受的污染。

[0094] 在评估若干种深度过滤器、离子交换膜和色谱介质之后,发现一种特定的深度过滤器(Millipore™ X0HC级过滤器)可以去除大部分杂质,同时获得可接受的产物产率。然后可以通过UF将产物浓缩至10倍。此过滤器替换了澄清过程中的原始过滤器,并实施了两次额外的运行。

[0095] 图1示出了由此开发工作得到的纯化过程100。在将细胞收获(步骤101)并使用Millipore™ X0HC过滤器澄清以去除HWM杂质后,将样品浓缩10倍(步骤102)。浓缩可以使用再生纤维素。在步骤103,可进行病毒灭活(用洗涤剂/溶剂;终浓度:1% Triton X-100、0.3%磷酸三丁酯)以使细胞培养物中的包膜病毒灭活。去除病毒之后,进行步骤104(混合模式阳离子交换)、105(混合模式阴离子交换)和106(混合模式离子交换)来去除宿主细胞蛋白质和DNA并捕获解毒剂。在步骤107,可使用疏水相互作用树脂来进一步去除剩余的宿主细胞蛋白质。任选地,在这些纯化步骤之后,可使用最终的病毒去除过滤步骤来去除任何剩余的病毒。

[0096] 此过程能够回收细胞培养物中表达的约30-35%的解毒剂,从而导致从每升细胞培养物中产生约22-33mg的解毒蛋白。

[0097] 实施例2:规模扩大的制造过程

基于实施例1中所示的过程,出于扩大生产的目的开发了改进的过程。

[0098] 实施例1的培养基能够产生约75-95mg/L的滴度。为了增加产量,测试了许多其他CHO培养基。其中一个在细胞生长和峰值细胞密度方面展现出了2-3倍的增加(滴度=200-225mg/L),并且还可以将规模扩大到10,000L。

[0099] 开发了亲和色谱用于大量提取解毒剂。亲和配体包括从全大豆或面粉中提取的Kunitz胰蛋白酶抑制剂(21kDa;pI=4.5)。大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)与解毒剂形成1:1复合物。鉴定了非竞争性抑制剂洗脱条件的可扩展性和相容性,其包括25mM乙酸钠、1M精氨酸,pH 5.2。

[0100] 在实施例1开发的过程中,使用利用深度过滤器的收获澄清步骤去除HMW杂质,然后浓缩10倍。此外,病毒灭活步骤使用洗涤剂(Triton X-100)以及溶剂(磷酸三丁酯)。评估这些步骤用于亲和捕获的适用性和效率。

[0101] 数据示出不需要深度过滤,并且使用溶剂和10x浓缩步骤降低了产物的回收率。因此,在进一步的开发中,淘汰了深度过滤和浓缩步骤,并且病毒灭活仅使用洗涤剂(Triton

X-100), 不使用溶剂。病毒灭活通过以每升产物52.7ml缓冲液的比例加入10%的Triton X-100 (终浓度:0.5% Triton X-100) 来实现。这一发现是出乎意料的, 因为在加载到亲和柱之前, 溶剂常常用于样品制备。还应当注意, 当收获细胞培养物时, 使用流经离心步骤去除沉淀物。

[0102] 在室温下的15分钟混合时间以及至少1小时的保持时间之后, 将经处理的产物通过由在Sartopore 2 (0.45/0.22 $\mu$ m) 预过滤器上的Sartogruad NF过滤器 (0.8/0.2 $\mu$ m) 预过滤器构成的过滤器系列过滤到带有一体的0.22 $\mu$ m过滤器的500L容器中, 其中每种柱加载在使用当天过滤。

[0103] 从STI亲和树脂上洗脱产物使用含有精氨酸的洗脱缓冲液 (25mM乙酸钠/1.0M精氨酸, pH 5.2)。

[0104] 在亲和捕获之后, 采用一些抛光步骤以去除剩余的杂质, 其包括DNA、宿主细胞蛋白 (HCP) 和亲和配体的沥出液。测试了两种色谱选择, 其包括阳离子交换和混合模式离子交换。然而, 没有可用于表征的过程特异性宿主细胞蛋白质测定。因此, 将用作替代的商业ELISA和特定HCP的LC-MS/MS定量用作补充表征。此外, 2D银染色评估用于定性表征。

