

Настоящее изобретение относится к способу выделения и очистки активатора  $\alpha 1$  плазминогена слюны *Desmondus rotundus* (rDSPA  $\alpha 1$ ) к очищенному этим способом rDSPA  $\alpha 1$ , к фармацевтическим композициям", содержащим очищенный таким образом rDSPA  $\alpha 1$ , и к способам лечения, использующим очищенный таким образом rDSPA  $\alpha 1$ .

#### Предпосылки изобретения

Тромбозы возникают в результате образования кровяного сгустка в кровеносных сосудах. Кровяной сгусток различается при различных тромбозах, включая эмболии легких и артериальные тромбозы, к которым относится острый инфаркт миокарда. Эмболия легких и инфаркт миокарда являются опасными для жизни событиями, требующими немедленного медицинского вмешательства.

Распространенная форма терапии таких артериальных и венозных тромбозов заключается в применении активаторов плазминогена для осуществления энзиматического тромболитического (Collen с соавт., *Ann. Rev. Med.*, (1988), 39:405-423). Эти вещества, называемые тромболитиками, превращают плазминоген, неактивный профермент фибринолитической системы крови, в активный протеолитический фермент, плазмин. Плазмин, в свою очередь, растворяет волокнистый материал фибрин, который является основным компонентом кровяного сгустка; это приводит к возобновлению работы этих закупоренных сосудов и восстановлению тока крови. Однако, поскольку плазмин является относительно неспецифической протеазой, он может также разрушать, посредством протеолиза, компоненты крови, необходимые для интактного гемостаза (например, фибриноген) и, таким образом, повышать риск кровотечения.

Первые энзиматические тромболитики, стрептокиназа и урокиназа, представляют собой соединения, которые однократно введенные в кровообращение, системно превращают плазминоген в плазмин и индуцируют протеолиз во всем организме. Таким образом, тромболитические терапии, которые используют эти соединения, сопровождаются осложнениями, связанными с кровотечением. Были созданы, ранее не существовавшие, "тромболитические терапии, основанные на соответствующем использовании активаторов плазминогена определенного тканевого типа, обычно именуемые как t-PA, но они также обладают рядом недостатков, в том числе, серьезными осложнениями при кров\*отечениях, сравнительно часто случающимися при повторной окклюзии, неспособные быть одинаково эффективными, и подозреваемые в инактивации активаторов плазминогена ингибиторами, такими как ингибитор активатора плазминогена Типа 1 (PAI-1) (Loskutoff, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, Vol. 14, No 1 (1988)).

Совсем недавно из слюны и слюнных желез большого вампира (*Desmondus rotundus*) очистили белки активатора плазминогена (Опубликованная Европейская Патентная Заявка 0383417 (Baldus с соавт.), опубликованная Европейская Патентная Заявка 0352119 (Duong с соавт.)). Эти активаторы плазминогена (именуемые DSPA) представляют собой сериновые протеазы, которые катализируют соответствующее превращение плазминогена в плазмин, но они проявляют большую селективность в отношении фибринсвязанного плазминогена и, поэтому, могут быть ассоциированы с менее серьезным и частым кровотечением при использовании тромболитической терапии. Кроме того, DSPA нелегко инактивируется плазменными ингибиторами, такими как PAI-1, и по этой причине могут быть ассоциированы с меньшей частотой повторной окклюзии.

В слюне вампира можно обнаружить две высокомолекулярные формы DSPA (обозначаемые как  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ ), которые обе содержат несколько доменов, в том числе, протеазный домен, и которые обе обладают способностью энергично связываться с плазмино-геном в присутствии фибрина. С помощью рекомбинантной биотехнологии в культуре клеток млекопитающих получены соответствующие различные формы DSPA (Kratzschmer с соавт., *Беле* (1991), 105:229-237; опубликованная Европейская Патентная Заявка 0 352 119 (Duong с соавт.)), и описаны ограниченно очищенные рекомбинантно полученные DSPA (rDSPA) (Witt с соавт., *Blood* (1992), 79:1213-1217). Однако, не были описаны соответствующие выделение и очистка rDSPA в промышленном масштабе и степень чистоты, полагающаяся для фармацевтических препаратов.

Настоящая заявка касается выделения и очистки рекомбинантного DSPA  $\alpha 1$  (rDSPA  $\alpha 1$ ) в промышленном масштабе. В настоящем изобретении описано получение достаточно чистого и стабильного rDSPA  $\alpha 1$  для продажи и годного для клинического применения.

В настоящем изобретении разработали способ соответствующего выделения и очистки rDSPA  $\alpha 1$  в промышленном масштабе и получения продукта, который пригоден для клинического использования.

В соответствии с этим, один аспект изобретения направлен на способ очистки rDSPA из биологической среды, причем указанный способ включает в себя нижеследующие стадии:

- (а) нанесение среды на катионообменную смолу в условиях загрузки, которые приводят к селективному связыванию rDSPA  $\alpha 1$  с катионообменной смолой;
- (b) необязательно, промывание данной катионообменной смолы для удаления белков, не относящихся к rDSPA  $\alpha 1$ , и небелковых примесей;
- (с) селективная элюция с данной катионообменной смолы связавшегося rDSPA  $\alpha 1$ ;
- (d) нанесение элюента со стадии (с), содержащего rDSPA  $\alpha 1$ , на гидрофобно-взаимодействующую смолу в условиях загрузки, которые приводят к селективному связыванию rDSPA  $\alpha 1$  с данной гидрофобно-взаимодействующей смолой;
- (е) необязательно, промывание данной гидрофобно взаимодействующей смолы для удаления белка, не принадлежащего rDSPA  $\alpha 1$ , и небелковых примесей;
- (f) селективная элюция с гидрофобно-взаимодействующей смолы связавшегося rDSPA  $\alpha 1$ ;
- (g) нанесение элюента со стадии (f), содержащего соответствующий rDSPA  $\alpha 1$ , на смолу для хроматографии по сродству в условиях загрузки, которые приводят к селективному связыванию rDSPA  $\alpha 1$  со смолой для хроматографии по сродству;
- (h) необязательно, промывание смолы для хроматографии по сродству для удаления белка, не принадлежащего к rDSPA  $\alpha 1$ , и небелковых примесей;
- (i) селективная элюция связавшегося rDSPA  $\alpha 1$  из смолы для хроматографии по сродству для получения,

в основном, по существу чистого rDSPA  $\alpha 1$  в водном растворе.

