



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.09.26**

**(21)** Номер заявки  
**201900326**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.12.20**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)  
**C07K 16/10** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

**(54) УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЕ СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ И СВЕДЕНИЯ К МИНИМУМУ АГРЕГАЦИИ В ПРОЦЕССАХ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ, ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ И СТАБИЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫЕ ЭТИМИ СПОСОБАМИ**

**(31)** **201621044139**

**(32)** **2016.12.23**

**(33)** **IN**

**(43)** **2019.11.29**

**(86)** **PCT/IB2017/058194**

**(87)** **WO 2018/116198 2018.06.28**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**СЕРУМ ИНСТИТЬЮТ ОФ ИНДИЯ  
ПРАЙВИТ ЛИМИТИД (IN)**

**(72)** Изобретатель:  
**Мхаласакант Дхири Раджив, Шанкар  
Пизал Самбхаджи, Редди Педди  
Редди Сринивас, Чахар Сингх  
Дигамбер, Равиндра Йеолокар Лина,  
Сингх Чоухан Панкадж, Даттатрай  
Аваласкар Нихил (IN)**

**(74)** Представитель:  
**Шерстин А.Ю. (RU)**

**(56)** US-B1-8613919  
KUNERT RENATE ET AL: "Advances in recombinant antibody manufacturing", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, DE, vol. 100, no. 8, 3 March 2016 (2016-03-03), pages 3451-3461, XP035870818, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S00253-016-7388-9 [retrieved on 2016-03-03] page 3455, right-hand column, paragraph 3 - page 3456, right-hand column, paragraph 1 table 1

REINHART DAVID ET AL: "Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, DE, vol. 99, no. 11, 7 April 2015 (2015-04-07), pages 4645-4657, XP035502970, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S00253-015-6514-4 [retrieved on 2015-04-07] tables 1, 2, 4 figure 2 page 4646, left-hand column, last paragraph page 4646, right-hand column, paragraph 3

LIANCHUN FAN ET AL: "Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 109, no. 4, 21 November 2011

(2011-11-21), pages 1007-1015, XP055213290, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.24365 page 1008, left-hand column, lines 18-22 page 1008, right-hand column, paragraph 2

WO-A1-2012125735

PETRA GRONEMEYER ET AL: "Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing", BIOENGINEERING (BASEL, SWITZERLAND) 08 MAY 2017, vol. 1, no. 4, 1 October 2014 (2014-10-01), pages 188-212, XP055461223, ISSN: 2306-5354, DOI: 10.3390/bioengineering1040188 page 196, paragraph 2

SHUKLA A A ET AL: "Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 28, no. 5, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 253-261, XP027020088, ISSN: 0167-7799 [retrieved on 2010-03-19] page 254, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1

DAUGHERTY ANN L ET AL: "CHAPTER 8: Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics", CURRENT TRENDS IN MONOCLONAL ANTIBODY DEVELOPMENT AND MANUFACTURE, SPRINGER, US, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 103-129, XP009180430, ISBN: 978-0-387-76642-3 page 107, paragraph 2

WO-A1-2015122995

WO-A1-2006084006

Anonymous: "Scale-up of CHO fed-batch cultures in HyClone(TM) ActiPro(TM) medium supplemented with Cell Boost(TM) 7a and 7b", 11 October 2016 (2016-10-11), pages 1-4, XP055461185, Hoboken Retrieved from the Internet: URL: http://www.processdevelopmentforum.com/ppts/posters/Scale-up\_of\_CHO\_fed-batch\_cultures\_in\_HyClone(TM)\_ActiPro.PDF [retrieved on 2018-03-20]

SOMMERFELD S ET AL: "Challenges in biotechnology production-generic processes and process optimization for monoclonal antibodies", CHEMICAL ENGINEERING AND PROCESSING, ELSEVIER SEQUOIA, LAUSANNE, CH, vol. 44, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 1123-1137, XP027608266, ISSN: 0255-2701 [retrieved on 2005-10-01] cited in the application

WO-A2-2011104381

WO-A2-2011085158

WO-A1-2017165736

US-A1-2017088873

- 
- (57) Изобретение относится к эффективной платформе для производства и получения композиций антител, которая обеспечивает: i) технологию культивирования клеток с усовершенствованной стратегией подпитки, которая обеспечивает повышенный титр антител от 2 до 5 г/л; ii) усовершенствованный процесс очистки, демонстрирующий оптимальную степень извлечения антител в процентах, высокое содержание мономеров, минимальную агрегацию/образование частиц, минимальные уровни примесей; iii) высококонцентрированную стабильную жидкую композицию с оптимальной осмоляльностью и низкой вязкостью при различных колебаниях температуры, не подверженную агрегации. Предпочтительные антитела включают моноклональные антитела IgG1, специфичные к эпитопу вируса денге в домене III белка E, и моноклональные антитела IgG1, специфичные к поверхностному гликопротеину G вируса бешенства.

047905 B1

047905 B1

---

### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

Настоящее изобретение относится к усовершенствованным способам повышения продуктивности антител в культурах клеток млекопитающих и сведения к минимуму агрегации в процессах выделения и очистки, получения композиций и к стабильным композициям антител, полученным этими способами.

### **Сведения о предшествующем уровне техники**

Наращивание биомассы, выделение и очистка и получение композиции часто являются фактором, ограничивающим скорость процесса, на первоначальных этапах включения биопрепаратов в клинические исследования. Например, лихорадка денге является самым распространенным вирусным заболеванием, передаваемым комарами. Половина мирового населения проживает в зонах риска заболевания лихорадкой денге, что по расчетным данным приводит ежегодно к 390 миллионам случаев заражения в год по всему миру. На текущий момент утвержденные противовирусные средства для лечения лихорадки денге отсутствуют, а испытания последних вакцин не оправдали ожиданий. Наиболее перспективная экспериментальная вакцина недавно продемонстрировала ограниченную эффективность, по оценкам порядка 30-60% при ограниченной или статистически не значимой защите от DENV-2. Недавно был определен не иммунодоминантный, но функционально значимый эпитоп в домене III белка E и разрабатывается сконструированное антитело Ab513, которое проявляет высокую аффинность связывания и широко нейтрализует различные генотипы во всех четырех серотипах (см. Ram Sasisekharan et al Cell 162, 1-12, 30 июля 2015 г.; Samir Bhatt et al, Nature, 25 апреля 2013 г.; 496 7446: 504-507). Таким образом, что касается мировой медицинской потребности в моноклональных антителах к вирусу денге, последние оценки показывают, что ежегодно по всему миру происходит до 390 миллионов случаев заражения вирусом денге, из которых >90 миллионов приводят к развитию заболевания, что делает DENV угрозой мирового масштаба. Если предположить, что 30% из 16 миллионов диагностированных случаев лихорадки денге приводят к госпитализации, то около 5 миллионов человек нуждаются в упомянутых моноклональных антителах к вирусу денге, таким образом, "очищенные антитела" с титром выше 4 г/л являются обязательным условием для удовлетворения мировой потребности в жизненно важных антителах. Кроме того, бремя лихорадки денге является высоким в развивающихся странах, в которых качество электрооборудования и холодильной техники зачастую является недостаточным, в связи с чем стабильность антител при колебаниях температуры является для этих регионов более значимой.

Наличие технологической платформы для изготовления и получения композиций всех экспериментальных моноклональных антител-кандидатов (mAb) позволило бы существенно сократить время и ресурсы, необходимые для разработки технологии. Оно может оказать значительное влияние на количество клинических кандидатов, которые могут быть включены в клинические исследования. Кроме того, технологии, разрабатываемые для начальных этапов клинических исследований, в том числе с использованием платформы, могут быть неоптимальными в отношении производственной экономики, выхода, объема пулов, производительности и могут не подходить для производства объемов, необходимых для более поздних этапов или промышленного производства. Еще одним важным соображением является скорость разработки технологий с учетом того, что эта разработка требуется перед включением терапевтического кандидата в клинические исследования (см. Abhinav A. Shukla et al Journal of Chromatography B, 848 (2007) 28-39).

Как правило, среды для культивирования клеток млекопитающих основаны на коммерчески доступных составах культуральных сред, включая, например, DMEM или Ham's F12. Зачастую составы сред недостаточно обогащены для поддержки увеличивающихся темпов роста клеток и биологической экспрессии белка. Остается потребность в усовершенствованных средах для культивирования клеток, добавках и способах культивирования клеток для улучшенного продуцирования белка. Согласно опубликованным данным было достигнуто повышение титра антител в клеточной культуре до уровня >2 г/л. См. F. Wurm, Nat. Biotechnol. 22 (2004) 1393. Кроме того, в перфузионных реакторах возможно достижение намного более высокой плотности клеток, чем в реакторах периодического действия или периодического действия с подпиткой (см. Sven Sommerfeld et al Chemical Engineering and Processing 44 (2005) 1123-1137). Тем не менее, перфузионные технологии являются сложными, дорогостоящими и могут быть сопряжены с проблемами стерильности и нежелательной неоднородностью профиля гликозилирования. Добавление гидролизатов, не содержащих компоненты животного происхождения (Vacto TC Yeastolate, Phytone Peptone), в среду с определенным химическим составом является общим подходом к оперативному увеличению плотности клеток, жизнеспособности культуры и продуктивности. Гидролизаты - это белковые перевары, состоящие из аминокислот, малых пептидов, углеводов, витаминов и минералов, которые вносят в среды питательные добавки. Гидролизаты неживотного происхождения из сои, пшеницы и дрожжей широко применяются в средах для культивирования клеток и подпитках для улучшения титра антител (см. US9284371). Тем не менее, в связи со сложностью состава, разбросом между партиями, нежелательным повышением вязкости культуры, дрожжевой экстракт и гидролизаты могут являться значимым источником изменчивости среды. В связи со сложностью продуктов антител, которые включают изоформы и микрөгетерогенности, эффективность технологии культивирования клеток может оказывать значительное влияние на качество и активность продукта, в частности, в отношении гликозилирования, посттранскрипционных модификаций и профилей примесей.

При повышенных концентрациях белки, в частности, антитела, зачастую демонстрируют характерные проблемы, включая агрегацию, преципитацию, гелеобразование, пониженную стабильность и/или повышенную вязкость.

Общепризнано, что антитела обладают характеристиками к образованию агрегатов и частиц в растворе, поскольку они подвергаются деградации, агрегации, денатурации или модификациям химической структуры, которые приводят к потере биологической активности в процессе производства и/или хранения с течением времени. Образование агрегатов антител возможно при экспрессии культур клеток, выделении и очистке, получении композиций и хранении. Собранные клетки культуры, как правило, содержат большое количество агрегатов, которые образуются в процессе культивирования (см. Deqiang Yu *Journal of Chromatography A*, 1457 (2016) 66-75). Пути деградации белков могут вносить химическую нестабильность (например, любой процесс, связанный с модификацией белка путем образования или расщепления связей, с образованием новых химических соединений) или физическую нестабильность (например, изменения в структуре высшего порядка белка). Тремя наиболее распространенными путями деградации белков являются агрегация, дезамидирование и окисление. Cleland et al *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993). Кроме того, белки также являются чувствительными, например, к pH, ионной силе, тепловому напряжению, сдвиговым напряжениям и касательным напряжениям на поверхности раздела фаз, которые могут приводить к агрегации и нестабильности. Для того, чтобы белок сохранил биологическую активность, композиция должна сохранять неизменной конформационную целостность по меньшей мере коровой последовательности аминокислот белка, в то же время защищая множественные функциональные группы от разрушения.

Важная проблема, вызванная образованием агрегатов, которая заключается в том, что такая композиция при ее введении может закупорить шприц или насосное устройство, что небезопасно для пациента. Такого рода модификации белков могут также придавать им иммуногенные свойства, что может привести к образованию антител против лекарственного препарата у пациента и в итоге снизить доступность такого лекарственного препарата при его последующих инъекциях или ухудшить ситуацию за счет индукции аутоиммунной реакции. Важной целью разработки композиций антител является сохранение растворимости, стабильности и биологической активности белков.

Предварительные подходы к решению проблем нестабильности белковых терапевтических композиций включали лиофилизацию лекарственного препарата с последующим разведением непосредственно или за короткое время перед введением. Тем не менее, лиофилизированные композиции антител связаны с рядом ограничений, включающих длительный процесс лиофилизации и, как следствие, высокую стоимость производства. Кроме того, перед введением пациентам требуется точное асептическое разведение лиофилизированной композиции медицинскими работниками. Для этапа разведения требуются определенные специальные процедуры, а именно: (1) медленное добавление стерильного растворителя (т.е. воды для внутривенного введения и 5% водного раствора декстрозы для внутримышечного введения) во флакон, содержащий лиофилизированные антитела, в асептических условиях и очень осторожное перемешивание флакона путем вращения в течение 30 секунд во избежание ценообразования; (2) разведенным антителам можно дать отстояться при комнатной температуре в течение как минимум 20 минут до просветления раствора; (3) разведенный препарат необходимо ввести в течение шести (6) часов после разведения. Такая процедура разведения является трудоемкой, а ограничение по времени после разведения может быть сопряжено с большими неудобствами при введении композиции пациентам, приводя к значительному объему отходов в случае неправильного разведения или если разведенная доза не была использована в течение шести (6) часов и подлежит утилизации. Таким образом, из соображений удобства для клинических специалистов и пациентов, а также технологичности желательно использовать жидкую композицию. Тем не менее, жидкие фармацевтические композиции белковых терапевтических средств, т.е. антитела, должны сохранять стабильность в течение длительного времени, содержать безопасное и эффективное количество фармацевтического состава.