[0105] 图3示出了三个潜在下游过程 (DSP) 的评估。基于亲和配体沥出液的清除来鉴定三个DSP。为了评价产物质量和过程相关的杂质清除, 在每个流上对相同的亲和洗脱液池进行正向处理, 并比较产物回收率和CHO宿主细胞蛋白清除率 (HCP; 以百万分之一 (ppm) 表示)。

另外测试每个DSP过程的洗脱液的产物质量 (下表)。

|             |                       |       |        |            |       |       |
|-------------|-----------------------|-------|--------|------------|-------|-------|
| IEX的<br>峰值% | 样品                    | 酸性峰值  | 峰值1    | 峰值2        | 峰值3   | 基础峰值  |
|             | 亲和洗脱液                 | 27.8% | 17.8%  | 12.9%      | 16.6% | 13.9% |
|             | 阳离子交换<br>洗脱液          | 24.9% | 14.5%  | 26.9%      | 20.8% | 13.1% |
|             | 混合模式 IEX<br>洗脱液 DSP-2 | 23.4% | 15.7%  | 17.3%      | 20.4% | 13.3% |
|             | 混合模式 IEX<br>洗脱液 DSP-1 | 23.6% | 15.2%  | 26.9%      | 20.0% | 13.3% |
|             |                       |       |        |            |       |       |
| SEC的<br>单体% | 样品                    | HMW%  | 单体%    |            |       |       |
|             | 亲和洗脱液                 | 0.29% | 99.71% |            |       |       |
|             | 阳离子交换<br>洗脱液          | 4.30% | 95.70% |            |       |       |
|             | 混合模式 IEX<br>洗脱液 DSP-2 | 0.13% | 99.87% |            |       |       |
|             | 混合模式 IEX<br>洗脱液 DSP-1 | 0 %   | 100%   |            |       |       |
|             |                       |       |        |            |       |       |
| RP的<br>主峰值% |                       | 前主峰值  | 主峰值    | $\beta$ 峰值 |       |       |
|             | 亲和洗脱液                 | 0.8%  | 93.4%  | 5.7%       |       |       |
|             | 阳离子交换<br>洗脱液          | 1.2%  | 92.9%  | 5.9%       |       |       |
|             | 混合模式 IEX<br>洗脱液 DSP-2 | 0.5%  | 94.2%  | 5.3%       |       |       |
|             | 混合模式 IEX<br>洗脱液 DSP-1 | 0.9%  | 93.4%  | 5.8%       |       |       |
|             |                       |       |        |            |       |       |

[0106] 表注: 三个评估的下游过程的产品质量评价。评估取自三个DSP的洗脱液 (图3) 的产品质量影响。未发现对基于电荷的异质性 (IEX) 或反相 (RP) 的影响。然而, 通过阳离子交换抛光步骤纯化的来自DSP-2的样品通过尺寸排阻 (SEC) 示出了高分子量聚集体百分比的增加。

[0107] 基于所述测试, 开发了规模扩大的下游过程, 如图2所示。此过程比图1所示的过程更简单。然而, 产率高了2倍。与蛋白质产量增加2-3倍的新细胞培养体系组合, 实施例2中描

述的方法能够使总体解毒剂产量增加4至6倍,并且能够实现至少10,000L的生产规模。

[0108] 在图2中,下游过程200在收获(201)之后采用病毒灭活步骤(202),其仅使用洗涤剂(Triton X-100),不使用溶剂。在亲和捕获步骤203中,使用具有STI配体的树脂,并用含有精氨酸的洗脱缓冲液(pH 5)洗脱解毒剂。在亲和捕获之后可以使用任选的超滤/渗滤(UF/DF)步骤,其可以浓缩蛋白质并使pH值达到约7。

[0109] 在步骤204,使用阴离子膜从样品中去除某些杂质(例如DNA、HCP)。测试的示例阴离子膜为Sartobind Q膜,其对解毒剂没有表现出有害影响。

[0110] 在步骤205,混合模式离子交换的示例类型为利用CHT(陶瓷羟基磷灰石)的IEX混合模式。示例洗脱缓冲液为磷酸盐缓冲液。此步骤可用于去除STI沥出液。