Другим аспектом настоящего изобретения является белок rDSPA  $\alpha 1$ , который выделили и очистили способом настоящего изобретения.

Следующий аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей rDSPA  $\alpha 1$ , который выделили и очистили способом настоящего изобретения, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

Другим аспектом настоящего изобретения является способ, использования rDSPA  $\alpha 1$ , выделенного и очищенного способом настоящего изобретения, для лечения артериальных и венозных тромбозов человека.

Подробное описание настоящего изобретения. Используемые в данном описании и формуле изобретения, если не оговорено иначе, нижеследующие термины обладают следующими указанными значениями:

"Биологическая среда" относится к точному составу солей и питательных веществ, используемых для размножения клеток в культуре.

"Кондиционная среда" относится к биологической среде, в которой выращивают клетки. По этой причине данная среда обладает определенными условиями для роста соответствующих клеток и содержит продукты, секретируемые в данную среду в течение клеточного роста. Они могут представлять собой продукты отхода, продуцируемые в течение роста, или белки, которые были синтезированы и секретированы в данную среду в течение роста данными клетками.

"Катионообменная смола" относится к естественному или синтетическому веществу, обычно твердому, которое обладает способностью обменивать связанные ионы на ионы из данной окружающей жидкой среды. Катионообменная смола обладает постоянно функционирующими отрицательными ионами и обменивает положительные противоионы.

Соответствующие якорные группы (компоненты активного обмена) в коммерчески доступных катионообменниках обычно представляют собой  $-\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$ ,  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{PO}^-$  или  $-\text{ASO}_3^-$ . Слабые катионообменные смолы представляют собой смолы, в которых связывающая сила соответствующего катиона невысока, например катионы с карбоксильной или карбоксиалкильной функциями. Кроме того, слабые катионообменные смолы обычно, при кислом pH, диссоциируют не полностью. Конкретная катионообменная смола, используемая в настоящем изобретении, включает в себя матрицу из силикагелевых частиц, ковалентно связанных с полиэтилениминсиланом, в котором аминогруппы полиэтиленимина дериватизированы карбоксильными группами. Такая смола коммерчески доступна от J.T.Baker под торговым названием Widedore CBX® Chromatography resin.

"Гидрофобно взаимодействующая смола" относится к естественному или синтетическому веществу, обычно твердому, которое содержит незаряженные группы, такие как метильная, этильная или другие алкильные группы. Эти группы образуют гидрофобные связи с группами в белковых составляющих, которые пропускают через смолу, и разделяют белки по соответствующей силе взаимодействия между данным белком и группами смолы. Конкретная гидрофобно взаимодействующая смола состоит из полужестких сферических гранул, синтезированных путем сополимеризации этиленгликоля и полимеров метакрилатного типа, дериватизированных бутильными группами. Такая смола коммерчески доступна от Toso-Haas под торговым названием Toyo-Pearl® 650M C4.

"Смола для хроматографии по сродству" относится к естественному или синтетическому веществу, обычно твердому, которое используется для очистки белков. Данная смола разделяет белки на основании сродства, которое имеет место между группами данного белка и группами данной смолы. В настоящем изобретении смола, используемая в качестве смолы для аффинной хроматографии, обычно является смолой для разделения белков на основе их размера. Конкретная смола для аффинной хроматографии представляет собой сшитый сополимер из аллилдекстрана и N,N'-метиленисакриламида в соответствующей форме гранул, которые обладают способностью фракционировать глобулярные белки между 20000 и 800000 кДа. Такая смола коммерчески доступна от Pharmacia под торговым названием Sephacryl® S-400.

"Алкил" относится к неразветвленному или разветвленному моновалентному радикалу цепи, состоящему исключительно из углерода и водорода\* без насыщения и имеющего от одного до восемнадцати углеродных атомов, предпочтительно, от одного до шести углеродных атомов, например, метила, этила, n-пропила, изопропила (1-метилэтил), n-бутила, трет-бутила (1,1-диметилэтил), втор-бутила (1-метилпропил), n-пентила, n-гексила и т.п.

"Практически чистый", применительно к чистоте продукта rDSPA  $\alpha 1$ , после схемы очистки, детализированной в этой заявке, означает, что более, чем 80%, общего белка в конечном очищенном продукте представляет собой rDSPA  $\alpha 1$ , предпочтительно более, чем 90%, выделенного общего белка представляет собой rDSPA  $\alpha 1$ , и наиболее предпочтительно 98% выделенного общего белка представляет собой rDSPA  $\alpha 1$ . Содержание белка и его чистота основаны на обращенно-фазовой HPLC и анализе SDS-ПААГ.

"Белок, не принадлежащий rDSPA  $\alpha 1$ , и небелковые загрязняющие примеси" относятся ко всем материалам, иным чем rDSPA  $\alpha 1$ , обнаруженным в данной биологической среде, из которой очищали rDSPA  $\alpha 1$ .

"Фармацевтически приемлемый наполнитель" относится к приемлемому носителю, и любое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, суспендированное или включенное в данную фармацевтическую композицию, которое нетоксично и не оказывает вредного влияния на соответствующую биологическую активность данной фармацевтической композиции, должно быть, при необходимости, сопоставимо с физиологическими условиями. Подходящими наполнителями являются соединения, такие как маннитол, сукцинат, глицин или сывороточный альбумин.

"Терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству rDSPA  $\alpha 1$ , которое при введении человеку, нуждающемуся в нем, является достаточным для эффективной терапии, как указано ниже, для заболевания-состояния, характеризуемого тромбозом. Количество соединения, которое составляет

"терапевтически эффективное количество" будет варьироваться в зависимости от данного соединения, данного заболевания-состояния и его серьезности, но может быть определено традиционным любым специалистом в данной области знаний.

"Лечение" или "терапия", используемые здесь, относятся к терапии болезни-состояния у человека, чья болезнь-состояние характеризуется тромбозом, и включает:

(i) предупреждение возникновения данной болезни-состояния у человека, в частности, когда такой человек предрасположен к данному заболеванию-состоянию, но еще не диагностирован в качестве его обладателя;

(ii) подавление данного заболевания-состояния, например, остановкой его развития; или

(iii) облегчение данного заболевания-состояния, например, обеспечением регрессии данного заболевания-состояния.

"Необязательный" или "необязательно" означает, что соответствующие последовательно описываемые события или обстоятельства могут или не могут происходить, и что данное описание включает примеры, когда указанные события или обстоятельства происходят, и примеры, в которых они не происходят.

Настоящее изобретение относится к способу выделения и очистки rDSPA  $\alpha 1$  в промышленном масштабе и в форме, подходящей для использования в фармацевтических препаратах. rDSPA получали путем ферментации линии' клеток млекопитающего, способной секретировать rDSPA-продукт в культуральную среду. Кондиционную среду, например, среду, которую получают из биореактора, содержащую определенные клетки млекопитающего, собирали, и полученный rDSPA  $\alpha 1$  отделяли от других белков и примесей серийной хроматографической стадией, начинающихся с использования ионообменной смолы, с последующей селективной элюцией rDSPA из смолы. Эту rDSPA-фракцию, получаемую путем селективной элюции из катионообменной смолы, наносили затем на гидрофобно-взаимодействующую смолу, селективная элюция которой из данной матрицы обеспечивает второй уровень очистки. Эту элюированную rDSPA  $\alpha 1$ -фракцию наносили затем на смолу для аффинной хроматографии, где селективная элюция обеспечивает дальнейший уровень очистки. Этот выделенный очисткой rDSPA далее концентрировали с помощью традиционных методов, такой как ультрафильтрация, и затем лиофилизировали.

Конкретное осуществление настоящего изобретения описывается ниже.

#### A. Выделение и очистка

##### 1. Культуральная среда и клеточные линии

Культуральная среда включает основную среду, подходящую для роста клеток млекопитающих, такую как DMEM или Хэмса F12. Конкретная среда представляет собой среду Е Вильямса (Williams, G.M. и Gunn, J.M., *Exp. Cell Res.*, (1974) 89:139). Для соответствующей инокуляции ростовой фазы в данную основную среду, обычно, добавляли источник сыворотки, обычно бычью сыворотку (BS) или сыворотку новорожденного теленка (CS), представленную концентрацией в соответствующем диапазоне, от около 0,1% до 10%, по весу, обычно, представленную, около 1%-5%, по весу. Можно также добавлять другие ростовые факторы или буферы, такие как HEPES. В течение данной перфузируемой ростовой фазы концентрация данной сыворотки обычно поддерживается на одном и том же концентрационном уровне, обычно находящемся в диапазоне от около 3% до 8%, обычно, находящемся около 5%.

Клеточные линии, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают клеточные линии млекопитающих, способные к росту в суспензионной культуре и/или к росту на микроносителях. Конкретные клеточные линии, которые отвечают этим требованиям, включают линии клеток яичника китайского хомячка (ОНО), ВНК-клеток или HEK293-клеточную линию (Kratzschmer с соавт., *Gene*, (1991) 116:281-284; Petri, T., *J. BioTechnology*, (1995) 39:75-83).

Особенно предпочтительной CHO-клеточной линией является DXB11, которая описана у Ulaub G. и Chasin L.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1980) 77:4216-4220. Эти клетки кот-трансфицировали соответствующими экспрессирующими векторами pSVPA11 и pUDHFR1, которые, соответственно, содержат кодирующие последовательности для rDSPA  $\alpha 1$  и для мышинной дигидро-фолатредуктазы (Petri T., там же). Полученную трансформированную линию клеток ОНО, используемую в настоящем изобретении, обозначили GD16 и депонировали в Американской Коллекции Типовых Культур, Rockville, Maryland (ATCC) и присвоили ATCC # CRL 12023.

##### 2. Рост культуры и фаза образования продукта

После инокуляции с помощью либо сливного мундштука или других частей биореактора для культивирования данную клеточную культуру выращивали до получения плотности обычно в диапазоне около  $(1-40) \times 10^6$  клеток/мл.

По достижении требуемой плотности клеток на гранулах-микроносителях начинали перфузию свежей средой с добавленной сывороткой. Альтернативно, клетки могли выращивать в суспензионной культуре. Обычно концентрация сыворотки в свежей среде находится в диапазоне от приблизительно 2% до 10% по весу, более типично в ряду от около 3% до 8% по весу, и, более обычно, составляет около 5% по весу. Вначале скорость перфузии находится в диапазоне от около 0,25 до 0,75 культуральных объемов в день, обычно около 0,5 культуральных объемов в день. С увеличением клеточного роста данную перфузионную скорость повышают до конечной скорости в диапазоне от около 1,5 до 2,5 культуральных объемов в день, обычно после периода от 2-х до 10 дней. Во время этого роста стерильные предварительно уравновешенные гранулы микроносителя добавляли в реактор для поддержания соотношения гранул микроносителя и плотности клеток в диапазоне от около 0,5 до 1,0 грамма гранул микроносителя на  $10^9$  клеток. Гранулы-микроносители добавляли в реактор с использованием аспиратора через соответствующую трубку для образца.

По достижении требуемого уровня клеточной плотности добавление соответствующей сыворотки к свежей культуральной среде уменьшали, обычно до концентрации в диапазоне от около 0,1 до 2,0% весовых, обычно - 1%.