Удаление агрегатов намного сложнее удаления технологических примесей в связи со сходными биофизическими характеристиками агрегатов и мономеров, различными источниками и типами агрегатов, а также недостаточной изученностью механизма агрегации.

Одной из последних проблем, выявленных в ходе разработки композиций лекарственных форм моноклональных антител с высокой концентрацией, является образование белковоподобных невидимых и видимых частиц в процессе производства и длительного хранения. Уровень белковоподобных и иных частиц в композициях IgG становится все более важной частью очистки и получения композиций (см. Klaus Wuchner et al *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 99, no. 8, август 2010 г.). Кроме того, жидкая композиция должна сохранять стабильность при различных температурах, а именно 2-8°C, 25°C, 40°C и 55°C.

Для многих препаратов антител, предназначенных для медицинского применения, требуется применение стабилизаторов для предотвращения денатурации, агрегации и других изменений белков перед применением препарата. По опубликованным данным в жидких композициях антител (люцентис, авастин) в качестве стабилизаторов используются маннитол и трегалоза (см. Susumu Uchiyama et al *Biochimica Biophysica Acta* 1844 (2014) 2041-2052; US20160137727; WO2009120684; US8568720). Тем не

менее, трегалоза является дорогостоящей и экономически нецелесообразной для крупномасштабных процессов.

Кроме того, внутривенное введение антител, как правило, осуществляется в виде инфузии, а не болюса, в связи с чем требуется разведение композиции mAb, включая введение вспомогательных веществ, с получением жидкостей, подходящих для внутривенного введения. Полученное разведение вспомогательных веществ, в частности, поверхностно-активных веществ, до концентрации ниже требуемой для предотвращения агрегации в процессе перемешивания, приводит к образованию агрегатов и невидимых частиц при осторожном перемешивании после разведения в ПВХ и полиолефиновых мешках для внутривенных вливаний, содержащих 0,9% физиологический раствор.

Для удаления агрегатов используется хроматография гидрофобного взаимодействия, керамический гидроксипатит и катионообменные смолы, но ничто не идеально. Большинство ранее опубликованных технологий очистки антител в значительной степени основано на использовании хроматографии гидрофобного взаимодействия в сочетании с хроматографией на основе связывания с белком А, анионообменной хроматографией, катионообменной хроматографией в составе трех- или четырехступенчатого процесса (см. WO2010141039, WO 2014/207763, WO2013066707, WO2015099165, WO2014102814, WO2015038888, WO2004087761). Тем не менее, смолы для хроматографии гидрофобного взаимодействия требуют больших количеств солей, которые являются дорогостоящими, демонстрируют низкую связывающую способность, могут быть сложными в утилизации и несовместимыми с конструкционными материалами буферных резервуаров и резервуаров для хранения продукции. Кроме того, разность в плотности между буферами, используемыми для этапа хроматографии гидрофобного взаимодействия, может вызывать проблемы стабильности слоя. Для отделения агрегатов от мономера также можно использовать керамический гидроксипатит, но смолу, смешанную с керамикой, бывает очень трудно снять без повреждения смолы. В связи с этим хранение смолы за пределами колонки для повторного применения в последующем производственном цикле может быть невозможно (см. Suzanne Aldington Journal of Chromatography B, 848 (2007) 64-78).

Установлено, что трехступенчатые комбинации катионообменной, анионообменной проточной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия и катионообменной хроматографии с комбинированным режимом обеспечивают достаточную очистку моноклональных антител, полученных из яичников китайского хомячка, от примесных белков клеток-хозяев. Тем не менее, такие схемы очистки в общем не используются в промышленных процессах выделения и очистки в связи с необходимостью в разработке последовательности очистки отдельно для каждого mAb.

#### **Сущность изобретения**

Таким образом, существует насущная неудовлетворенная потребность в эффективной платформе для производства и получения композиций антител, которая соответствует ряду критериев, включая устойчивость, надежность и масштабируемость, в частности, платформе, которая обеспечивает: i) титр антител по меньшей мере от 2 г/л до 5 г/л; ii) минимальную агрегацию/образование частиц в процессах культивирования клеток, очистки и получения композиций; iii) усовершенствованную очистку, обеспечивающую оптимальную степень извлечения антител в процентах, высокое содержание мономеров и минимальные уровни примесей; iv) высококонцентрированную композицию антител с низкой вязкостью, не подверженную агрегации и образованию невидимых частиц и таким образом демонстрирующую долгосрочную стабильность.

Заявитель неожиданно обнаружил:

а) Состав и стратегию подпитки, в которых учитывается состав питательных веществ, накопление побочных продуктов и баланс между стимуляцией роста и объемной продуктивностью, в которых, в частности, параметры процесса культивирования клеток млекопитающих, такие как конкретная основная питательная среда, использование концентрированной основной среды в качестве питательного раствора, использование различных питательных растворов в сочетании с определенной стратегией подпитки, поддержание концентраций лактатов и аммиака на низком уровне, обеспечивают повышение роста клеток, долговечность клеток и экспрессию белков, таким образом обуславливая повышенный титр антител.

б) Определенную концентрацию солей в составе буфера на этапах аффинной хроматографии на основе связывания с белком А и катионообменной хроматографии, которая сводит к минимуму агрегацию, таким образом обеспечивая достижение содержания мономеров выше 99% со степенью извлечения выше 80%.

в) Не содержащие примесных частиц жидкие композиции антител, содержащие сахарозу в сочетании с гистидином, аргинином, полисорбатом 80, хлоридом натрия, которые обеспечивают повышенную активность и стабильность, снижают вязкость высококонцентрированных растворов антител при температуре 2-8°C на протяжении по меньшей мере 9 месяцев, при 25°C на протяжении по меньшей мере 1 месяца, при 40°C на протяжении по меньшей мере 42 суток, при 55°C на протяжении по меньшей мере 2 суток по сравнению с композицией, не содержащей сахарозу.

#### **Перечень фигур, чертежей и иных материалов**

Фиг. 1. Блок-схема. Технология выделения и очистки моноклональных антител.

Фиг. 2. Блок-схема. Технология получения композиции моноклональных антител.

### Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Терапевтические белки по настоящему изобретению включают, помимо прочего, антигенсвязывающий белок, гуманизированное антитело, химерное антитело, человеческое антитело, биспецифическое антитело, поливалентное антитело, полиспецифическое антитело, антигенсвязывающие фрагменты белка, поликлональные, моноклональные, диатела, нанотела, одновалентные, гетероконъюгаты, полиспецифические, аутоиммунные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, P(ab)<sub>2</sub>-фрагменты, фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab, антиидиотипические (анти-Id) антитела, эпитопсвязывающие фрагменты и CDR-содержащие фрагменты или их комбинации.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтический белок представляет собой антигенсвязывающий белок или иммуноглобулин; более предпочтительно IgG и наиболее предпочтительно молекулу IgG1. В первом аспекте настоящего варианта осуществления иммуноглобулин/антитело представляет собой IgG1 человека (аллотип G1m3) с легкой каппа-цепью человека, специфичной к эпитопу вируса денге в домене III белка E. Во втором аспекте настоящего варианта осуществления антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1, специфичное к поверхностному гликопротеину G вируса бешенства. В третьем аспекте настоящего варианта осуществления терапевтический белок может быть выбран из группы, содержащей CTP19, CR57, CR4098, RVFab8, MabJA, MabJB-1, Mab57, 17C7, 2B10, Ab513/VIS513, N297Q-B3B9, Mab2E8, 2D22, DMScHuMab, 3CH5L1, HMB DV5, HMB DV6, HMB DV8, DB32-6, D88, F38, A48, C88, F108, B48, A68, A100, C58, C78, C68, D98, D188, C128, C98, A11, B11, R17D6, R14B3, R16C9, R14D6, R18G9, R16F7, R17G9, R16E5, антитела, полученные путем модификации 4E11A, адатацепта, абциксимаба, адалимумаба, афлиберцепта, алефацепта, алемтузумаба, трастузумаба, базиликсимаба, бевацизумаба, белатацепта, бектумомаба, цертолизумаба, цетуксимаба, даклизумаба, экулизумаба, эфализумаба, этанерцепта, гемтузумаба, ибритумомаба, инфликсимаба, муромонаба-CD3, омализумаба, паливизумаба; панитумумаба, пертузумаба, ранибизумаба, рилонцепта, ритуксимаба, тозитумомаба, трастузумаба, занолимаба, ниволумаба, пембролизумаба, hA20, AME-I33, IMC-3G3, залутумумаба, ниммотузумаба, ch\*)<sup>^</sup>, KSB-102, MR1-1, SC100, SC101, SC103, муромонаба-CD3, ОКТ4А, ибритумомаба, гемтузумаба, мотавизумаба, инфликсимаба, пегфилграстина, CDP-571, этанерцепта, ABX-CBL, ABX-IL8, ABX-MAI, пемтумомаба, IxBalum-5, ABX-MAI, пемтумомаба, Therex, ASI405, натализумаба, HuBC-I, IDEC-131, VLA-I; CAT-152; J695, CAT-192, CAT-213, BR3-Fc, LymphoStat-B, TRAIL-RImAb, бевацизумаба, омализумаба, эфализумаба, MLN-02, HuMax-IL 15, HuMax-Inflam, HuMax-Cancer, HuMax-Lymphoma, HuMax-TAC, кленоликсимаба, люмиликсимаба, BEC2, IMC-ICI 1, DCIOI, лабетузумаба, арцитумомаба, эпратузумаба, такатузумаба, цетуксимаба, миеломацида, LkoCide, простацида, ипилимумаба, MDX-060, MDX-070, MDX-018, MDX-1106, MDX-1103, MDX-1333, MDX-214, MDX-1100, MDX-CD4, MDX-1388, MDX-066, MDX-1307, HGS-TR2J, FG-3019, BMS-66513, SGN-30, SGN-40, тоцилизумаба, CS-1008, IDM-I, голимумаба, CNTO 1275, CNTO 95, CNTO 328, меполизумаба, MORIOI, MORI 02, MOR201, висилизумаба, HuZAF, волоциксимаба, ING-I, MLN2201, даклизумаба, HCD122, CDP860, PRO542, C14, ореговомаба, эдреколомаба, этарацизумаба, атезолизумаба, иплимумаба, могамулизумаба, линтузумаба, HuIDIO, Lym-1, эфализумаба, ICM3, галиксимаба, экулизумаба, обинутузумаба, пекселизумаба, LDP-OI, huA33, WX-G250, сибротузумаб, офатумумаба, химерного KW-2871, hu3S193, huLK26; биватузумаба, раксибакумаба, chl4.18, 3F8, BC8, huHMFGL, MORAb-003, MORAb-004, MORAb-009, деносумаба, PRO-140, 1D09C3, huMikbeta-1, NI-0401, NI-501, кантузумаба, HuN901, 8H9, chTNT-1/B, бавитуксимаба, huJ591, HeFi-I, Pentacea, абаговомаба, тозитумомаба, устекинумаба, 105AD7, GMAI61, GMA321.

В другом аспекте данного варианта осуществления терапевтический белок представляет собой антитело, обладающее аффинностью связывания с эпитопами, присутствующими в вирусе денге, вирусе бешенства, РСВ, вирусе оспы обезьян, вирусе гриппа, вирусе Зика, вирусе Западного Нила, вирусе желтой лихорадки, вирусе чикунгуньи, ВПГ, ЦМВ, MERS, вирусе Эбола, вирусе Эпштейна-Барр, вирусе ветряной оспы, вирусе паротита, вирусе кори, вирусе полиомиелита, риновирусе, аденовирусе, вирусе гепатита А, вирусе гепатита В, вирусе гепатита С, норовирусе, тогавирусе, альфа-вирусе, вирусе краснухи, вирусе ВИЧ, вирусе Марбург, вирусе Эбола, вирусе папилломы человека, вирусе полиомы, метапневмовирусе, коронавирусе, вирусе везикулярного стоматита и ВЭЛ.

В еще одном аспекте данного варианта осуществления изоэлектрическая точка (pI) упомянутого антигенсвязывающего белка составляет 7,0-8,5, более предпочтительно от около 7,4 до около 8,2.

В частности, антигенсвязывающий белок представляет собой терапевтическое, профилактическое или диагностическое антитело, как описано в WO2014025546, WO2015122995, WO2015123362, WO2006084006, WO2017027805 и WO2017165736, содержание которых включено в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки. Более предпочтительно, терапевтический белок представляет собой антитело, обладающее 80% сходством с VIS513 (Seq ID 1 или Seq ID 2). В другом предпочтительном аспекте настоящего варианта осуществления терапевтический белок представляет собой антитело, обладающее более чем 80% сходством с моноклональным антителом к вирусу бешенства (Seq ID 3 и Seq ID 4).

Очень хорошо понятно, что для экспрессии терапевтического белка в описанных здесь способах можно использовать любую клетку-хозяина. Клетки могут быть дикими или созданными методами генной инженерии для включения рекомбинантной последовательности нуклеиновых кислот, напр., гена,

который кодирует требуемый полипептид (напр., антитело).