[0111] 在步骤206,可以用辛基琼脂糖凝胶色谱作为实例实现疏水分离,并且可以用包含NaCl的缓冲液洗脱蛋白质。此步骤可用于去除剩余的HCP。

[0112] 下表示出了几次测试运行中的纯化和回收产率。

|                | 实验规模(10 L)     | 试验 1 (400 L)   | 试验 2 (400 L)   |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 亲和捕获           | 178 mg/L 细胞培养物 | 122 mg/L 细胞培养物 | 150 mg/L 细胞培养物 |
| 渗滤             | 95%            | 98%            | 99%            |
| Sartobind-Q    | -              | -              | 95%            |
| Iex-混合模式       | 92%            | 95%            | 93%            |
| 疏水相互作用(辛基)     | 100%           | 103%           | 99%            |
| 病毒过滤           | 95%            | 92%            | 94%            |
| 最终 Uf/Df 散装原料药 | 89%            | 91%            | 92%            |
| 累积产率           | 60%            | 69%            | 66%            |

[0113] 实施例3:制造的蛋白质的表征在该实施例中,开发了用于表征由上文开发的方法产生的蛋白质产物的方法。测试的方法包括等电聚焦(IEF)、减少反相(Red-RP)和减少肽图(PMAP)。

[0114] 等电聚焦用于确定解毒蛋白的电荷异质性。等电聚焦是一种电泳技术,其用于基于蛋白质的等电点(pI)或蛋白质没有净电荷时的pH来分离蛋白质。使用按照Life Technologies制造商的电泳(Novex IEF凝胶)说明书的pH 3-10的凝胶和试剂以及用胶体蓝染色试剂盒(Invitrogen)的染色来执行等电聚焦。将结果与Serva 3-10pI标记进行比较。

[0115] 将测试批次在水中稀释至1.6mg/mL,然后在IEF pH 3-10样品缓冲液中稀释至1:1。每个样品以10 $\mu$ L(8.0 $\mu$ g)加载,并且电泳在100V下执行1小时,然后在200V下执行1小时,并且在500V下执行30分钟。将凝胶在固定溶液(Sigma-Aldrich)中固定30分钟,在胶体蓝染色中染色1小时,并且在水中脱色过夜。

[0116] 减少反相是一种HPLC方法,其使用反相色谱分离来检测蛋白质的全长和截短形式。将样品缓冲液交换到6M盐酸胍/50mM Tris pH 7.5中并用DTT还原,然后在50 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。然后在室温下使用乙烯基吡啶将样品在黑暗中烷基化90分钟,然后用1M DTT猝灭。所述方法利用Agilent Zorbax C18 HPLC柱将蛋白质与固定相和渐减极性流动相(在乙腈中

的0.1%的三氟乙酸)的15%至95%梯度结合,以基于蛋白质的疏水性分离蛋白质。UV波长为214nm。

[0117] Lys-C消化的肽图利用Lys-C消化物的UPLC-UV/MS<sup>E</sup>分析。此方法能够提供超过98%的序列覆盖并表征翻译后修饰,诸如糖基化、天冬氨酸羟化和C末端赖氨酸截短。此方法还能够监测稳定性指示标记,诸如天冬酰胺脱酰胺和甲硫氨酸氧化。将样品批次各自还原、烷基化并用赖氨酰内肽酶(Lys-C)处理。将酶促消化产生的肽通过RP-UPLC分离,并通过质谱分析。

[0118] 下表示出了从纯化的蛋白质产物中检测到的蛋白质同种型的类型依旧它们的百分比和序列(批次#1:实施例1中开发的下游过程;批次#1:实施例2中开发的下游过程)。有趣的是应当注意,与实施例1的过程相比,实施例2的过程显著降低了SEQ ID NO:9的百分比(从9.0%至2.7%),这可能是由于增加的纯化效率。

[0119] 轻链同种型:

|                   | 批次#1  | 批次#2  |
|-------------------|-------|-------|
| 完整轻链(SEQ ID NO:4) | 46.8% | 37.9% |
| 修饰的或截短的轻链         | 53.2% | 62.1% |