Культура в производственной фазе требует внимания к множеству параметров ферментации: температуре,

pH и определенному уровню растворенного кислорода, контролируемых ежедневно. Добавочная культуральная среда, сыворотка и щёлочь, необходимые для снабжения, в виде запасных емкостей исчерпывались. Образцы кондиционной среды, охарактеризованные в качестве среды, которая содержит продукт, анализировали традиционно, как минимум, каждые два дня, чтобы убедиться в том, что продукция остается свободной от загрязняющих примесей.

Соответствующая процедура отбора кондиционной среды из биореакторов минимизирует сбор урожая клеток при использовании сит с приблизительным диаметром пор 100-150 микрон. Суспензионные культуры используют проточный фильтр с перемешиванием для удержания клеток в данном биореакторе. Полученный урожай собирали в стерильные емкости и хранили до 38 дней перед дальнейшей обработкой. rDSPA  $\alpha$ 1, обнаруживаемый в биореакторном урожае, секретировался из соответствующих CHO-клеток в проточной форме, которая обладает полной биологической активностью и готова для очистки.

### 3. Катионообменная хроматография

После доведения pH до значения от 4 до 6, предпочтительно до около 5, данный rDSPA  $\alpha$ 1 в кондиционной среде наносили на катионообменную матрицу (обычно упакованную по соответствующей форме колонки) в условиях, выбранных для создания полного связывания rDSPA  $\alpha$ 1 с данной матрицей. Поскольку другие белки будут также связываться, соответствующая начальная стадия связывания создает первый уровень разделения для ряда ненужных или примесных белков и других соединений, таких как феноловый красный, неспособных в кондиционной среде связаться с матрицей и, поэтому протекающих через матрицу. Кроме того, rDSPA  $\alpha$ 1 очищали путем селективной элюции из матрицы, когда данную элюцию можно выполнить либо ступенчатой элюцией, либо линейной градиентной элюцией, увеличивая ионную силу данного буфера. В любом случае данный rDSPA  $\alpha$ 1 собирали для дальнейшей очистки, как описано ниже.

Подходящие катионообменные матрицы включают широкое разнообразие смол, дериватизированных катионными функциональными группами, которые обладают способностью связывать rDSPA  $\alpha$ 1. Предпочтительными являются синтетические смолы, такие как смолы, которые включают частицы силикагеля, поперечно-сшитую агарозу или поперечно-сшитые полимеры полиметакрилата, дериватизированные катионными функциональными группами, такими как карбоксильная, карбоксиметильная, сульфониловая, фосфорильная и т.п. Особенно пригодными являются относительно слабые смолы, такие как смолы, обладающие карбоксильной или карбоксиалкильной функциями, такими как карбоксиметильная или карбоксиэтильная. Особенно предпочтительная смола включает матрицу из частиц силикагеля, ковалентно связанных с полиэтиленминсиланом, с аминогруппами данного полиэтиленминсилана, дериватизированного карбоксильными группами. Такая смола представляет собой Baker Widedore CBX® (с размером гранулы 45мм), которая коммерчески доступна от J.T.Baker.

Соответствующие условия связывания и элюции варьируются в зависимости от силы связывания катионной смолы. Для слабых катионных смол, такой как Baker Widedore CBX, связывание может быть эффективным при низкой ионной силе в слегка закисленных условиях, обычно при pH 4-7, предпочтительно, около pH 5. После промывания матрицы rDSPA  $\alpha$ 1 можно селективно элюировать, выдерживая матрицу в подвижной фазе, обладающей повышенной ионной силой, применяя либо линейную, либо ступенчатую элюцию. Для указанной Baker Widedore CBX смолы rDSPA  $\alpha$ 1 будет элюироваться при pH около 7,5 с солевой концентрацией между около 100мМ и 500мМ NaCl. Колонку можно затем вымыть и регенерировать для последующего использования.

Предпочтительно, что касается Baker Widedore CBX матрицы, смолу вначале уравнивали буфером из 100мМ натрия-цетата, pH 5. Буфер наносили на колонку при скорости потока от 0,2 до 2,0 колоночных объемов в минуту, до тех пор пока pH вытекающего потока не достигнет 5. Кондиционную среду, содержащую rDSPA  $\alpha$ 1, фильтровали через 1,2мкм фильтр и затем титровали до pH между 4 и 7, наиболее предпочтительно -5, используя ледяную уксусную кислоту. Эту среду наносили затем на колонку обычно с использованием механического насоса при скорости потока не более, чем 2,0 колоночных объема в минуту. Готовили фильтр для удаления макрочастиц, которые могут закупоривать матрикс данной колонки. Затем эту колоночную матрицу вновь уравнивали уравнивающим ацетатным буфером до значения pH, установленного на 5, что обычно требует от около 2 до 7 колоночных объемов. Промывочный буфер, содержащий 50мМ натрийфосфата, pH 7,5, наносили на колонку от около 0,1 до 0,2 колоночных объемов в минуту до достижения pH элюента значения 7,5. Затем из этой колонки элюировали rDSPA  $\alpha$ 1 с использованием элюирующего буфера, содержащего 50мМ натрийфосфата, 500мМ натрийхлорида, pH 7,5. Элюирующий буфер пропускали до тех пор, пока белок более не обнаруживали в элюенте из колонки. Затем на эту колонку наносили десорбирующий буфер, содержащий 2,0М натрияцетата, pH 8, с целью регенерировать данную матрицу. Соответствующий буфер для хранения содержит 10% уксусной кислоты и 45% этанола.

### 4. Хроматография гидрофобного взаимодействия

Фракцию rDSPA  $\alpha$ 1, собранную с катионообменной матрицы, затем наносили на матрицу для гидрофобного взаимодействия (обычно в форме соответствующей колонки) в условиях, позволяющих связываться данному rDSPA  $\alpha$ 1 с матрицей, обычно - высокой ионной силы и низкого pH. Затем rDSPA  $\alpha$ 1 селективно элюировали увеличивающейся концентрацией органического растворителя подвижной фазы, наносимого на данную колонку с использованием линейного или ступенчатого градиента. Элюируемую фракцию rDSPA  $\alpha$ 1 собирали для дальнейшей очистки. Эта стадия снижает примесь ДНК в 100-1000 раз и инактивирует потенциальные вирусные примеси.