Во втором варианте осуществления настоящего изобретения клеточная линия, используемая для экспрессии терапевтических белков, выбрана из группы, включающей, помимо прочего, CHO, CHOK1SV GS-KO, GS-CHO, CHO DUX-B11, CHO-K1, BSC-1, клетки миеломы NS0, клетки CV-1, содержащие точку начала репликации SV40 (COS), COS-1, COS-7, P3X3Ag8.653, C127, 293 EBNA, MSR 293, Colo25, U937, клетки SP2, L-клетки, клетки мезонефроса человека (HEK293), клетки почек новорожденного хомяка (ВНК 21), клетки почек африканской зеленой мартовшки VERO-76, клетки HELA, VERO, ВНК, MDCK, клетки W138, NIH-3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NS0 (клеточная линия миеломы мыши, которая эндогенно не продуцирует никаких цепей иммуноглобулинов), CRL7030, клетки HsS78Bst, PER.C6, SP2/0-Ag14, клеточную линию миеломы, клеточную линию гибридомы, клетки легких человека (W138), клетки сетчатки, линию гепатомы человека (Hep G2) и клетки гибридомы.

В другом аспекте второго варианта осуществления клетки-хозяева животных или млекопитающих включают, помимо прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), такие как CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12: 555-556; and Kolkekar et al., 1997, *Biochem.*, 36:10901-10909), SH87 cellCHO-DXB11 (G. Urlaub and L. A. Chasin, 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 4216-4220. L. H. Graf, and L. A. Chasin 1982, *Molec. Cell. Biol.*, 2: 93-96), клеточную линию CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO, обозначенные ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO клон 13 (GEIMG, Генуя, Италия), CHO клон В (GEIMG, Генуя, Италия), CHO-K1/SF, обозначенные ECACC 93061607 (CAMR, Солсбери, Уилтшир, Великобритания), RR-CHOK1, обозначенные ECACC 92052129 (CAMR, Солсбери, Уилтшир, Великобритания), CHOK1sv (Edmonds et al., *Mol. Biotech.* 34:179-190 (2006)), CHO-S (Pichler et al., *Biotechnol. Bioeng.* 108:386-94 (2011)), дигидрофолатредуктаза-отрицательные клетки CHO (CHO/-DHFR, Urlaub and Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216), и клетки dp12.CHO (пат. США № 5,721,121); клетки почек обезьян CV1, трансформированные SV40 (клетки COS, COS-7, ATCC CRL-1651); эмбриональные клетки почек человека (например, клетки 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59); клетки почек новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL-10); клетки CAP, клетки AGE1.HN, клетки почек обезьян (CV 1, ATCC CCL-70); клетки почек зеленой африканской обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); мышинные клетки Sertoli (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL-2); собачьи клетки почек (MDCK, ATCC CCL-34); клетки легких человека (W138, ATCC CCL-75); клетки гепатомы человека (HEP-G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL-51); клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL-1442); клетки TR1 (Mather, 1982, *Ann. NY Acad. Sci.*, 383:44-68); клетки MCR 5 и клетки FS4.

В первом аспекте второго варианта осуществления клеточная линия, используемая для экспрессии терапевтических белков, представляет собой клетки яичника китайского хомячка; более конкретно, линия представляет собой CHOK1SV GS-KO или GS-CHO.

В третьем варианте осуществления настоящего изобретения клетки культивируют в периодическом, периодическом с подпиткой или непрерывном режиме; более конкретно, в периодическом режиме с подпиткой. Очень хорошо понятно, что специалист в данной области техники может вносить изменения в технологию, описанную в настоящем изобретении, в соответствии с доступными средствами и индивидуальными потребностями. Более конкретно, процесс культивирования клеток осуществляется в периодическом режиме с подпиткой, обеспечивающем повышенный рост клеток, долговечность клеток и повышенную экспрессию белков, т.е. обеспечивающем выход по меньшей мере 2 г/л, предпочтительно в диапазон от 3 г/л до около 6 г/л.

В первом аспекте третьего варианта осуществления культивирование проводится в колбе, биореакторе, биореакторе бакового типа, биореакторе мешочного типа или одноразовом биореакторе. Предпочтительно упомянутый биореактор выбран из группы биореактора с механическим перемешиванием, пузырькового колонного биореактора, эрлифтного биореактора, биореактора с псевдооживленным слоем или биореактора с наполнителем; и упомянутый биореактор имеет объем, выбранный из 1 л, 2 л, 3 л, 5 л, 10 л, 20 л, 100 л, 200 л, 250 л, 350 л, 500 л, 1000 л, 1500 л, 3000 л, 5000 л, 10000 л, 20000 л и 30000 л.

Во втором аспекте третьего варианта осуществления настоящие среды и способы культивирования клеток можно использовать для повышения выхода антител на около 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 180% или 200%, более предпочтительно от около 40% до 60% по результатам измерений в течение двух недель. Период времени периодического способа с подпиткой может составлять от около 12 до 20 суток; от около 15 до 20 суток или от около 15 до 18 суток.

В четвертом варианте осуществления настоящего изобретения среда для культивирования клеток выбрана из группы, содержащей одну или более из CD CHO, CD OptiCHO™, CD FortiCHO™ (Life Technologies); Ex-Cell™ CD CHO (Sigma Aldrich); ProCHO™5 (Lonza); BalanCD™ CHO Growth A (Irvine Scientific); CDM4Mab (Hyclone); Cellvento™ CHO-100 (EMD Millipore); Cell vento 200 (Merck Millipore); Cell

vento 220 (Merck Millipore); Actipro (Hyclone) и их комбинации. Предпочтительно среда для культивирования клеток выбрана из Cell Vento 220 (Merck), ACTIPRO (HyClone/GE) или Gibco™ Dynamis™ Medium (Thermo Fisher).

В среду для культивирования клеток далее добавляется глюкоза и другие питательные растворы в целях увеличения роста клеток, долговечности клеток, экспрессии белков и выхода. Специалистам в данной области техники должно быть очень хорошо понятно, что питательные растворы могут быть введены в виде быстрого боллуса или постепенного капельного вливания.

Добавление питательного раствора в среду для культивирования клеток со стратегией подпитки, содержащей:

Первоначальную подпитку питательным раствором А в объеме 0,05-0,5% объема реактора, предпочтительно 0,1-0,2% объема реактора начиная с 4 суток;

подпитку питательным раствором А в объеме 0,1-0,5% объема реактора в 6, 8, 10, 11 и 13 сутки;

питательный раствор В в объеме меньше 8% объема реактора со 2 суток по 14 сутки через день или непрерывно;

подпитку питательным раствором С в объеме по меньшей мере 8% объема реактора на протяжении по меньшей мере 2 последовательных суток начиная со 2 суток или 3 суток с промежутком, составляющим 2 последовательных суток, до 12 суток, 14 суток, 15 суток, 16 суток или 18 суток.

Подпитка питательным раствором D в объеме по меньшей мере 0,5% объема реактора на протяжении по меньшей мере 2 последовательных суток начиная с 4 суток или 5 суток через день или непрерывно либо с промежутком, составляющим 2 последовательных суток, до 12 суток, 14 суток, 15 суток, 16 суток или 18 суток. Дополнительно подпитка по меньшей мере одним питательным раствором, выбранным из EfficientFeed™ А, EfficientFeed™ В, EfficientFeed™ С, и пеногасителя С Dow Corning.

В предпочтительном аспекте четвертого варианта осуществления упомянутый питательный раствор А, питательный раствор В, питательный раствор С, питательный раствор D выбраны из группы, содержащей один или более из глюкозы, добавки Cell Boost™ 5 (Hyclone), EX-CELL 293 (Sigma Aldrich), добавок Cell Boost 7a и 7b (Hyclone), 3X Actipro (Hyclone/GE), Cell Vento 220 (1X medium), EX-CELL® Advanced™ CHO Feed 1, EfficientFeed™ А, EfficientFeed™ В и EfficientFeed™ С и их комбинации.

В наиболее предпочтительном аспекте четвертого варианта осуществления упомянутый питательный раствор А представляет собой добавку Cell Boost™ 5 (Hyclone); питательный раствор В представляет собой EX-CELL 293 (Sigma Aldrich), питательный раствор С представляет собой добавки Cell Boost 7a (Hyclone), питательный раствор D представляет собой добавки Cell Boost 7b (Hyclone). Дополнительно в среду для культивирования клеток добавляют 10% 3X Actipro (Hyclone) на 3 сутки и 8% Cell Vento 220 (1X medium) на 7 сутки культивирования клеток. Специалисту в данной области техники должно быть очень хорошо понятно, что для добавляемой подпитки возможны изменения  $\pm 1\%$  объема и  $\pm 1$  сутки.

Еще один аспект четвертого варианта осуществления включает условия культивирования клеток, используемые для увеличения роста и долговечности клеток и экспрессии белков. Следующие условия культивирования клеток, используемые в процессе, включают, помимо прочего:

рН среды для культивирования клеток в диапазоне от 6,5 до 7,5;

осмоляльность среды для культивирования в диапазоне 250-500 мОсм/кг; более предпочтительно 400-500 мОсм/кг.

Содержание растворенного кислорода в диапазоне 10-60%; предпочтительно 20-40%; более предпочтительно 30%.

Температура культивирования клеток в диапазоне от 30°C до 38°C; первая температура предпочтительно 36-37°C и дополнительно вторая температура предпочтительно 30-35°C.

Концентрация глюкозы поддерживается на уровне ниже 7%; предпочтительно от 4% до 5%.

Сбор клеток при снижении жизнеспособности до 80%;

при этом условия культивирования клеток поддерживаются таким образом, что концентрация вторичных метаболитов, таких как лактат, не превышает 5 г/л, а концентрация аммиака не превышает 5 ммоль/л.

В пятом варианте осуществления настоящего изобретения упомянутый терапевтический белок, полученный из собранных клеток, подвергают процессу очистки, содержащему следующие этапы: i) аффинная хроматография, ii) вирусная инактивация, iii) ионообменная хроматография, iv) фильтрация; при этом общая степень извлечения процесса составляет больше 70%, а конечный очищенный терапевтический белок имеет степень чистоты/содержание мономера по меньшей мере 90%, предпочтительно больше 98%. Прочие примеси, включая остаточную клеточную ДНК, остаточный клеточный белок и остаточный белок А, в конечном очищенном терапевтическом белке составляют меньше 1%.

В общем аспекте пятого варианта осуществления авторы настоящего изобретения достигли успеха в преодолении проблемы агрегации терапевтического белка в процессе выделения и очистки упомянутого белка путем использования: i) соли на этапе промывки аффинной хроматографии, ii) линейного градиента солевого раствора для элюирования на этапе ионообменной хроматографии. В предпочтительном аспекте упомянутого варианта осуществления концентрация соли буферов, используемых при очистке,



находится в диапазоне 30-500 мМ, более предпочтительно концентрация соли буферов, используемых при очистке, находится в диапазоне 50-300 мМ.

В первом аспекте пятого варианта осуществления аффинная хроматография выбрана из группы, содержащей одну или более из хроматографии с белком А, хроматографии с белком G, хроматографии с белком L и их комбинации; предпочтительно используемая аффинная хроматография представляет собой хроматографию с белком А.

Во втором аспекте пятого варианта осуществления смолы, используемая для хроматографии с белком А, выбрана из группы, содержащей одну или более из Eshmuno А, KanCapАТМ, MabSelect SuRe™, MabSelect SuRe LX, MabSelect Xtra, rProtein А Sepharose Fast Flow, Poros® MabCapture А, Amsphere™ Protein А JWT203, ProSep HC, ProSep Ultra и ProSep Ultra Plus; предпочтительно смола для аффинной хроматографии с белком А представляет собой MabSelect SuRe™, Eshmuno А, KanCap А или Poros Mab-Capture; более предпочтительно смола для аффинной хроматографии с белком А представляет собой MabSelect SuRe™.

В третьем аспекте пятого варианта осуществления промывочный буфер, используемый для хроматографии с белком А, выбран из группы, содержащей один или более из

10-30 мМ фосфатного буфера, предпочтительно 20 мМ фосфатного буфера; 100-150 мМ NaCl, предпочтительно 150 мМ NaCl; 0,05% полисорбата 80; pH 7,0±0,2.

10-30 мМ фосфатного буфера, предпочтительно 20 мМ фосфатного буфера; 250 мМ - 1 М NaCl, предпочтительно 1 М NaCl; 0,05% полисорбата 80; pH 7,0±0,2.

1-30 мМ фосфатного буфера, предпочтительно 10 мМ фосфатного буфера; 100-150 мМ NaCl, предпочтительно 125 мМ NaCl; 0,05% полисорбата 80; pH 7,0±0,2.

В четвертом аспекте пятого варианта осуществления элюирующий буфер, используемый для хроматографии с белком А, содержит 10-30 мМ цитратного буфера; pH 3,0±0,5 и дополнительно 0,01-0,05% (в/о) полисорбата 80; предпочтительно элюирующий буфер содержит 20 мМ цитратного буфера; pH 3,0±0,2 и дополнительно 0,025% (в/о) полисорбата 80.