重链同种型:

|                                     | 批次#1  | 批次#2  |
|-------------------------------------|-------|-------|
| 具有2个O连接的糖基化的完整重链(SEQ ID NO: 5)      | 10.2% | 22.0% |
| 具有1个O连接的糖基化的完整重链(SEQ ID NO: 5)      | 18.3% | 22.6% |
| 具有1个O连接的糖基化的C末端K截短的重链(SEQ ID NO: 8) | 57.8% | 46.9% |
| 丢失13个C末端残基(SEQ ID NO: 9)            | 9.0%  | 2.7%  |
| 丢失14个C末端残基(SEQ ID NO: 10)           | 0.6%  | 0.8%  |
| 丢失15个C末端残基(SEQ ID NO: 11)           | 4.0%  | 5.0%  |

| 没有C末端K的重链(SEQ ID NO: 8) |                                                                   |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 181                     | IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ                |
| 241                     | AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP |
| 301                     | ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKML EPHYVDRNSC KLSSSFIITQ  |
| 361                     | NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAPLK |
| 421                     | WIDRSMKTRG LPAKSHAPE VITSSPL                                      |

| 没有13个C末端残基的重链(SEQ ID NO: 9) |                                                                   |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 181                         | IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ                |
| 241                         | AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP |
| 301                         | ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKML EPHYVDRNSC KLSSSFIITQ  |
| 361                         | NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAPLK |
| 421                         | WIDRSMKTRG LPAK                                                   |

| 没有14个C末端残基的重链 (SEQ ID NO: 10) |                                                                   |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 181                           | IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ                |
| 241                           | AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDIIVLRRLKT PITFRMNVAP |
| 301                           | ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKML EVPYVDRNSC KLSSSFIIITQ |
| 361                           | NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFKL |
| 421                           | WIDRSMKTRG LPKA                                                   |

| 没有15个C末端残基的重链 (SEQ ID NO: 11) |                                                                   |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 181                           | IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ                |
| 241                           | AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDIIVLRRLKT PITFRMNVAP |
| 301                           | ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKML EVPYVDRNSC KLSSSFIIITQ |
| 361                           | NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFKL |
| 421                           | WIDRSMKTRG LPK                                                    |

#### 实施例4:规模扩大过程的验证

此实施例描述了基于实施例1和2中所示的过程的过程,用于进一步验证。

##### [0120] 通过洗涤剂的病毒灭活

病毒灭活步骤通过将10%的Triton X-100加入到收获的蛋白质中来执行。将对应于1个Capto STI循环(如下所述)的收获的蛋白质通过用作预过滤器的4x30”Sartoguard NF过滤器从收货槽过滤到10%的Triton X-100加料罐中,然后通过3x20”Sartoguard NF过滤器0.8/0.2 $\mu$ m过滤。在加入10% Triton X-100之后,将池混合,然后通过3x30”Sartoguard NF 0.8/0.2 $\mu$ m过滤器转移至保持罐。一旦保持时间完成,通过与3x30”Sartopore 2 0.45/0.2 $\mu$ m过滤器串联的6x30”Sartoguard NF过滤器0.8/0.2 $\mu$ m过滤器,将灭活池加载到Capto STI柱上。重复该顺序,直到要在Capto STI操作期间完成的4个循环都完成。加载第二个循环之后,更换6x30”Sartoguard NF 0.8/0.2 $\mu$ m过滤器。

##### [0121] Capto STI色谱

使用Capto STI树脂在环境温度下执行亲和柱色谱。在加载相期间,产品与树脂结合,同时污染物流过。通过在洗脱缓冲液中破坏蛋白质与高浓度精氨酸的相互作用来回收产物。在使用之前,将柱用注射用水(WFI)冲洗,用100mM磷酸pH 3.0清洗,并用WFI冲洗。将所述柱最初用预平衡缓冲液(20mM Tris-HCl, pH 7.4)预平衡,然后用平衡缓冲液(20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, pH 7.4)平衡,并且一旦柱的pH和电导率在规格范围内,就加载Triton-X 100处理的澄清收获物(HCCF)。将HCCF材料的每个循环从它的病毒灭活保持罐直接转移到所述柱。