Подходящие гидрофобно взаимодействующие матрицы включают широкое разнообразие незаряженных смол, обладающих ковалентно присоединенными гидрофобными группами, такими как пропиленная, бутильная, октальная, фенильная и им подобные. Эти смолы могут представлять собой поперечно-сшитые органические полимеры, такие как стиролдивинилбензол, силикагель, агароза, полиметакрилат или любую одну из широкого множества других подходящих частиц-носителей. Особенно предпочтительная смола

включает полужесткие сферические гранулы, синтезированные еополимеризацией этиленгликоля и полимеров метакрилатного типа, дериватизированных бутильными группами. Такая смола представляет собой Toyo-Pearl (40-90мкм-овые гранулы), которая коммерчески доступна от Toso-Haas.

Связывание с гидрофобно взаимодействующей колонкой эффективно в условиях высокой ионной силы, обычно при кислотном pH 3-5, более обычно, около 4. Практически весь белок, содержащийся во фракции rDSPA  $\alpha$ 1, который элюировали с катионообменной смолы, связывается в гидрофобно взаимодействующей колонке. Разнообразные белки могут быть селективно элюированы на основе их отличающихся сил гидрофобного взаимодействия с соответствующими гидрофобными группами на данной матрице, например, в порядке увеличения гидрофобности соответствующего белка. Элюцию можно осуществить ступенчатым или линейным градиентом обычно алкогольным элюентом, таким как этанол или изопропанол. Особенно предпочтительным алкоголем является этиловый спирт.

Предпочтительно, что касается матрицы Toyo-Pearl 04, уравнивание можно осуществить уравнивающим буфером, содержащим 50мМ натрийацетата, 500мМ натрийхлорида, pH 4. Затем фракцию rDSPA  $\alpha$ 1 с ионообменной колонки титруют до pH 4 и наносят на 04-матрицу, а матрицу затем вновь уравнивают вышеописанным уравнивающим буфером. Колонку промывают последовательно двумя буферами следующим образом. В первой промывке (промывка 1) использовали, как минимум, два колоночных объема буфера, содержащего 20 мМ HCl. Промывание продолжали до получения вытекающего потока, не содержащего белка, что устанавливали по стабильной УФ-абсорбции. Данную матрицу вновь промывали (промывка 2) не менее, чем 10 колоночными объемами буфера, содержащего 19% этанола, 20мМ HCl, и промывание продолжали буфером, содержащим 20,5% этанола, 20мМ HCl, до тех пор, пока белок не прекращал элюироваться. Элюция rDSPA  $\alpha$ 1-продукта эффективна с использованием буфера, содержащего 29% этанола, 20мМ HCl, pH 2,5. После элюции продукта колонку промывали не менее, чем двумя колоночными объемами буфера, содержащего 100мМ NaOH. Данную матрицу хранили в первом промывочном буфере.

#### 5. Аффинная хроматография

Фракцию rDSPA  $\alpha$ 1, собранную с гидрофобно взаимодействующей смолы, наносили затем на аффинную матрицу (обычно в форме соответствующей колонки) в условиях, которые позволяют связываться rDSPA  $\alpha$ 1 с аффинной матрицей. До тех пор, пока rDSPA  $\alpha$ 1 остается связанным в колонке, примеси элюируют путем промывания колонки 2-3 колоночными объемами 20мМ HCl. Эта стадия облегчает обмен буфера с добавленным фармацевтическим препаратом и растворимость, а также помогает инактивировать/удалять потенциальные вирусные примеси; Предпочтительно, используют 2,5 колоночных объемов данного буфера. Затем этот rDSPA  $\alpha$ 1 селективно элюируют с использованием буфера, содержащего 200мМ глицина, свободное основание при pH между 4 и 5. Получаемую фракцию rDSPA  $\alpha$ 1 собирают для концентрирования.

В настоящем изобретении соответствующие смолы\* используемые в качестве аффинных смол, представляют собой смолы, которые обычно используются как смолы для эксклюзии по размеру. Подходящие аффинные матрицы включают смолы, включающие поперечно-сшитый полимер аллилдекстрана и N,N'-метиленисакриламид в форме гранул с диаметром между 25 и 75мкм. Особенно предпочтительной смолой является Sepharose 400®, который коммерчески доступен от Pharmacia и обладает способностью фракционировать глобулярные белки между 20000 и 800000кД.

Связывание rDSPA  $\alpha$ 1 с аффинной смолой осуществляется в условиях низкой ионной силы и низкого pH. Практически весь rDSPA  $\alpha$ 1, собранный с гидрофобно взаимодействующей смолы, связывается в колонке. Связавшийся rDSPA  $\alpha$ 1 можно селективно элюировать путем повышения pH и/или ионной силы. Элюцию можно осуществить ступенчатым или линейным градиентом, обычно элюентом, содержащим 200мМ глицина, свободное основание.

Предпочтительно\* что касается матрицы Sepharose S-400, уравнивание можно осуществить буфером, содержащим 19% этанола, 20мМ HCl, до тех пор, пока pH в вытекающем потоке не останется неизменным. Матрицу загружали полученной из указанной гидрофобно взаимодействующей колонки фракцией rDSPA  $\alpha$ 1, а затем промывали буфером, содержащим 20мМ HCl до получения неизменяющегося УФ-сигнала в вытекающем потоке. Элюция связанного rDSPA  $\alpha$ 1 эффективна с использованием буфера, содержащего 200мМ глицина. После элюции продукта колонку десорбировали не менее, чем двумя колоночными объемами буфера, содержащего 100мМ NaOH. После промывания матрицы, как минимум, двумя колоночными объемами соответствующего промывочного буфера (20мМ HCl) очищенную матрицу хранили в этом буфере.