В пятом аспекте пятого варианта осуществления элюат, полученный на этапе аффинной хроматографии, подвергают вирусной инактивации и снижению вирусной нагрузки. Специалисту в данной области техники должно быть очень хорошо понятно, что вирусная инактивация и снижение вирусной нагрузки в элюате могут быть осуществлены способом, выбранным отдельно или в сочетании из группы, содержащей обработку средой с определенным уровнем pH, обработку поверхностно-активным веществом, термообработку и фильтрацию для снижения вирусной нагрузки. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления вирусная инактивация осуществляется путем воздействия на элюат среды с низким уровнем pH, т.е. 3,3-3,5, в течение 50-100 минут. Далее pH элюата нейтрализуют, подвергая его воздействию нейтрализующего буфера, т.е. 1 М трис-цитратного буфера с pH 7,0±0,2. Специалистам в данной области техники должно быть очень хорошо понятно, что в качестве альтернативы для эффективной нейтрализации pH элюата можно использовать любой другой совместимый буфер.

В шестом аспекте пятого варианта осуществления элюат вирусной инактивации подвергают ионообменной хроматографии. По одному из аспектов данного варианта осуществления ионообменная хроматография представляет собой катионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию или их комбинацию; хроматография может осуществляться в режиме "связывания и элюирования" или в "проточном режиме". В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления катионообменная и анионообменная хроматография осуществляются последовательно в любом порядке. В другом аспекте пятого варианта осуществления упомянутая смола для хроматографии в некоторых случаях представляет собой мультимодальную смолу, такую как смола Capto MMC (GE Healthcare).

В седьмом аспекте пятого варианта осуществления элюат после вирусной инактивации подвергают катионообменной хроматографии. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления параметры хроматографии, включая смолу для хроматографии и буферные условия, выбраны таким образом, что положительно заряженный терапевтический белок связывается со смолой для хроматографии, тогда как отрицательно заряженные молекулы поступают в элюат, дополнительно терапевтические белки подвергают элюированию с использованием солевого градиента. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления смола для катионообменной хроматографии выбрана из группы, содержащей одну или более из групп на основе сульфоната (напр., MonoS, MiniS, Source 15S и 30S, SP SEPHAROSE® Fast Flow, SP SEPHAROSE® High Performance производства компании GE Healthcare, TOYOPEARL® SP-650S и SP-650M производства компании Tosoh, MACRO-PREP® High S производства компании BioRad, Ceramic HyperD S, TRISACRYL® M и LS SP и Spherodex LS SP производства компании Pall Technologies); группы на основе сульфэтила (напр., FRACTOGEL® SE производства компании EMD, POROS® S-10 и S-20 производства компании Applied Biosystems); группы на основе сульфопропила (напр., TSK Gel SP 5PW и SP-5PW-HR производства компании Tosoh, POROS® HS-20, HS 50 и POROS® XS производства компании Life Technologies); группы на основе сульфоизобутила (напр., FRACTOGEL® EMD S03" производства компании EMD); группы на основе сульфоксиэтила (напр., SE52, SE53 и Ex-

press-Ion S производства компании Whatman); группы на основе карбоксиметила (напр., CM SEPHAROSE® Fast Flow производства компании GE Healthcare, Hydrocell CM производства компании Biochrom Labs Inc., MACRO-PREP® CM производства компании BioRad, Ceramic HyperD CM, TRISACRYL® M CM, TRISACRYL® LS CM производства компании Pall Technologies, Matrex CELLUFINE® C500 и C200 производства компании Millipore, CM52, CM32, CM23 и Express-Ion C производства компании Whatman, TOYOPEARL® CM-650S, CM-650M и CM-650C производства компании Tosoh); групп на основе сульфоновой и карбоновой кислот (напр., BAKERBOND® Carboxy-Sulfon производства компании J.T. Baker); группы на основе карбоновой кислоты (напр., WP CBX производства компании J.T. Baker, DOWEX® MAC-3 производства компании Dow Liquid Separations, AMBERLITE® Weak Cation Exchangers, DOWEX® Weak Cation Exchanger и DIAION® Weak Cation Exchangers производства компании Sigma - Aldrich и FRACTOGEL® EMD COO - производства компании EMD); группы на основе сульфоновой кислоты (напр., Hydrocell SP производства компании Biochrom Labs Inc., DOWEX® Fine Mesh Strong Acid Cation Resin производства компании Dow Liquid Separations, UNOsphere S, WP Sulfonic производства компании J.T. Baker, мембрана SARTOBIND® S производства компании Sartorius, AMBERLITE® Strong Cation Exchangers, DOWEX® Strong Cation и DIAION® Strong Cation Exchanger производства компании Sigma-Aldrich) и группы на основе ортофосфата (напр., PI 1 производства компании Whatman). В наиболее предпочтительном аспекте данного варианта осуществления смолы, используемая для катионообменной хроматографии, представляет собой Fractogel® EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Fractogel® EMD SE Hicap (Merck), CMM HyperCel™ (Pall Corporation), Capto S ImpAct. В еще одном аспекте пятого варианта осуществления параметры процесса катионообменной хроматографии включают, помимо прочего, буфер для предварительного уравнивания [200 мМ нитратного буфера; pH 6,0±0,2]; уравнивающий буфер [10 мМ нитратного буфера; полисорбат 80 (0,025% (в/о)); pH 6,0±0,2]; выдержку в среде с низким pH для нейтрализации; промывочный буфер А [10 мМ цитратного буфера; pH 6,0±0,2]; промывочный буфер В [20 мМ цитратного буфера; 300-500 мМ NaCl; pH 6,0±0,2]; буфер CIP [0,5M NaOH]; время удерживания [4,00-7,00 минут]; используемая колонка [XK26].

В восьмом аспекте пятого варианта осуществления элюат после вирусной инактивации подвергают анионообменной хроматографии. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления параметры хроматографии, включая смолу для хроматографии и буферные условия, выбраны таким образом, что отрицательно заряженные примеси связываются с мембраной, тогда как терапевтический белок элюируется, поступая в элюат. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления смолы для анионообменной хроматографии выбрана из группы, содержащей одну или более из ДЭАЭ-целлюлозы, POROS® PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50 производства компании Applied Biosystems, SARTOBIND® Q производства компании Sartorius, MonoQ, MiniQ, Source 15Q и 30Q, Q, DEAE и ANX SEPHAROSE® Fast Flow, Q SEPHAROSE, Q SEPHAROSE® High Performance, QAE SEPHADDEX® и FAST Q SEPHAROSE® (GE Healthcare), WP PEI, WP DEAM, WP QUAT производства компании J.T. Baker, Hydrocell DEAE и Hydrocell QA производства компании Biochrom Labs Inc., U Osphere Q, MACRO-PREP® DEAE и MACRO-PREP® High Q производства компании Biorad, Ceramic HyperD Q, ceramic HyperD DEAE, TRISACRYL® M и LS DEAE, Spheredex LS DEAE, QMA SPHEROSIL® LS, QMA SPHEROSIL® M и MUSTANG® Q производства компании Pall Technologies, DOWEX® Fine Mesh Strong Base Type I и Type II Anion Resins и DOWEX® MONOSPHER E 77, анион слабого основания производства компании Dow Liquid Separations, мембраны INTERCEPT® Q, Matrex CELLUFINE® A200, A500, Q500 и Q800 производства компании Millipore, FRACTOGEL® EMD TMAE, FRACTOGEL® EMD DEAE и FRACTOGEL® EMD DMAE производства компании EMD, слабые и сильные анионообменные материалы типов I и II AMBERLITE®, слабые и сильные анионообменные материалы типов I и II DOWEX®, слабые и сильные анионообменные материалы типов I и II DIAION®, DUOLITE® производства компании Sigma-Aldrich, гель TSK Q и DEAE 5PW и 5PW-HR, TOYOPEARL® SuperQ-650S, 650M и 650C, QAE-550C и 650S, DEAE-650M и 650C производства компании Tosoh, QA52, DE23, DE32, DE51, DE52, DE53, Express-Ion D и Express-Ion Q производства компании Whatman; более предпочтительно смолы для анионообменной хроматографии выбрана из Sartobind Q (Sartorius), Eshmuno Q (Merck), MUSTANG® Q (Pall Corporation) и Poros X (Thermo). В еще одном аспекте пятого варианта осуществления параметры процесса анионообменной хроматографии включают, помимо прочего, очистной буфер [0,5M NaOH]; буфер для предварительного уравнивания [200 мМ цитратного буфера; pH 6,0±0,2]; уравнивающий буфер [20 мМ цитратного буфера; pH 6,0±0,2; и дополнительно 0,025% полисорбата 80]; буфер для хранения [0,1M NaOH]; линейный расход [10-500 м<sup>3</sup>/ч, более конкретно 100-150 м<sup>3</sup>/ч]; используемая колонка [XK26].

Процесс очистки в вышеуказанных вариантах осуществления может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный этап хроматографии, выбранный из группы, содержащей одну или более из хроматографии гидрофобного взаимодействия, гидрофобной хроматографии с индуцированием заряда, хроматографии с керамическим гидроксипатитом, мультимодальной хроматографии (Capto MMC и Capto Adhere), мембранной хроматографии (мембраны Q, включая Intercept™ (Millipore), Mus-

tang® (Pall Corporation) и Sartobind™ (Sartorius)).

В девятом аспекте пятого варианта осуществления вирусные частицы удаляют с использованием фильтра с размером ячейки 20 нм. Фильтр, используемый для удаления вирусных частиц, включает, помимо прочего, задерживающий вирусы фильтр, выбранный из группы Viresolve PRO (Merck), Planova 20N (Asahi Kasei), Bio EXL PALL PEGASUS PRIME, PEGASUS SV4 (Pall Life Sciences) и Virosart (Sartorius), Virosart CPV производства компании Sartorius, Viresolve производства компании Millipore, Ultipor DV20 или DV50 производства компании Pall, Planova 20N и 50N или BioEx производства компании Asahi. Специалисту в данной области техники должно быть очень хорошо понятно, что на этом этапе можно использовать любой другой фильтр, способный задерживать вирусы; предпочтительно фильтр, используемый для удаления вирусных частиц, выбран из Viresolve PRO (Merck), Bio EXL PALL PEGASUS PRIME, PEGASUS SV4 (Pall Life Sciences) и Virosart (Sartorius).

В десятом аспекте пятого варианта осуществления терапевтический белок концентрируют до необходимой концентрации и производят замену буфера в буферной смеси. Замену буфера осуществляют в системе тангенциальной поточной фильтрации или системе ультрафильтрации. Другие параметры тангенциальной поточной фильтрации содержат один или более выбранных из диафильтрации с использованием буфера для диафильтрации [25 мМ гистидинового буфера; 75 мМ аргининового буфера; 50-150 мМ NaCl; pH 6,50±0,5]; очистного буфера [0,5М NaOH]; буфера для хранения [0,1М NaOH]; уравнивания с использованием 5-10 объемов мембраны; концентрации и диафильтрации с использованием 10-20 объемов диафильтрации; промывки водой для инъекций с использованием 3-5 объемов мембраны; очистки с использованием 0,5-1,0 М NaOH; хранения [0,1М NaOH]. В одном предпочтительном аспекте данного варианта осуществления тангенциальная поточная фильтрация осуществляется с использованием мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 кДа, выбранной из группы, содержащей одну или более из полиэфирсульфоновой мембраны Centramate серии T (Pall Corporation), Hydrosart (Sartorius) и Pelicon 3 (Merck).

В шестом варианте осуществления настоящего изобретения упомянутый терапевтический белок используют для получения композиции с фармацевтическими вспомогательными веществами, причем осмоляльность композиции находится в диапазоне от 300 мОсм/кг до 500 мОсм/кг, а вязкость композиции составляет меньше 2,5 мПа·с.

В первом аспекте шестого варианта осуществления композиция терапевтического белка содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий белок, по меньшей мере один стабилизатор, по меньшей мере одно буферное вещество, по меньшей мере одно вещество, регулирующее тоничность, и по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество. В некоторых случаях композиция содержит консервант.

Во втором аспекте шестого варианта осуществления стабилизатор представляет собой углевод. Стабилизатор выбран из группы, содержащей одну или более из сахарозы, сорбита, трегалозы, маннита, декстрана, инозита, глюкозы, фруктозы, лактозы, ксилозы, маннозы, мальтозы, рафинозы и их комбинации; более предпочтительно стабилизатор представляет собой сахарозу. В еще одном аспекте данного варианта осуществления стабилизатор содержит сахарозу в концентрации от около 0,1% до около 2,5% в/о, предпочтительно <1% в/о сахарозы.

В третьем аспекте шестого варианта осуществления буферное вещество выбрано из группы, содержащей один или более из гистидина, аргинина, глицина, цитрата натрия, фосфата натрия, лимонной кислоты, ГЭПЭС, ацетата калия, цитрата калия, фосфата калия, ацетата натрия, бикарбоната натрия, трисоснования или трис-НС1 и их комбинации. Предпочтительно буферное вещество обеспечивает pH от около 5,5 до 7,5, от около 6,0 до 7,0, от около 6,3 до около 6,8 или около 6,5.

В четвертом аспекте шестого варианта осуществления буферное вещество представляет собой гистидин. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления буферное вещество содержит гистидин в концентрации от около 5 мМ до около 150 мМ, от около 10 мМ до около 50 мМ, от около 20 мМ до около 40 мМ. В наиболее предпочтительном аспекте данного варианта осуществления буферное вещество содержит гистидин в концентрации около 25 мМ.