[0122] 加载之后,将柱用平衡缓冲液洗涤,用高精氨酸低pH洗脱缓冲液(洗脱缓冲液: 25mM乙酸钠, 1.0M精氨酸, pH 5.2)洗脱。在循环结束时以及下一循环之前,将柱用WFI冲洗,再次用100mM磷酸pH 3.0清洗,并再次用WFI冲洗。将来自若干个循环的所有洗脱液合并在一起。在收集最后一个循环之后,进行缓冲液追踪,绕过柱,以便将洗脱的产物从柱下游的管线冲洗到收集容器中。在所有循环完成之后,将柱用WFI冲洗,用100mM磷酸pH 3.0清洗,用WFI冲洗,用预平衡和平衡缓冲液中和并储存在乙醇储存溶液中。

[0123] 将Capto STI洗脱液池与1.0M精氨酸盐酸盐pH 7.0混合至终浓度为100mM精氨酸盐酸盐以稳定所述池。然后将所得的池浓缩并在10KDa Ultracel Pellicon 3膜上渗滤以去除大部分精氨酸,从而允许加载到随后的色谱步骤中。

##### [0124] Sartobind Q膜色谱

使用Sartobind Q Jumbo滤筒在环境温度下进行阴离子交换膜色谱。在加载相期间,产物流过膜,同时污染物结合。在使用之前,用平衡缓冲液冲洗滤筒以去除储存湿润剂。

用0.5MNaOH清洗滤筒。然后将滤筒用平衡缓冲液平衡,一旦柱的pH和电导率在规格范围内,就加载浓缩的渗滤的Capto STI洗脱液。从后UF/DF收集罐直接加载一个加载材料循环。加载之后,用平衡缓冲液洗涤滤筒。在收集产物之后,进行缓冲液追踪,绕过滤筒,以便将产物从柱下游的管线冲洗到收集容器中。

[0125] 陶瓷羟基磷灰石色谱 (CHT)

使用CHT I型40 $\mu$ m树脂在环境温度下执行混合模式柱色谱。在加载相期间,产品与树脂结合,同时一些污染物流过。通过以线性梯度增加钠浓度来回收产物。使用之前,将柱用1.0M NaOH清洗,并用少量平衡缓冲液冲洗。所述柱最初用预平衡缓冲液预平衡,然后用平衡缓冲液平衡,并且一旦柱的pH和电导率在规格范围内,就加载Sartobind Q洗脱液。

[0126] 将加载的每个循环从它的收集罐直接转移到所述柱。加载之后,用平衡缓冲液洗涤柱。然后运行从90%平衡缓冲液(50mM MES,5mM磷酸钠,pH 7.0)至90%洗脱缓冲液(50mM MES,5mM磷酸钠,2M氯化钠,pH 7.0)的梯度。

[0127] 在循环结束时以及下一个循环之前,将柱用平衡缓冲液冲洗,然后用高磷酸盐后洗脱洗涤缓冲液剥离,用平衡缓冲液冲洗,再次用1.0M NaOH清洗,并且再次用平衡缓冲液冲洗。将来自若干个循环的所有洗脱液合并在一起。在收集最后一个循环之后,进行缓冲液追踪,绕过柱,以便将洗脱的产物从柱下游的管线冲洗到收集容器中。在所有循环完成之后,将柱用平衡缓冲液冲洗,用1.0M NaOH清洗,并储存在苛性/磷酸盐储存溶液中。

[0128] 辛基琼脂糖4FF色谱

使用辛基琼脂糖FF树脂在环境温度下执行疏水相互作用色谱。在加载相期间,产物流过树脂,同时污染物结合。在使用之前,将柱用1.0M NaOH清洗。所述柱最初用WFI预平衡,然后用平衡缓冲液平衡,并且一旦柱的pH和电导率在规格范围内,就加载CHT洗脱液。将加载的每个循环从它的收集罐直接转移到所述柱。加载之后,用平衡缓冲液洗涤柱。在循环结束时以及下一个循环之前,将柱用WFI剥离,并再次用1.0M NaOH清洗。在收集最后一个循环之后,进行缓冲液追踪,绕过柱,以便将产物从滤筒下游的管线冲洗到收集容器中。在所有循环完成之后,将柱用WFI剥离,用1.0M NaOH清洗,并储存在苛性储存溶液中。