#### 6. Концентрирование

Выделенный очисткой белок настоящего изобретения можно затем сконцентрировать обычно путем фильтрации или подобным образом, и можно, в конечном счете, лиофилизировать или иным образом ввести в стандартные фармацевтические препараты. Пригодные методы концентрирования и лиофилизации хорошо описаны в научной литературе.

#### В. Приготовление лекарственного средства

##### 1. Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение предлагает реагент с существенной терапевтической ценностью. rDSPA  $\alpha$ 1, который должен быть пригоден для лечения артериальных и венозных тромбозов, выделяют очисткой соответствующими описанными способами.

Рекомбинантный DSPA  $\alpha$ 1, очищенный, как здесь описано, можно вводить пациенту. Этот реагент можно сочетать для терапевтического использования с другими ингредиентами, например, с фармацевтически приемлемыми традиционными носителями или разбавителями, вместе с физиологически безвредными стабилизаторами и наполнителями. Эти сочетания могут быть стерильно отфильтрованы и размещены в дозированные формы путем лиофилизации в дозируемых флаконах или сохранены в стабилизированных водных препаратах.

Соответствующие количества реагента, необходимые для эффективной терапии, будут зависеть от многих различных факторов, включающих способы введения, физиологическое состояние конкретного пациента и другие вводимые медикаменты. Поэтому терапевтические дозы следует подбирать, чтобы обеспечить безопасность и эффективность. Обычно дозы, используемые *2l vitro*, снабжены полезным руководством по пригодности соответствующих количеств для введения этих реагентов *in situ*. Тестирование на животном эффективных доз для терапии обеспечивает прогнозируемый критерий дозирования для человека.

Каждое в отдельности соображение описано, например, у Gilman с соавт. (eds) (1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8<sup>th</sup> Ed., Pergamon Press; и Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Perm.

Здесь и ниже обсуждаются способы введения, например, пероральное, внутривенное, внутривентральное или внутримышечное введение, чрезкожная диффузия и другие. Фармацевтически приемлемые носители будут включать воду, физраствор, буферы и другие описываемые соединения, например, в Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jersey. На основании назначенных доз других активаторов плазминогена нужную тотальную дозу следует рассчитывать между 80 и 110 мг (Physicians' Desk Reference, 49<sup>th</sup> ed. (1995), Medical Economics Data Production Company, pp 1083-1085).

Терапевтические препараты могут быть введены в любом удобном дозированном составе. Поскольку соответствующий активный ингредиент можно назначать сам по себе, предпочтительно представлять его в виде фармацевтического препарата. Препараты включают, как минимум, один активный ингредиент, указанный выше, вместе с одним или несколькими приемлемыми носителями. Каждый носитель должен быть одинаково приемлем, фармацевтически и физиологически, в смысле совместимости с другими ингредиентами и не навредить конкретному пациенту. Препарат включает компоненты, подходящие для перорального или парентерального (включая подкожное, внутримышечное, внутривенное и интрадермальное) введения. Соответствующие препараты могут быть удобно представлены в форме дозовой единицы и могут быть изготовлены любыми способами, хорошо известными специалистам аптечного дела. Смотрите, например, Gilman с соавт., там же, и Remington там же.

В итоге соответствующие предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в Кратком изложении существа изобретения, являются следующими:

способ соответствующего выделения и очистки rDSPA  $\alpha 1$  из биологической среды, отличающийся тем, что указанный способ включает следующие стадии:

(a) нанесение среды при pH 5 на катионообменную смолу, включающую матрицу из частиц силикагеля, ковалентно связанных с полиэтилениминсиланом, в котором соответствующие аминогруппы дериватизированы карбоксильными группами, что приводит к селективному связыванию rDSPA  $\alpha 1$  с данной катионообменной смолой;

(b) промывание данной катионообменной смолы с pH 5 100мМ NaOAc и 50мМ NaPO<sub>4</sub> с pH 7,5 для удаления белка не принадлежащего к rDSPA  $\alpha 1$ , и небелковых загрязняющих примесей;

(c) элюция связанного rDSPA  $\alpha 1$  с катионообменной смолы буфером, содержащим 50мМ натрийфосфата и 500мМ натрийхло-рида с pH 7,5;

(d) нанесение элюента со стадии (c), содержащего данный rDSPA  $\alpha 1$ , при pH 4 на гидрофобно-взаимодействующую смолу, включающую полужесткие сферические гранулы, синтезированные сополимеризацией этиленгликоля и полимеров метакрилатного типа, дериватизированных бутильными группами, что приводит к селективному связыванию rDSPA  $\alpha 1$  с гидрофобно взаимодействующей смолой;

(e) промывание гидрофобно взаимодействующей смолы 20мМ HCl, а затем 20мМ HCl, содержащей 19% EtOH для удаления белка, не принадлежащего к rDSPA  $\alpha 1$  и небелковых загрязняющих примесей;

(f) элюция связанного rDSPA  $\alpha 1$  с гидрофобно взаимодействующей смолы буфером, содержащим 29% этанола и 20мМ хлористоводородной кислоты с pH 2,5;

(g) нанесение элюента со стадии (f), содержащего данный rDSPA  $\alpha 1$ , при pH 2,5 на смолу для аффинной хроматографии, включающую поперечно-сшитый полимер аллилдекстрана и N,N'-метиленисакриламида, который фракционирует глобулярные белки между 20000 и 800000кД, что приводит к селективному связыванию rDSPA  $\alpha 1$  со смолой для аффинной хроматографии;

(h) промывание этой смолы для аффинной хроматографии 20мМ HCl для удаления белка, не принадлежащего rDSPA  $\alpha 1$ , и небелковых загрязняющих примесей;

(i) элюция связанного rDSPA  $\alpha 1$  со смолы для аффинной хроматографии буфером, содержащим 200мМ глицина с pH между 4 и 5, для получения практически чистого rDSPA  $\alpha 1$  в водном растворе.