В пятом аспекте шестого варианта осуществления буферное вещество представляет собой аргинин. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления буферное вещество содержит аргинин в концентрации от около 5 мМ до около 200 мМ, от около 50 мМ до около 150 мМ, от около 50 мМ до около 100 мМ. В наиболее предпочтительном аспекте данного варианта осуществления буферное вещество содержит аргинин в концентрации от около 70 до 80 мМ.

В шестом аспекте шестого варианта осуществления вещество, регулирующее тоничность, выбрано из группы, содержащей один или более из хлорида натрия, декстрозы, глицерина, маннита и хлорида калия. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления вещество, регулирующее тоничность, содержит хлорид натрия и присутствует в концентрации от около 10 мМ до около 500 мМ4 предпочтительно в концентрации от около 50 мМ до около 250 мМ; наиболее предпочтительно в концентрации около 100-145 мМ.

В седьмом аспекте шестого варианта осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,001 до около 0,2% (в/о) и выбрано из группы, содержащей один или более из

полисорбатов (напр., полисорбат 20 или полисорбат 80); полоксамеров (напр., полоксамер 188); Triton; додецилсульфат натрия (ДСН); лаурилсульфата натрия; октилгликозида натрия; лаурил-, миристил-, линолеил-или стеарилсульфобетаина; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсаркозина; линолеил-, миристил- или цетилбетаина; лауроамидопропил-, кокамидопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилбетаин (напр., лауроамидопропил); миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламина; метилкокоил- или динатрийметиллолеилтаурата натрия; и серии MONAQUAT® (Mona Industries, Inc., Патерсон, Нью-Джерси), полиэтилгликоля, полипропилгликоля и сополимеров этилена и пропиленгликоля (напр., Pluronic, PF68 и т.д.). В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления поверхностно-активное вещество содержит полисорбат 80 и присутствует в концентрации от около 0,001% до около 0,2% в/о; предпочтительно в концентрации от около 0,002% до около 0,2%; от около 0,005% до около 0,02%; наиболее предпочтительно в концентрации около 0,02%.

В восьмом аспекте шестого варианта осуществления композиция содержит терапевтический белок в концентрации от около 1 мг/л до около 150 мг/л, от около 1 мг/л до около 50 мг/л, от около 20 мг/л до около 40 мг/л. Предпочтительно композиция содержит терапевтический белок в концентрации от около 1 мг/л до около 50 мг/л.

В девятом аспекте шестого варианта осуществления композиция дополнительно содержит консервант, консервант может быть выбран из группы, содержащей бензиловый спирт, м-крезол и фенол.

В седьмом варианте осуществления настоящего изобретения композиция терапевтического белка содержит по меньшей мере один терапевтический белок, сахарозу, аргинин, гистидин, хлорид натрия, полисорбат 80. Предпочтительно композиция терапевтического белка содержит от около 1 мг/мл до около 50 мг/мл терапевтического белка; от около 20 мМ до около 40 мМ гистидина; от около 50 мМ до около 100 мМ аргинина; от около 0,002% до около 0,02% полисорбата 80 (в/о); от около 50 мМ до около 150 мМ NaCl и <2,5% сахарозы в/о. pH композиции находится в диапазоне от 6,0 до около 7,0, а осмоляльность композиции находится в диапазоне от 300 мОсм/кг до около 450 мОсм/кг.

В одном предпочтительном аспекте седьмого варианта осуществления фармацевтическая композиция содержит 2-80 мг/мл моноклональных антител к вирусу денге; 25 мМ гистидина; 75 мМ аргинина; 101 мМ NaCl; 0,02% полисорбата 80 (в/о) и 0,5% сахарозы в/о; причем pH композиции составляет  $6,5 \pm 0,5$ , осмоляльность 380 мОсм/кг, вязкость меньше 2,5 мПа·с.

В одном предпочтительном аспекте седьмого варианта осуществления фармацевтическая композиция содержит 25 мг/мл моноклональных антител к вирусу денге; 25 мМ гистидина; 75 мМ аргинина; 101 мМ NaCl; 0,02% полисорбата 80 (в/о) и 0,5% сахарозы в/о; причем pH композиции составляет  $6,5 \pm 0,5$ , осмоляльность 380 мОсм/кг, вязкость меньше 2,5 мПа·с.

В одном предпочтительном аспекте седьмого варианта осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл моноклональных антител к вирусу денге; 25 мМ гистидина; 75 мМ аргинина; 101 мМ NaCl; 0,02% полисорбата 80 (в/о) и 0,5% сахарозы; причем pH композиции составляет  $6,5 \pm 0,5$ , осмоляльность 380 мОсм/кг, вязкость меньше 2,5 мПа·с.

В одном предпочтительном аспекте седьмого варианта осуществления фармацевтическая композиция содержит 2-80 мг/мл моноклональных антител к вирусу бешенства; 25 мМ гистидина; 75 мМ аргинина; 101 мМ NaCl; 0,02% полисорбата 80 (в/о) и 0,5% сахарозы в/о; причем pH композиции составляет  $6,5 \pm 0,5$ , осмоляльность 380 мОсм/кг, вязкость меньше 2,5 мПа·с.

В одном предпочтительном аспекте седьмого варианта осуществления фармацевтическая композиция содержит 25 мг/мл моноклональных антител к вирусу бешенства; 25 мМ гистидина; 75 мМ аргинина; 101 мМ NaCl; 0,02% полисорбата 80 (в/о) и 0,5% сахарозы в/о; причем pH композиции составляет  $6,5 \pm 0,5$ , осмоляльность 380 мОсм/кг, вязкость меньше 2,5 мПа·с.

Фармацевтическая композиция, содержащая 50 мг/мл моноклональных антител к вирусу бешенства; 25 мМ гистидина; 75 мМ аргинина; 101 мМ NaCl; 0,02% полисорбата 80 (в/о) и 0,5% сахарозы в/о; причем pH композиции составляет  $6,5 \pm 0,5$ , осмоляльность 380 мОсм/кг, вязкость меньше 2,5 мПа·с.

Согласно еще одному аспекту седьмого варианта осуществления упомянутая фармацевтическая композиция антител может представлять собой лиофилизированную композицию.

В восьмом варианте осуществления настоящего изобретения для измерения аффинности и активности терапевтического белка измеряют с использованием одного или более из иммуноферментного анализа (ИФА) или проточной цитометрии. В предпочтительном аспекте восьмого варианта осуществления для количественного определения связывания терапевтического белка со специфическим антигеном используется способ на основе непрямого ИФА. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления композиция моноклональных антител к вирусу денге испытывается по отношению ко всем серотипам вирусов денге и определяется количество mAb к вирусу денге. Активность терапевтического белка регистрируется в % по отношению к активности стандартного образца. Очень хорошо понятно, что для демонстрации активности и аффинности терапевтического белка можно использовать любые другие аналогичные способы.

В девятом варианте осуществления настоящего изобретения для оценки нейтрализации вирусной

активности терапевтическим белком используется реакция нейтрализации посредством подавления фокусобразования (PRNT / FRNT) или аналогичное испытание. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления композиция моноклональных антител к вирусу денге испытывается по отношению ко всем серотипам вирусов денге и рассчитываются значения EC50 для нейтрализации вирусов денге. Очень хорошо понятно, что для демонстрации нейтрализующей активности терапевтического белка можно использовать любые другие аналогичные способы.

В десятом варианте осуществления настоящего изобретения для оценки присутствия агрегатов в композиции терапевтического белка используется высокоэффективная эксклюзионная хроматография. В предпочтительном аспекте данного варианта осуществления для демонстрации процентного содержания агрегатов и мономера в композиции моноклональных антител к вирусу денге используется колонка Phenomenex Bio-Sec-S 3000. Очень хорошо понятно, что для оценки процентного содержания агрегатов и мономера в композиции терапевтического белка можно использовать любые другие аналогичные способы.

В одиннадцатом варианте осуществления настоящего изобретения композиция может храниться в подходящей упаковке. Упаковка может быть выбрана из флакона, пробирки, стеклянной ампулы, мешка для внутривенного вливания, контейнера, изготовленного по технологии формования/выдувания-наполнения-запаивания, нательного инъектора, болюсного инъектора, шприца, шприца-ручки, насоса, многодозового шприца с иглой, многодозового шприца-ручки, инъектора, шприца-тюбика, автоинжектора, предварительно заполненного шприца или их комбинации.

По меньшей мере один компонент первичной упаковки содержит средство укупорки, выбранное из полипропилена (ПП), полиэтилентерефталата сополимера (ПЭТС), полиэтилена низкого давления (ПЭНД), полиэтилентерефталата (ПЭТ), полипентафторстирола (ПФС), поликарбоната, поливинилхлорида (ПВХ), полиолефина, полициклопентана (CZ.RTM.), циклоолефинового сополимера (ЦОС) и их комбинаций или сополимеров.

Композиции антител к вирусу денге или антител к вирусу бешенства, описанные в настоящей заявке, можно применять (по отдельности или в сочетании с другими средствами или терапевтическими воздействиями) для лечения, профилактики или диагностики заболеваний, вызванных вирусом денге или вирусом бешенства. Например, комбинированная терапия может включать молекулу антител к вирусу денге, комбинированную и/или совместно вводимую с одним или более из дополнительных лекарственных средств, напр., противовирусных средств (включая другие антитела к вирусу денге), вакцин (включая вакцины от вируса денге) или средств, повышающих иммунный ответ. В других вариантах осуществления молекулы антител вводят в сочетании с другими терапевтическими воздействиями, такими как внутривенное восполнение потери жидкости, жаропонижающие средства (такие как ацетаминофен) или переливание крови. В таких вариантах комбинированной терапии могут предпочтительно использоваться пониженные дозировки вводимых лекарственных средств во избежание возможной токсичности или осложнений, связанных с различными вариантами монотерапии.

### Примеры

Пример 1. Процесс наращивания биомассы для культивирования клеток и экспрессии терапевтического белка, т.е. моноклональных антител к вирусу денге (VIS513).

Протокол:

Культивирование клеток в масштабе 10 л осуществляли в периодическом режиме с подпиткой с использованием указанных ниже параметров процесса ферментации/наращивания биомассы.

Моноклональные антитела к вирусу денге экспрессировали в клеточной линии CHO - K1 SV GS-KO, полученной от компании Visterra Inc. USA.

В качестве среды для культивирования клеток, используемой для выращивания клеток и экспрессии терапевтического белка, т.е. моноклональных антител к вирусу денге, использовали жидкую среду 1X Cellvento™ CHO-220.

Для дополнительной подпитки использовали питательный раствор А, питательный раствор В, питательный раствор С, питательный раствор D выбраны из группы, содержащей один или более из глюкозы, добавки Cell Boost™ 5 (Hyclone), EX-CELL 293 (Sigma Aldrich), добавок Cell Boost 7a и 7b (Hyclone), 3X Actipro (Hyclone), Cell Vento 220 (3X medium), EX-CELL® Advanced™ CHO Feed 1.

рН культуральной среды поддерживали на уровне от 6,7 до 7,5.

Осмоляльность культуральной среды поддерживали на уровне <490 мОсм/кг.

Содержание растворенного кислорода в культуральной среде поддерживали на уровне от около 20% до около 40%.

Температуру культуральной среды поддерживали на уровне от 36,5±0,5.

Сбор клеток проводили при снижении количества клеток до 60%.

Подпитку вводили в виде постепенного капельного вливания в соответствии с приведенной ниже табл. 1.

Таблица 1

Протокол стратегии подпитки Сутки	Питательный раствор А	Питательный раствор В	Питательный раствор С	Питательный раствор D	Основная среда 1 (3X Actipro™ (Nyclone)	Основная среда 2 (Cellvento™ CHO-220 (3X))
0						
1						
2		4%				
3					10%	
4	0,2%		4%	0,4%		
5		6%	4%	0,4%		
6	0,2%	4%	4%	0,4%		
7		6%				8%
8	0,2%		4%	0,4%		
9		4%	4%	4,0%		
10	0,1%	2%	4%	0,4%		
11	0,2%	2%	2%	0,2%		
12		4%				
13	0,1%	2%	2%	0,2%		
14		3%				
15		3%				
16						

Результаты и заключение:

количество жизнеспособных колоний и выход процесса ферментации были следующими:

Таблица 2

Количество жизнеспособных колоний и выход процесса ферментации

Сутки	Серия 1		Серия 2	
	Количество жизнеспособных колоний	Титр, г/л	Количество жизнеспособных колоний	Титр, г/л
0	0,8		0,81	
1	1,5		1,7	
2	2,8		3,45	
3	4,3		5,9	
4	6,5		7,4	
5	8,4		11,8	
6	10,1	0,54	15,5	0,63
7	12,7	0,77	18,5	0,91
8	14,5	1,18	19	1,29
9	17	1,62	18,5	1,76
10	17,25	2,15	18,8	2,42
11	17,25	2,64	18	2,85
12	16,8	3,05	18	3,39
13	15,3	3,6	17,2	4,0
14	15	3,99	17	4,32
15	14,7	4,43	14,9	4,68
16	14,5	4,56	13,5	4,86

Заявитель обнаружил, что при использовании процесса культивирования клеток, содержащего ос-

новную питательную среду, концентрированную основную среду в качестве питательного раствора, использование питательных растворов в сочетании с определенной стратегией подпитки, можно добиться повышенного роста клеток, пониженной концентрации лактата и аммиака, тем самым эффективно подерживая количество клеток, повышая долговечность клеток и обеспечивая высокий выход. В процессе ферментации был достигнут выход выше 4 г/л. Собранные клетки были далее подвергнуты процессу выделения и очистки.