[0129] Planova 20N病毒减少过滤 (VRF)

在Planova 20N病毒减少过滤器上执行病毒减少过滤。过滤器以终端模式操作,产物通过过滤器,同时任何剩余的病毒颗粒保留在纤维中。使用之前,用辛基琼脂糖平衡缓冲液冲洗过滤器。然后将产物通过过滤器,然后用另外的平衡缓冲液冲洗。测试过滤器的完整性,并在使用之后丢弃。

[0130] 将VRF滤液在10KDa Ultracel Pellicon 3膜上浓缩。部分浓缩之后,将它渗滤到最终制剂中。然后将产物浓缩至最终目标浓度并回收。

\*\*\*

[0131] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与由本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0132] 本文说明性描述的本发明可在不存在本文未具体公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下进行适当的实践。因此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应被扩展地且无限制地理解。另外,本文所采用的术语和表述已用作描述性术语而非限制性术语,并且没有意图使用这些术语和表述来排除所示或所述的特征的任何等同物或其部分,但认

识到在所要求的本发明的范围内的各种修改是可能的。

[0133] 因此,应当理解尽管本发明通过优选实施方案和任选的特征具体公开,但是本领域的技术人员可对其在文中具体化的发明进行修改、改进和变更,并且此类修改、改进和变更被视为在本发明的范围内。在此提供的材料、方法和实施例是优选实施方案的代表,是示例性的,而非意图作为对本发明范围的限制。

[0134] 本发明已在本文中进行了广泛性和一般性的描述。落在一般性公开范围内的每个较狭义的物种和亚属群也是本发明的构成部分。这包括具有附带条件或否定限制的本发明的一般性描述,以从类属中去除任何主题而不管删除的材料在本文中是否进行了具体叙述。

[0135] 此外,在根据Markush组描述了本发明的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到本发明还因此根据Markush组的任何个别成员或成员亚组进行了描述。

[0136] 所有出版物、专利申请、专利和其他本文提到的参考文献明确地以引用的方式整体并入本文,引用程度就如同每个参考文献分别以引用的方式并入本文一样。当发生冲突时,以本说明书(包括定义)为准。

[0137] 应当理解,尽管本公开已连同以上实施方案一起被描述,但上文描述和实施例意图说明而非限制本公开的范围。在本公开的范围内的其他方面、优点和修改将为本公开所属领域技术人员显而易见。