Нижеследующие конкретные препараты и примеры предлагаются в качестве руководства для практического применения настоящего изобретения и не подразумевают ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1

Культура клеток, продуцирующая rDSPA  $\alpha 1$

Оттаивали ампулу из DSPA Working Cell Bank и инокулировали в роллерную бутылку с 5% сыворотки теленка в ростовой среде (WEC 5.0 среда, модифицированная по Williams). Через двухнедельный период эти клетки размещали в четыре роллерные бутылки, полученные клетки трипсинизировали из этих четырех роллерных бутылок и инокулировали в четыре 1 литровые вращающиеся колбы, каждая с  $4 \times 10^8$  клеток в *l* ростовой среды. Спустя четыре дня полученные из этих четырех вращающихся колб культуры использовали для инокулирования 10 литрового биореактора. Дополнительный 1л ростовой среды добавляли в эту биореакторную культуру в день инокуляции. На следующий день это биореактор заполняли до 10л ростовой средой. Культивирование с добавлением и без добавления микрогранул-носителей осуществляли по этому протоколу. pH данной среды поддерживали на уровне 7,0-7,4, а уровень насыщения кислорода поддерживали постоянно с помощью барботажной системы. Температуру поддерживали на уровне 34-39°C.

Плотность клеток составляла в день инокуляции в биореакторе  $8,1 \times 10^5$  клеток на мл, а спустя два дня клеточная плотность удваивалась, за время, когда скорость перфузии составила 0,5 культуральных объемов в день (св/день). Скорость перфузии увеличивали по отношению к плотности клеток так, чтобы через девять дней после инокуляции данного биореактора указанная плотность достигала  $6,2 \times 10^6$  клеток/мл, и перфузию увеличивали до 2 св/день.

Затем биореактор переключали на продукционную среду (1% сыворотки теленка в среде WEC 5.0) и двумя днями позже начали собирать урожай клеток и продолжили в течение 10 недель. В течение продукционной фазы средняя плотность клеток составляла  $15 \times 10^6$  клеток на мл с приблизительной жизнеспособностью 75%. Продукция rDSPA  $\alpha 1$  составляла, в среднем, 40мг rDSPA  $\alpha 1$  на литр, а средняя удельная продуктивная скорость равнялась 6 пикограммам rDSPA  $\alpha 1$  на клетку в день.

Наращивание объемов ферментирования осуществляли путем перенесения половины данного содержимого из одного реактора в новый сосуд. Продуктивную среду, размещенную в обоих биореакторах, перфузировали при 2 св/день и сразу же собирали полученный урожай клеток.

#### Пример 2

##### Очистка rDSPA $\alpha 1$

1. Катионообменная хроматография (Колонка А). Урожай клеток данного биореактора хранили при температуре окружающей среды (15-25°C). Затем фильтровали через 0,45 микронный фильтр до загрузки на катионообменную колонку. Очистку полученного урожая клеток начинали со стадии колоночной хроматографии, используя СВХ-смолу, изготовленную J.T.Baker (Колонка А). Эта стадия существенно облегчает очистку данного белка.

Буферы для Колонки А состоят из Буфера А1: уравнивающий буфер (50мМ NaOAc, при pH 5,0), Буфера А2: промывочный буфер (50мМ NaPO<sub>4</sub>, pH 7,5), Буфера А3: элюирующий буфер (50мМ NaPO<sub>4</sub>, 500мМ NaCl, pH 7,5), Буфера А4: буфер для десорбции (2М NaAc, pH 8,0), и Буфера А5: буфер для хранения (45% EtOH, 10% HOAc).

Нижеследующие рабочие параметры колонки свойственны колонке, набитой 6кг смолы и обладающей колоночным объемом 15л. Не более, чем 4,5г rDSPA  $\alpha 1$  можно нагрузить на данную колонку на цикл хроматографирования. Данную колонку нагружали при скорости потока не более, чем 2л в минуту и не более, чем при 20psi (137,9кПа) колоночного давления. Технические условия колонки и следующее устройство проверяли перед каждым хроматографированием. Данный нагружаемый материал и хроматографические буферы дегазировали путем барботирования гелием перед использованием.

Клетки, полученные в данном биореакторе, фильтровали с помощью 1,2мм фильтра, затем титровали до pH 5,00 ( $\pm 0,10$ ) с использованием ледяной уксусной кислоты. Перед загрузкой данную колонку уравнивали не менее, чем 30 литрами буфера А1 до тех пор, пока pH в вытекающем потоке не составлял 5,00 ( $\pm 0,20$ ). Колонку однократно уравнивали, на колонку нагружали полученный урожай клеток. Эту колонку вновь уравнивали не менее, чем 80 литрами буфера А1. Данная колонка считается надлежащим образом уравновешенной, когда вытекающий поток имеет pH 5,00 ( $\pm 0,20$ ), и когда достигается стабильная нулевая УФ-линия. Колонку промывают не менее, чем 145 литрами буфера А2. Эта колонка является промытой надлежащим образом, когда вытекающий поток имеет pH 7,50 ( $\pm 0,20$ ), и когда достигается стабильная нулевая УФ-линия.

Соответствующий продукт элюируют из данной колонки не менее, чем 30 литрами буфера А3 и собирают в отдельные сосуды. Элюция считается полной, когда достигается стабильная нулевая УФ-линия. После элюции продукта колонку десорбируют до стабильной нулевой УФ-линии с использованием не менее 30 литров буфера А4. Затем эту колонку обрабатывают начисто для повторного использования (не превышая 50 циклов использования). Продукт данной колонки А (или элюата) хранят при 2-8°C. Выход в среднем составил 93%, а степень чистоты (белка) из данного элюата в среднем составила 81%.