Пример 2.

Клетки из культуры, полученной в примере 1, собирали и далее подвергали протоколу очистки моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) согласно фиг. 1.

Подробное описание использованного процесса:

Аффинная хроматография на основе связывания с белком А:

На данном этапе целевые моноклональные антитела отделяли от компонентов среды в собранной надосадочной жидкости. Осветленную надосадочную жидкость пропускали через хроматографическую колонку, а затем элюировали с использованием совместимых элюирующих буферов.

Использованные материалы:

Смола (матрица): Mab Select Sure/Eshmuno A (аффинность связывания с белком А).

Время удерживания: 4,0-8,0 минут.

Использованная колонка: ХК 26.

Уравновешивающий буфер: 20 мМ фосфатного буфера + 150 мМ NaCl + 0,05% (в/о) полисорбата 80, рН 7,0±0,2.

Промывочный буфер I: 20 мМ фосфатного буфера + 150 мМ NaCl + 0,05% (в/о) полисорбата 80, рН 7,0±0,2.

Промывочный буфер II: 20 мМ фосфатного буфера + 1 М NaCl + 0,05% (в/о) полисорбата 80, рН 7,0±0,2.

Промывочный буфер III: 10 мМ фосфатного буфера + 125 мМ NaCl + 0,025% (в/о) полисорбата 80, рН 6,0±0,2.

Элюирующий буфер: 20 мМ цитратного буфера + 0,025% (в/о) полисорбата 80, рН 3,0±0,2.

Буфер СР: 0,1 М NaOH.

Использованные параметры процесса:

Таблица 3

№ п/п	Этап процесса	Объем колонки	Линейный расход (м <sup>3</sup> /ч)
1	Уравновешивание	5	<300
2	Загрузка (мл)	Фактическое значение	<300
3	Промывка I	2	<300
4	Промывка II	4	<300
5	Промывка III	4	<300
6	Элюирование	5	<300
7	Очистка	3	<300
8	Хранение	2	<300

1. Вирусная инактивация при низком рН.

i. Элюат после аффинной хроматографии на основе связывания с белком А подвергали воздействию среды с низким рН, т.е. 3,5±0,1, в течение 60±10 минут для инактивации вирусных частиц.

ii. После выдержки при низком рН элюат нейтрализовывали с использованием нейтрализующего буфера, т.е. 1 М трис-цитратного буфера с рН 7,0±0,2.

iii. Электропроводность нейтрализованного элюата регулировали с использованием воды для инъекций с 0,025% (в/о) полисорбата 80.

2. Катионообменная хроматография.

Положительно заряженные молекулы антител связываются с колонкой, тогда как отрицательно заряженные молекулы поступают в элюат. Связанные с колонкой молекулы антител элюируют с использованием солевого градиента.

Использованные материалы:

Использованная смола: Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Fractogel SE Hicap (Merck).

Время удерживания: 4,00-7,00 минут.

Использованная колонка: ХК 26.

Предварительное уравновешивание: 200 мМ цитратного буфера с рН 6,0±0,2.

Уравновешивание: 10 мМ цитратного буфера + 0,025% (в/о) полисорбата 80, рН 6,0±0,2.

Загрузка: Нейтрализация после выдержки при низком рН.

Промывочный буфер А: 10 мМ цитратного буфера с pH 6,0±0,2.

Промывочный буфер В: 20 мМ цитратного буфера + 300 мМ NaCl, pH 6,0±0,2.

Буфер СIP: 0,5 М NaOH.

Буфер для хранения: 0,1 М NaOH.

Параметры процесса:

Таблица 4

№ п/п	Этап процесса	ОК	Линейный расход (м3/ч)
1	Предварительное уравнивание	2	<300
2	Уравнивание	5	<300
3	Загрузка	Фактическое значение	<300
4	Промывка	5	<300
5	Элюирование 0-60% В (градиент)	15	<300
6	100% В	2	<300
7	СIP	3	<300

Сбор фракций при градиенте.

Таблица 5

№ п/п	Наименование фракции	Критерии сбора (UV <sub>280</sub> ), МЕОП
1	Фракция 01	До 300
2	Фракция 02	300 - 700
3	Фракция 03	От 700 до базовой линии
4	Фракция 04 (100% В)	От базовой линии до базовой линии

Анионообменная хроматография:

Все отрицательно заряженные примесные частицы связываются с мембраной, тогда как антитела поступают в элюат.

Использованные материалы:

Использованная мембрана/смола: Sartobind Q single Sep mini (Sartorius)/Eshmuno Q.

Объем загрузки: 150-1000 мг/мл.

Использованная колонка: ХК 26.

Очистной буфер: 0,5 М NaOH.

Буфер для предварительного уравнивания: 200 мМ цитратного буфера с pH 6,0±0,2.

Уравнивающий буфер: 20 мМ цитратного буфера с pH 6,0±0,2 и дополнительно 0,025% полисорбата 80.

pH 6,0±0,2.

Буфер для хранения: 0,1 М NaOH.

Параметры процесса:

Таблица 6

№ п/п	Этап процесса	Объем колонки (ОК)	Линейный расход (м3/ч)
1	Очистка	10	<300
2	Предварительное уравнивание	10	<300
3	Уравнивание	20	<300
4	Объем	Фактическое значение	<300
5	Промывка после загрузки	20	<300
6	Очистка	10	<300

3. Нанофильтрация:

Для удаления любых вирусных частиц, которые могли присутствовать в терапевтическом белке,



использовали нанофильтр с размером ячейки 20 нм, а именно Viresolve PRO (Merck).

#### 4. Тангенциальная поточная фильтрация/ультрафильтрация:

Антитела концентрировали до необходимой концентрации и заменяли буфер на одну из трех буферных смесей.

Использованный материал:

Буферная смесь:

Буфер 1: 25 мМ гистидинового буфера + 75 мМ аргининового буфера + 75 мМ NaCl, pH 6,50±0,25;

Буфер 2: 25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 101 мМ NaCl;

Буфер 3: 25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 75-101 мМ NaCl, 0,002% в/о полисорбата 80.

Очистной буфер: 0,5 М NaOH.

Буфер для хранения: 0,1 М NaOH.

Использованная мембрана: PALL Centramate серии T, полиэфирсульфоновая мембрана с номинальным отсечением по молекулярной массе: 30 кДа.

Параметры процесса:

Таблица 7

№ п/п	Этап процесса	Описание	Примечание
1	Очистка	0,5 М NaOH	30 минут циркуляции
2	Очистка ВДИ	ВДИ до электропроводности ниже 1,3 мкСм/см	-
3	Уравновешивание	400 мл	-
4	Концентрация и диафильтрация	~ 10-12 объемов диафильтрации	-
5	ВДИ	Промывка ВДИ, 1000 мл	-
6	Очистка	0,5 М NaOH	30 минут циркуляции

Стерилизующая фильтрация.

В раствор антител добавляли стабилизатор и выполняли стерилизующую фильтрацию через фильтр с размером ячейки 0,2 мкм.

Результаты:

Поэтапная степень извлечения различных этапов процесса очистки.

Таблица 8

№ п/п	Этап	Степень извлечения (%)	Чистота (%)
1	Аффинная хроматография на основе связывания с белком А	98	99,3
2	Вирусная инаktivация при низком pH	98	-
3	Катионообменная хроматография	90	99,52
4	Анионообменная хроматография	95	99,46
5	Нанофильтрация	100	-
6	ТПФ/ультрафильтрация	98	-
7	Получение композиции и стерилизующая фильтрация	100	-

Установлено, что общая степень извлечения процесса составляет ~80%, а общая чистота - >99%.

Таблица 9

## Данные примесей

Количественное определение	Критерий приемлемости	Серия 1	Серия 2
Чистота по ВЭЭХ (содержание мономера, %)	Содержание мономера должно составлять >90,00%.  Время удерживания мономера должно быть сопоставимым с временем удерживания стандартного образца	99,74	99,11
Остаточная ДНК СНО (пг/мг mAb)	<2 пг/мг IgG	0,005	0,004
Остаточный белок А (нг/мг mAb)	≤ 10,00 нг/мг IgG	1,05	0,82
Остаточный белок СНО (нг/мг mAb)	≤ 100,00 нг/мг IgG	1,74	3,80
Эндотоксин (ЕЭ/мг белка)	≤ 0,1 ЕЭ/мг белка	<0,05	<0,05

Таблица 10

## Поэтапный выход и чистота

№ п/п	№ серии	Степень извлечения (%)	Чистота (%)
1	Серия 1	85	99,21
2	Серия 2	87	99,26

Пример 3.

Очищенные моноклональные антитела к вирусу денге (VIS513) использовали для получения композиции следующим образом:

Вспомогательные вещества, т.е. аргинин, гистидин, NaCl, сахарозу и полисорбат 80, добавляли и тщательно перемешивали с использованием магнитной мешалки при 50-60 об/мин с получением смеси вспомогательных веществ. Затем эту смесь постепенно добавляли в собранные mAb к вирусу денге после ТПФ, продолжая перемешивать при 50-60 об/мин. Проверяли pH (6,5) и при необходимости регулировали гистидин-аргининовым буфером. Конечную композицию фильтровали через фильтр с размером ячейки 0,2 мкм и расфасовывали в конечную упаковку.

Концентрация каждого компонента в конечной композиции:

Таблица 11

Ингредиент	Композиция 1	Композиция 2	Композиция 3
Маб к вирусу денге (VIS513)	10 мг/мл	25 мг/мл	50 мг/мл
Гистидин	25 мМ	25 мМ	25 мМ
Аргинин	75 мМ	75 мМ	75 мМ
Хлорид натрия	101 мМ	101 мМ	101 мМ
Сахароза	0,5% в/о	0,5% в/о	0,5% в/о
Полисорбат 80	0,02% в/о	0,02% в/о	0,02% в/о
pH	6,5±0,5	6,5±0,5	6,5±0,5
Осмоляльность	380 мОсм/кг	380 мОсм/кг	380 мОсм/кг

Эти композиции далее испытывали на чистоту, стабильность, эффективность и активность на протяжении 9 месяцев.

Пример 4.

Влияние присутствия сахарозы в композиции антител к вирусу денге VIS513 исследовали для испытаний на активность с применением ИФА к белку EDIII DV1. Исследования композиции проводили при температурах 2-8°C, 25°C и 40°C.

Результаты:

1. Композиция антител к вирусу денге VIS513 без сахарозы.

Таблица 12

Ингредиент (кол.)	Активность (%) по сравнению со стандартным образцом, хранившимся при 2-8°C			
	2-8°C		КТ (25°C)	40°C
	15 суток	30 суток	15 суток	30 суток
L-гистидин, 25 мМ	78,8	73,2	79,8	53,8
L-аргинин, 75 мМ				
Хлорид натрия, 75 мМ				
Полисорбат 80, 0,02% в/о				

2. Композиция антител к вирусу денге VIS513 с сахарозой.

Таблица 13

Ингредиент (кол.)	Активность (%) по сравнению со стандартным образцом, хранившимся при 2-8°C			
	2-8°C		КТ (25°C)	40°C
	15 суток	30 суток	15 суток	30 суток
L-гистидин, 25 мМ	90,5	86,3	94,6	81,6
L-аргинин, 75 мМ				
Хлорид натрия, 101 мМ				
Полисорбат 80, 0,02% в/о				
Сахароза, 0,5% в/о				

Состав композиции стандартного образца:

Ингредиент	(кол.)
L-гистидин,	25 мМ
L-аргинин,	75 мМ
Хлорид натрия,	101 мМ
Полисорбат 80%,	0,02% в/о
Сахароза	0,5% в/о

Заключение: добавление 0,5% в/о повышает стабильность по сравнению с соответствующей точкой отбора образцов без сахарозы.

Пример 5.

Композицию антител VIS513 хранили при 40°C на протяжении 20 суток, после чего оценивали активность VIS513 с использованием ИФА. Для композиции антител VIS513 исследовали влияние повышения концентрации сахарозы при 40°C, причем оценивали концентрацию сахарозы 0,1%, 0,2% и 0,5%.