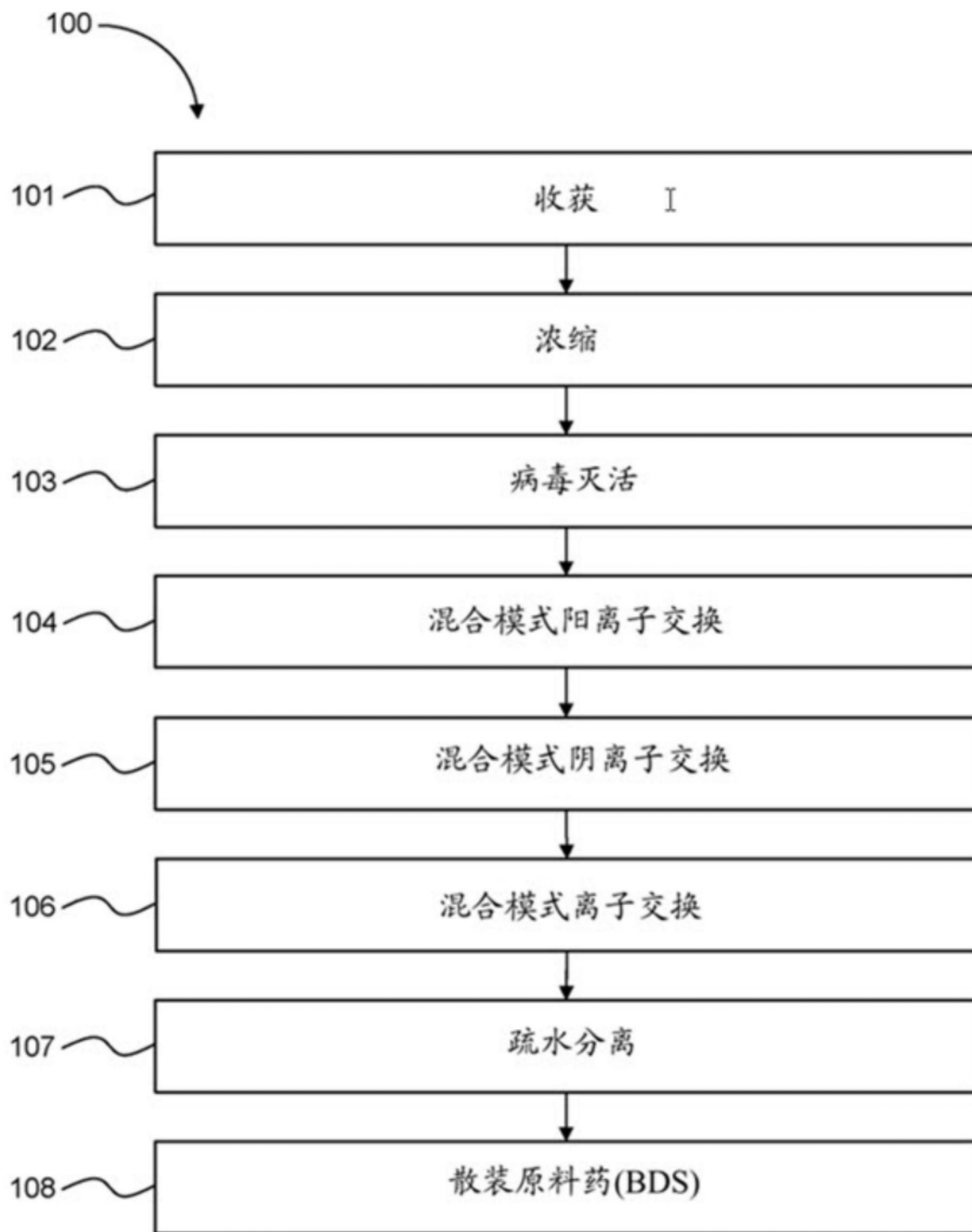


图1

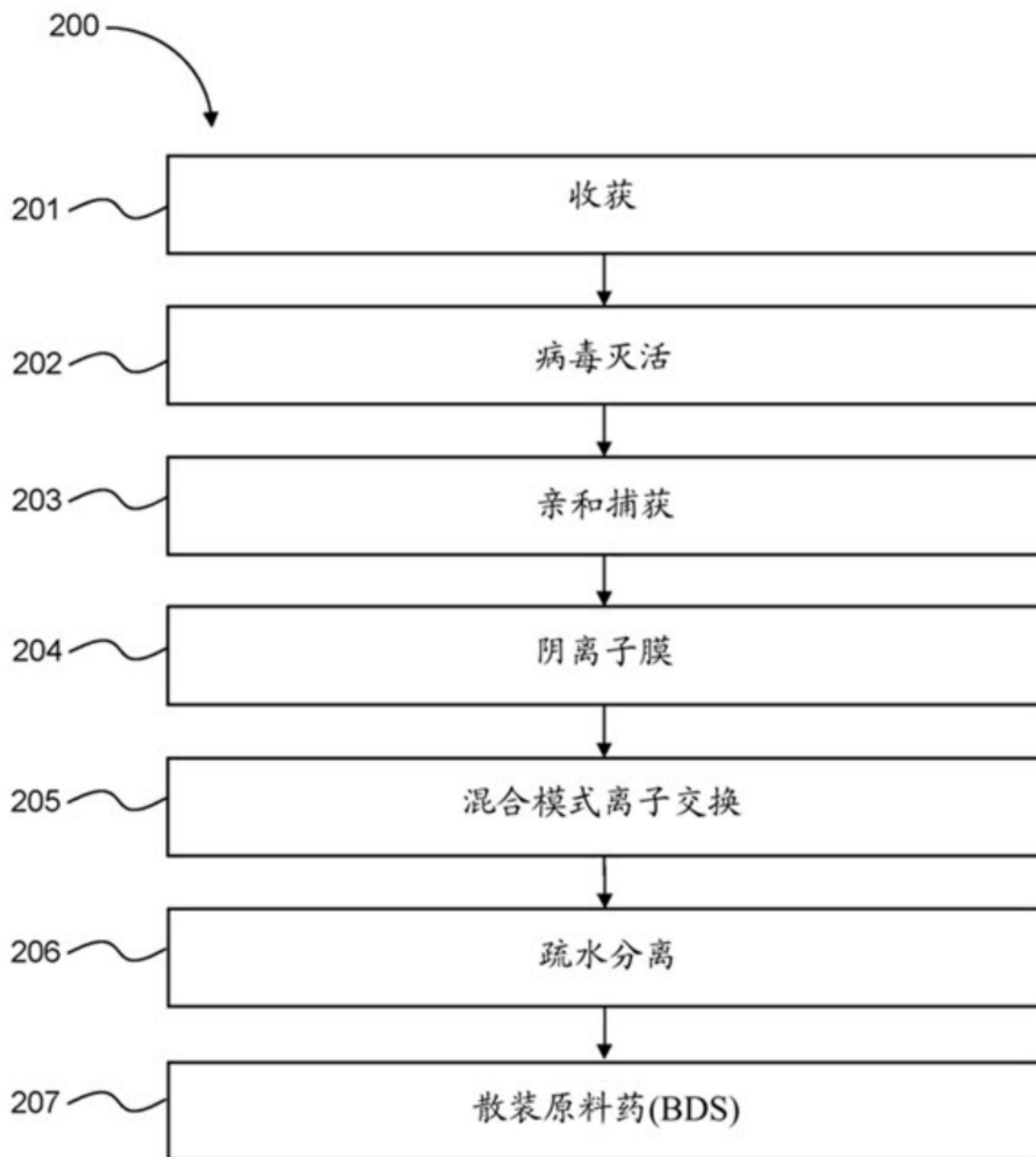