2. Хроматография гидрофобного взаимодействия (Колонка В). После хроматографирования на СВХ-смоле данный rDSPA  $\alpha 1$ -продукт хроматографировали с использованием гидрофобно взаимодействующей смолы C4 (Toso-Haas) (Колонка В). Эта стадия способствует существенному удалению небелковых загрязняющих примесей и помогает также в соответствующем инактивировании/удалении возможных вирусных загрязняющих примесей. Буферы для колонки В состоят из Буфера В1: уравнивающий буфер (50мМ NaOAc, 500мМ NaCl, pH 4,0), Буфера В2: буфер для промывки и хранения (20мМ HCl), Буфера В3: промывочный буфер (20мМ HCl, 19% EtOH), Буфера В4: промывочный буфер (20мМ HCl, 20,5% EtOH), Буфера В5: элюирующий буфер (20мМ HCl, 29,5% EtOH) и Буфера В6: буфер для десорбции (0,1 N NaOH). Нижеследующие рабочие параметры данной колонки являются подходящими для колоночного объема 15л. Не более, чем 9г rDSPA  $\alpha 1$  можно нагрузить на данную колонку для одного цикла хроматографирования. Данную колонку нагружали при скорости потока не более, чем 2л/мин, и не более, чем при 15psi (103,425кПа) колоночного давления. Спецификации данной колонки и следующего устройства проверяли перед каждым циклом хроматографирования.

Перед загрузкой данную колонку уравнивали до тех пор, пока вытекающий поток не достигнет pH 4,00 ( $\pm 0,20$ ). Элюат из данной колонки титровали до pH 4,00 ( $\pm 0,10$ ) с использованием ледяной уксусной кислоты, дегазировали и нагружали. Эту колонку повторно уравнивали не менее, чем 30 литрами Буфера В1 до тех пор, пока pH вытекающего потока не достигал pH 4,00 ( $\pm 0,20$ ) и стабильной нулевой УФ-линии. Колонку промывали тремя буферами. Первую промывку осуществляли не менее, чем 45 литрами Буфера В2. Колонка является основательно промытой, когда вытекающий поток имеет pH 1,90 ( $\pm 0,20$ ), и когда достигается стабильная нулевая УФ-линия. Колонку промывали второй раз не менее, чем 145 литрами Буфера В3 до тех пор, пока не достигалась стабильная нулевая УФ-линия. Колонку промывали в третий раз не менее, чем 30 литрами Буфера В4, и она является полностью промытой, когда достигается стабильная нулевая УФ-линия.

rDSPA  $\alpha 1$  элюировали с колонки не менее, чем 30 литрами Буфера В5 и собирали в отдельный сосуд.

Элюцию продолжали до тех пор, пока не достигалась стабильная нулевая УФ-линия. Затем данную колонку обрабатывали начисто для повторного использования (не превышая 50 циклов использования). Продукт с колонки В (или из элюата) хранили при 2-8°C не более, чем 15 дней перед дальнейшим процессированием. Выход в среднем составил 91%, а полученная чистота (белка) из данного элюата составила в среднем 97%.

3. Хроматография по сродству (Колонка С). Продукт с колонки В хроматографировали затем с использованием Sephacryl S-400 (Pharmacia) (Колонка С). Эта стадия способствует обмену буфера и добавленного препарата, а также помогает в соответствующем инактивировании/удалении вирусных загрязняющих примесей. Буферы колонки С состоят из Буфера С1: уравнивающий буфер (20мМ HCl, 19% EtOH), Буфера С2: промывочный буфер (20мМ HCl), Буфера С3: буфер для элюции и хранения (200мМ глицина, стерильно фильтрованного) и Буфера С4: десорбционный буфер (0,1 N NaOH). Нижеследующие рабочие параметры данной колонки являются подходящими для колоночного объема 10л. Не более, чем 20г rDSPA  $\alpha$ 1 можно нагрузить на данную колонку для одного цикла хроматографирования. Данную колонку нагружали при скорости потока не более, чем 0,5л/мин и не более, чем при 15psi (103,425кПа) колоночного давления. Элюаты, полученные из одной или нескольких колонок В, объединяли, затем разбавляли элюат одной частью Буфера С2 и двумя частями Буфера С3. Конечная концентрация этанола составляла приблизительно 19%.

Перед загрузкой данную колонку уравнивали не менее, чем 15 литрами Буфера С1, до тех пор, пока вытекающий из нее поток не имел pH 1,80 ( $\pm 0,20$ ). После загрузки данную колонку промывали не менее, чем 30 литрами Буфера С2. Колонка является основательно промытой, когда получаемый УФ-сигнал является стабильным. Продукт элюировали с колонки не менее, чем 20 литрами Буфера С3 и собирали в отдельный сосуд. Элюцию продолжали до тех пор, пока не достигали стабильной нулевой УФ-линии.

После элюции продукта колонку десорбировали не менее, чем 12 литрами Буфера С4 хранили до повторного использования, не превышающего 20 циклов. Соответствующий продукт (или элюат) с колонки С разбавляли Буфером С до концентрации < 1мг в мл и хранили для дальнейшего процессирования. Выход rDSPA  $\alpha$ 1 в среднем составил 97%, а чистота (белка) из данного элюата составила в среднем 98%.

Стадии концентрирования и приготовления лекарственного препарата следовали за окончанием стадий очистки и осуществлялись на элюате аффинной колонки S-400, которую сохраняли не более, чем 70 дней. Элюаты колонки С объединяли и концентрировали при помощи спирально навивной (spiral wound) ультрафильтрационной мембраны, которая удаляет низкомолекулярные вещества (30000 дальтонная отсечка). Данный продукт собирали в апиrogenную емкость в концентрации более, чем 8мг/мл. Добавляли маннитол до конечной концентрации 4%.

Добавляли конечный рецептурный буфер (200мМ глицин, 4% маннитол (в/о)) для доведения массы рецептурного продукта до 7,5мг/мл. Затем полученный объем рецептурного продукта стерильно фильтровали, расфасовывали во флаконы и лиофилизировали.