Результаты:

Таблица 14

Ингредиент (кол.)	Активность (%) по сравнению со стандартным образцом, хранившимся при 2-8°C
L-гистидин, 25 мМ	53,8
L-аргинин, 75 мМ	
Хлорид натрия, 101 мМ	
Полисорбат 80, 0,02% в/о	

Таблица 15

Ингредиент (кол.)	Активность (%) по сравнению со стандартным образцом, хранившимся при 2-8°C
L-гистидин, 25 мМ	70,8
L-аргинин, 75 мМ	
Хлорид натрия, 101 мМ	
Полисорбат 80, 0,02% в/о	
Сахароза, 0,1% в/о	

Таблица 16

Ингредиент (кол.)	Активность (%) по сравнению со стандартным образцом, хранившимся при 2-8°C
L-гистидин, 25 мМ	65,7
L-аргинин, 75 мМ	
Хлорид натрия, 101 мМ	
Полисорбат 80, 0,02% в/о	
Сахароза, 0,2% в/о	

Таблица 17

Ингредиент (кол.)	Активность (%) по сравнению со стандартным образцом, хранившимся при 2-8°C
L-гистидин, 25 мМ	81,6
L-аргинин, 75 мМ	
Хлорид натрия, 101 мМ	
Полисорбат 80, 0,02% в/о	
Сахароза, 0,5% в/о	

Состав композиции стандартного образца:

Ингредиент	(кол.)
L-гистидин,	25 мМ
L-аргинин,	75 мМ
Хлорид натрия,	101 мМ
Полисорбат 80%,	0,02% в/о
Сахароза	0,5% в/о

Заключение: максимальная стабильность наблюдалась для композиции, содержащей 0,5% сахарозы.

Пример 6.

Аналитические испытания на чистоту, стабильность, эффективность и активность композиции моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) при условиях хранения при 2-8°C на протяжении 0 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев и 18 месяцев.

25°C на протяжении 0 суток и 30 суток.

40°C на протяжении 0 суток, 7 суток, 14 суток, 28 суток, 35 суток и 42 суток.

6.1: Активность композиции антител VIS513 испытывали с использованием непрямого ИФА.

Для количественного определения связывания моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) с белком EDIII антигена DV1 использовали способ на основе непрямого ИФА. Белок EDIII иммобилизовали на пластине. Несвязанный антиген удаляли путем промывки. На следующем этапе добавляли стандартный и испытуемый образцы и выдерживали для связывания с антигеном. Для определения количества связанного Dv-Mab использовали мышинные античеловеческие антитела IgG Fc-HRP, специфические к Dv-Mab (Fc-фрагмент иммуноглобулина человека). Для количественного определения использовали субстрат для определения пероксидазы TMB Microwell Peroxidase Substrate System, который обеспечивает количественное определение степени связывания по интенсивности окраски при длине волны 450 нм. В программном обеспечении для анализа данных строили кривые связывания для каждого образца с использованием четырехпараметрической модели аппроксимации кривой и сравнивали кривую связывания испытуемого образца со стандартной кривой путем расчета относительной активности. Активность испытуемого образца регистрировали в % относительно активности стандартного образца (относительная активность, умноженная на 100).

Результаты:

Таблица 18

Активность моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) (%) по данным непрямого ИФА композиции, хранившейся при 2-8°C

	0 сутки	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	18 месяцев
<b>Серия 1</b>	74,90	79,30	89,30	84,9	88,50	93,90
<b>Серия 2</b>	74,30	80,05	82,20	86,7	79,00	94,70
<b>Серия 3</b>	91	98,30	12,5	99,70	88,80	118,40
<b>Серия 4</b>	97,5	102,2	92,6	84	83,80	96,70

Таблица 19

Активность моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) (%) по данным непрямого ИФА композиции, хранившейся при 25°C

	0 сутки	30 суток
<b>Серия 1</b>	74,90	79,30
<b>Серия 2</b>	74,30	87,8

Таблица 20

Активность моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) (%) по данным непрямого ИФА композиции, хранившейся при 40°C

	0 сутки	14 суток	21 сутки	28 суток	35 суток	42 суток
<b>Серия 1</b>	70,3	82,80	96,20	71,90	89,70	90,80

Композиция моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) не показала наличия зависимой от времени потери аффинности связывания.

6.2: Анализ PRNT для определения EC50.

Этот анализ включает предварительное смешивание последовательных разведений антител с вирусом для обеспечения связывания с антителами, нейтрализацию и перенос смеси на монослой клеток Веро, покрытие слоем вязкой среды, инкубацию (~3-7 суток в зависимости от серотипа вируса) для обеспечения ограниченной репликации и распространения вируса и последующее обнаружение бляшек. Нейтрализацию определяли по снижению бляшкообразования. Устойчивое обнаружение достигалось при использовании способов иммуноокрашивания с применением антител к вирусу денге 4G2 и HRP-меченых козьих антимышиных антител с субстратом пероксидазы.

Образцы композиции моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) испытывали по отношению ко всем четырем серотипам вирусов денге, т.е. DV1, DV2, DV3 и DV4. Для нейтрализации вирусов денге рассчитывали значение EC50. Значение EC50 представляет собой 50% эффективной концентрации, не-

обходимой для эффективной нейтрализации вирусов денге, и значение EC50 рассчитывали по количеству бляшек в контрольных лунках с вирусом и количеству бляшек в лунках, в которых были добавлены инкубированные образцы таб-вируса.

Результаты:

Таблица 21

Значение EC50 (нг/мл) моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) по результатам анализа PRNT для композиции, хранившейся при 2-8°C

№ серии	Серотипы вирусов денге	0 сутки	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	18 месяцев
Серия 1	DV1	47,15	49,74	23,88	24,12	Не выполнялось	42,58
	DV2	5,9	8,03	3,58	3,31	Не выполнялось	13,03
	DV3	14,38	14,7111	5,58	4,57	Не выполнялось	18,14
	DV4	30,29	50,75	23,96	23,35	Не выполнялось	117597
Серия 2	DV-1	21,03	21,01	16,12	29,41	Не выполнялось	62,94
	DV-2	3,26	5,69	4,15	2,87	Не выполнялось	8,59
	DV-3	13,19	24,14	6,53	7,05	Не выполнялось	27,83
	DV-4	22,46	22,44	16,61	19,56	Не выполнялось	155207
Серия 3	DV-1	32,77	13,74	27,76	34,22	Не выполнялось	60,48
	DV-2	4,34	7,37	2,94	4,26	Не выполнялось	16,8
	DV-3	15,43	4,96	6,76	7,74	Не выполнялось	14,21
	DV-4	30,49	16,36	39,71	31,75	Не выполнялось	141205
Серия 4	DV-1	22,81	24,67	23,34	46,72	Не выполнялось	23,48
	DV-2	3,16	3,25	1,25	6,35	Не выполнялось	23,49
	DV-3	11,42	7,35	4,65	5,34	Не выполнялось	128,6
	DV-4	21,39	24,58	19,56	22,31	Не выполнялось	15814

Таблица 22

Значение EC50 (нг/мл) моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) по результатам анализа PRNT для композиции, хранившейся при 25°C

№ серии	Серотипы вирусов денге	0 сутки	30 суток
Серия 1	DV1	47,15	29,82
	DV2	5,9	5,6
	DV3	14,38	9,63
	DV4	30,29	35,28
Серия 2	DV1	21,03	28,34
	DV2	3,26	5,51
	DV3	13,19	9,25
	DV4	22,46	30,69

Значение EC50 (нг/мл) моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) по результатам анализа PRNT для композиции, хранившейся при 40°C

№ серии	Серотипы вирусов денге DV2	Контроль	Испыгуемый образец
Серия 1	0 суток	6,66	-
	7 суток	6,37	26,89
	14 суток	6,18	36,12

Композиция моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) не показала наличия зависимой от времени потери эффективности нейтрализации вируса при 2-8°C и 25°C. Даже в случае хранения при 40°C композиция VIS513 не теряет способность к нейтрализации вируса денге.

### 6.3: Анализ агрегации и чистоты.

Для оценки агрегатов в нерасфасованной и конечной композиции моноклональных антител к вирусу денге использовали эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (эксклюзионную ВЖЭХ). В данном способе использовали колонку phenomenex Bio-Sec-S 3000 для демонстрации процентного содержания агрегатов и мономера моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) путем введения общего количества антител ~50 мкг и хроматографирования с расходом 1 мл/мин в течение 35 минут. В качестве подвижной фазы использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с pH 6,5.

Результаты: Эксклюзионная ВЖЭХ (диапазон приемлемых значений - не ниже 90%).

Таблица 24

Анализ эксклюзионной ВЖЭХ для композиции, хранившейся при 2-8°C

Серия		0	3	6	9	12	18
		сутки	месяца	месяце	месяце	месяце	месяце
1	Мономеры, %	99,21	98,60	99,14	98,55	98,25	98,14
	Агрегат, %	0,78	1,39	0,85	1,44	1,74	1,85
2	Мономеры, %	99,26	98,81	98,89	98,53	98,36	98,18
	Агрегат, %	0,73	1,18	0,86	1,45	1,63	1,81
3	Мономеры, %	99,25	99,35	98,99	98,81	98,78	98,22
	Агрегат, %	0,74	0,64	1,00	1,18	1,18	1,77
4	Мономеры, %	99,25	99,12	98,69	98,93	98,42	93,48
	Агрегат, %	0,74	0,82	1,30	1,06	1,42	1,95

Анализ концентрации белка.

Таблица 24А

Анализ концентрации белка (мг/мл) путем УФ-измерения композиции, хранившейся при 2-8°C

Серия	0	3	6	9	12	18
	сутки	месяца	месяце	месяце	месяце	месяце
1	25,94	25,24	25,13	24,71	25,37	22,71
2	25,80	25,20	25,75	24,59	26,63	23,72
3	24,72	24,39	24,75	25,67	24,02	24,79
4	26,04	26,23	26,27	26,92	26,63	25,4

Анализ невидимых частиц композиции, хранившейся при 2-8°C.

Механические включения в составе инъекционных растворов состоят из подвижных нерастворенных частиц, не являющихся пузырьками газа, присутствие которых в растворах не предусмотрено. Был проведен анализ на механические включения в нерасфасованной композиции моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) по времени. Для парентеральных препаратов объемом меньше 100 мл испытание считается пройденным, если в емкости наблюдается меньше 6000 частиц размером до 10 мкм включи-

тельно или меньше 600 частиц размером от 25 мкм.

Таблица 24В

Размер частиц	Момент времени (кол. частиц/мл)			
	Исходный момент	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев
>10 мкм	1	3	5	9
>25 мкм	0	0	3	1

Нерасфасованная композиция сохраняет стабильность, поскольку наблюдается лишь незначительное увеличение содержания механических включений.

Таблица 25

Анализ эксклюзионной ВЭЖХ для композиции, хранившейся при 25°C

	0 суток	30 суток
<b>Серия 1</b>	99,21	97,63
<b>Серия 2</b>	99,26	97,58

Таблица 26

Анализ эксклюзионной ВЭЖХ для композиции, хранившейся при 40°C

	0 суток	7 суток	14 суток	21 суток	28 суток	35 суток	42 суток
<b>Серия 1</b>	99,21	99,30	99,50	97,74	97,30	98,70	95,30

Композиция моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) не показала наличия значимой агрегации, зависимой от времени, а чистота/содержание мономера составляли >98%.

Анализ концентрации белка.

Таблица 26А

Анализ концентрации белка (мг/мл) путем УФ-измерения композиции, хранившейся при 40°C

Серия	0 суток	3 суток	7 суток	15 суток
1	27,53	26,09	25,46	26,58

Установлено, что изменение концентрации белка соответствует изменчивости способа анализа путем УФ-измерения.

Исследования рН и определения подлинности (изоэлектрическое фокусирование) моноклональных антител к вирусу денге (VIS513), хранившихся при 40°C.

Таблица 26В

Измерение уровня рН композиции моноклональных антител к вирусу денге (VIS513), хранившейся при 40°C

Серия	0 суток	3 суток	7 суток	15 суток
1	6,4	6,38	6,38	6,33



Определение подлинности путем ДСН-ПААГ (в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях) и изоэлектрического фокусирования композиции моноклональных антител к вирусу денге (VIS513), хранившейся при 40°C

Испытуемый	0 сутки	3 суто	7 суто	15 суток
ДСН-ПААГ (в восстанавливающих условиях)	Одна диффузная полоса, соответствующая стандартному образцу по	Н/П	Н/П	Одна диффузная полоса, соответствующая стандартному образцу по
ДСН-ПААГ (в невосстанавливающих условиях)	Одна диффузная полоса, соответствующая стандартному образцу по положению и	Н/П	Н/П	Одна диффузная полоса, соответствующая стандартному образцу по положению и
Изоэлектрическое фокусирование Станд. рI = 7,8±0,3	Сопоставимо с рI внутреннего стандартного образца	Н/П	Н/П	Сопоставимо с рI внутреннего стандартного образца

Пример 7.

Влияние концентраций поверхностно-активных веществ в составе композиций:

Влияние концентрации поверхностно-активного вещества оценивали путем анализа невидимых частиц. Приготавливали композиции с различными концентрациями полисорбата 80, которые анализировали с использованием анализа невидимых частиц.

Таблица 27

	Композиция с концентрацией полисорбата 80 (% в/о)		
	0,0016%	0,002%	0,005%
<b>Размер частиц</b>			
≥2 мкм	916	211	20
≥ 5 мкм	55	48	5
≥10 мкм	6	16	2
≥25 мкм	1	1	0

Заключение:

В композиции, содержащей 0,005% в/о полисорбата 80, наблюдалось минимальное содержание невидимых частиц. В зависимости от дозировки, если требуется разведение композиции, концентрация полисорбата 80 окончательно принята равной 0,02% в/о с 4-кратным запасом.

Пример 8. Исследование для определения минимальной концентрации используемых стабилизаторов.