图2

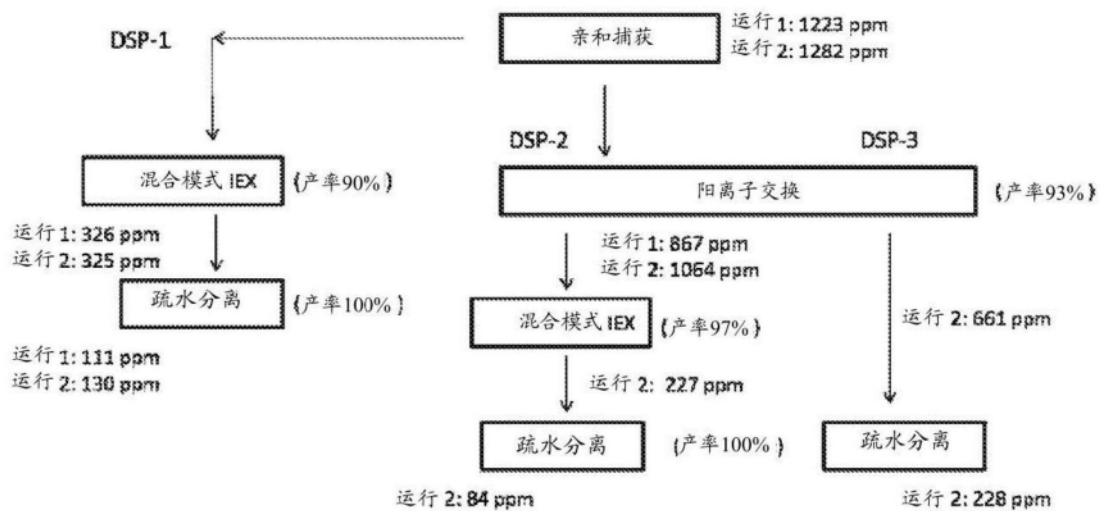


图3