Из доступной литературы была определена минимально необходимая буферная сила (10-30 мМ). Для определения минимального количества аргинина (используемого в качестве солибилизирующего и снижающего вязкость вещества) для образца моноклональных антител заменяли буфер на физиологический раствор и постепенно добавляли основной раствор аргинина (300 мМ). Агрегацию в растворе контролировали путем измерения оптической плотности при 350 нм. Раствор с 75 мМ аргинина обеспечивал самую низкую оптическую плотность, в связи с чем окончательно была принята концентрация аргинина 75 мМ.

Пример 8.

Исследования вязкости композиции антител к вирусу денге (VIS513).

Вязкость образцов моноклональных антител к вирусу денге измеряли на микропроцессорном вискозиметре модели microVISCTM (марка RheoSense, Калифорния, США) в соответствии с процедурой, указанной в руководстве по эксплуатации прибора.

Таблица 28

Образец	Температура измерения	Вязкость, мПа·с
0 сутки	5 <sup>0</sup> С	2,04
	25 <sup>0</sup> С	1,164
90 суток хранения при 2-8 <sup>0</sup> С	25 <sup>0</sup> С	1,173
180 суток хранения при 2-8 <sup>0</sup> С	25 <sup>0</sup> С	1,167
180 суток хранения при 2-8 <sup>0</sup> С	25 <sup>0</sup> С	1,166
180 суток хранения при 2-8 <sup>0</sup> С	25 <sup>0</sup> С	1,174
365 суток хранения при 2-8 <sup>0</sup> С	25 <sup>0</sup> С	1,175
30 суток хранения при 25 <sup>0</sup> С	25 <sup>0</sup> С	1,137
60 суток хранения при 25 <sup>0</sup> С	25 <sup>0</sup> С	1,127
90 суток хранения при 25 <sup>0</sup> С	25 <sup>0</sup> С	1,122

Заключение:

Зависимое от времени повышение вязкости не наблюдалось для композиции моноклональных антител, хранившейся при 2-8<sup>0</sup>С на протяжении 90 суток, а также для образца, хранившегося при 25<sup>0</sup>С в течение 1 месяца, это связано прежде всего с наличием вспомогательного вещества - 75 мМ аргинина. Вязкость нашей композиции составляла 1,1-1,2 мПа·с/сПз, что ниже, чем для других доступных в продаже композиций, вязкость которых составляет 11-50 мПа·с/сПз. Вязкость образца нерасфасованной композиции не повышается даже при хранении на протяжении 1 года при 2-8<sup>0</sup>С или на протяжении 3 месяцев при 25<sup>0</sup>С.

Пример 9. Исследования процесса очистки моноклональных антител к вирусу денге (VIS513) с добавлением вируса.

Для фактического производственного процесса выполняли валидационные исследования на вирусы для проверки эффективности удаления вирусов путем фильтрации для снижения вирусной нагрузки в процессе производства моноклональных антител.

В качестве модельных микроорганизмов использовали вирус лейкемии мышей (MuLV) и мелкий вирус мышей (MMV/MVM). Авторы изобретения сравнивали возможности процесса очистки по изобретению с распространенным и общепризнанным способом очистки моноклональных антител.

Распространенный и общепризнанный способ очистки моноклональных антител включал аффинную хроматографию на основе связывания с белком А (смола GE); обработку при низком pH; хроматографию Sartobind Q (одноразовая анионообменная мембрана Sartorius); хроматографию с фениловой фазой Sartobind (одноразовая хроматографическая мембрана Sartorius); фильтрацию через фильтр Viresolve Pro (нанофильтрация, Merck).

Таблица 29

Таблица 29.		Коэффициент снижения вирусной нагрузки (LRV), Log <sub>10</sub>	
		MuLV	MMV
A	Общий / стандартный способ	≥12,64 ± 0,60	7,02 ± 0,69
B	Способ по изобретению (SIPL)	≥18,3 ± 0,60	14,72 ± 0,70

Таблица 29А

Подробные данные способа, использованного в строке А таблицы 29

<b>Общий/стандартный процесс очистки моноклональных антител к вирусу денге</b>		
<b>Этап</b>	<b>Коэффициент снижения вирусной нагрузки, Log<sub>10</sub></b>	
	<b>MuLV</b>	<b>MMV</b>
Аффинная хроматография на основе связывания с белком А (смола GE)	2,75 ± 0,10	1,52 ± 0,46
Обработка при низком pH	2,89 ± 0,28	Не применимо*
Хроматография Sartobind Q (одноразовая анионообменная мембрана Sartorius)	1,15 ± 0,43	2,19 ± 0,44
Хроматография с фениловой фазой Sartobind (одноразовая хроматографическая мембрана Sartorius)	2,09 ± 0,17	Не испытывалось
Фильтрация через фильтр Viresolve Pro (нанофильтрация, Merck)	≥3,76 ± 0,25	3,31 ± 0,26
<b>Суммарный коэффициент снижения, Log<sub>10</sub></b>	<b>≥12,64 ± 0,60</b>	<b>7,02 ± 0,69</b>

Таблица 29В

Подробные данные способа, использованного в строке В таблицы 29

<b>Общий/стандартный процесс очистки моноклональных антител к вирусу денге SHPL (SHPL)</b>		
<b>Этап</b>	<b>Коэффициент снижения вирусной нагрузки, Log<sub>10</sub></b>	
	<b>MuLV</b>	<b>MMV</b>
Аффинная хроматография на основе связывания с белком А (Merck)	2,27 ± 0,17	2,35 ± 0,45
Обработка при низком pH	4,14 ± 0,26#	Не применимо*
Катионообменная хроматография (Merck)	2,31 ± 0,31	2,73 ± 0,44
Анионообменная хроматография (Merck)	4,38 ± 0,36	2,96 ± 0,44
Фильтрация через фильтр Viresolve Pro (нанофильтрация, Merck)	≥5,20 ± 0,28	6,68 ± 0,90
<b>Суммарный коэффициент снижения, Log<sub>10</sub></b>	<b>18,3 ± 0,60</b>	<b>14,72 ± 0,70</b>

Примечание: \*MMV является безоболочечным вирусом с высокой устойчивостью к кислому pH. В связи с этим этап обработки при низком pH не оценивался.

Расчет частиц ретровируса на дозу в соответствии с общим способом и способом SHPL В соответствии с ICH Q5A требуется одна частица на миллион доз.

Сравнение двух способов в соответствии со строкой А и строкой В таблицы 29

Описание	Общий / стандартный способ	Способ по изобретению (SIPL)
Максимальная нагрузка ретровирусоподобных частиц на мл в необработанной нерасфасованной композиции, определенная с использованием электронной микроскопии (данные Visterra)	$8,5 \times 10^6$ (A)	$8,5 \times 10^6$ (A) <sup>s</sup>
Общий объем необработанной нерасфасованной композиции, поступающий в процесс очистки (л)	770,85 (B)	300 (B)
Выход препарата на серию (г)	720,32 (C)	625 (C)
Предлагаемая максимальная однократная доза 75 мг/кг (Visterra), 25 мг/кг (SIPL) из расчета на средний вес пациента 80 кг	6 (D)	2* (D)
Объем необработанной нерасфасованной композиции, требуемый для получения однократной дозы препарата (л)	$6,42089$ (D) ÷ {C/B}	$0,960$ (D) ÷ {C/B}
Объем необработанной нерасфасованной композиции, требуемый для получения однократной дозы препарата (мл)	6420,89 (E)	960,0 (E)
Коэффициент снижения вирусной нагрузки, определенный по данным исследования с добавкой	$>12,64 \log_{10}$	$18,3 \log_{10}$
Антилогарифм коэффициента снижения	$>4,37 \times 10^{12}$ (F)	$1,99 \times 10^{18}$ (F)
Расчетное содержание вирусных частиц на дозу А X E ----- F	$\frac{8,5 \times 10^6 \times 6420,89}{4,37 \times 10^{12}}$  $=1,25 \times 10^{-2}$ (G)	$\frac{8,5 \times 10^6 \times 961,5}{1,99 \times 10^{18}}$  $=4,1 \times 10^{-9}$ (G)
Таким образом, предполагается 1 вирусоподобная частица на (1/G) максимальных доз	$8,0 \times 10^1$ доз	$2,4 \times 10^8$
<b>Заключение</b>	<b>Возможно присутствие 1 вирусной частицы на 80 доз препарата.</b>	<b>Возможно присутствие 1 вирусной частицы на 240 миллионов доз препарата.</b>

Результаты:

Процесс очистки по изобретению SIPL обеспечивает высокую эффективность снижения вирусной нагрузки, достигаемый суммарный LRV (MuLV) составлял 18,3, т.е. достигается коэффициент снижения нагрузки по меньшей мере  $18 \log_{10}$ , тогда как для общего/стандартного способа он составлял 12,64; достигаемый суммарный LRV (MMV) составлял  $14 \log_{10}$ , тогда как для общего/стандартного способа он составлял 7,02.

При использовании процесса очистки по изобретению SIPL предполагается наличие одной вирусной частицы на 240 миллионов доз препарата (доза 2,0 г). При использовании процесса очистки по общему/стандартному способу предполагается наличие одной вирусной частицы на 80 доз.

Моноклональные антитела к вирусу денге, очищенные с использованием процесса очистки по изобретению SIPL, можно использовать в клинических исследованиях на людях без риска вирусного заражения.

Процесс очистки SIPL обеспечивал высокую эффективность удаления вирусов с достижением общего LRV в соответствии с требованиями руководств ICH (LRV стандартного процесса - 12,64, процесса по изобретению SIPL - 18,3). Было установлено, что антитела к вирусу денге, очищенные с использованием процесса по нашему изобретению, пригодны для клинических исследований на людях без риска вирусного заражения.

Пример 10. Процесс наращивания биомассы для культивирования клеток и экспрессии терапевтического белка, т.е. моноклональных антител к вирусу бешенства.

Протокол:

Культивирование клеток в масштабе 2 л осуществляли в периодическом режиме с подпиткой с использованием указанных ниже параметров процесса ферментации/наращивания биомассы.

Моноклональные антитела к вирусу бешенства экспрессировали в клеточной линии GS - CHO.

В качестве среды для культивирования клеток, используемой для выращивания клеток и экспрессии терапевтического белка, т.е. моноклональных антител к вирусу бешенства, использовали жидкую среду 1X Cellvento™ CHO-220 Liquid Medium или Actipro 1x (Hyclone).

Для дополнительной подпитки использовали питательный раствор А, питательный раствор В, питательный раствор С, питательный раствор D выбраны из группы, содержащей один или более из глюкозы, добавки Cell Boost™ 5 (Hyclone), EX-CELL 293 (Sigma Aldrich), добавок Cell Boost 7a и 7b (Hyclone), 3X Actipro (Hyclone), Cell Vento 220 (1X medium), EX-CELL® Advanced™ CHO Feed.

pH культуральной среды поддерживали на уровне от 6,5 до 7,5.

Осмоляльность культуральной среды поддерживали на уровне 270-450 мОсм/кг.

Содержание растворенного кислорода в культуральной среде поддерживали на уровне от около 20% до около 60%.

Температуру культуральной среды поддерживали на уровне от  $36,5 \pm 1$ .

Подпитку вводили в виде постепенного капельного вливания в соответствии с приведенной ниже таблицей.

Таблица 30

Сутки	Питательный раствор А	Питательный раствор В	Питательный раствор С	Питательный раствор D	Основная среда 1 (3X Actipro™ (Hyclone))	Основная среда 2 (Cellvento™ CHO-220 (1X))
0						
1						
2		4%				
3	0,2%					
4			4%	0,4%	10%	8%
5		6%	4%	0,4%		
6	0,2%	4%	4%	0,4%		
7		6%				
8	0,2%		4%	0,4%		
9		4%	4%	4,0%		
10	0,1%	2%	4%	0,4%		
11	0,2%	2%	2%	0,2%		
12		4%				
13	0,1%	2%	2%	0,2%		
14		3%				
15		3%				
16						

Примечание: Для всех питательных растворов возможны изменения  $\pm 1\%$  объема и  $\pm 1$  сутки.

Сбор клеток проводили при снижении оптической плотности до 60%.

Результаты и заключение:

Получен выход процесса ферментации 3-5 г/л. Собранные клетки были далее подвергнуты процессу выделения и очистки.

Пример 11.

Клетки из культуры, полученной в примере 9, собирали и далее подвергали протоколу очистки моноклональных антител к вирусу бешенства согласно фиг. 1.

Подробное описание использованного процесса:

Аффинная хроматография на основе связывания с белком А:

На данном этапе целевые моноклональные антитела отделяли от компонентов среды в собранной надосадочной жидкости. Осветленную надосадочную жидкость пропускали через хроматографическую колонку, а затем элюировали с использованием совместимых элюирующих буферов.

Использованные материалы:

Смола (матрица): Mab Select Sure/Eshmuno A (аффинность связывания с белком А).

Время удерживания: 4,0-8,0 минут.

Использованная колонка: ХК 26.

Уравновешивающий буфер: 20 мМ фосфатного буфера + 150 мМ NaCl + 0,05% (в/о) полисорбата 80, рН 7,0 $\pm$ 0,2.

Промывочный буфер I: 20 мМ фосфатного буфера + 150 мМ NaCl + 0,05% (в/о) полисорбата 80, рН 7,0 $\pm$ 0,2.

Промывочный буфер II: 20 мМ фосфатного буфера + 1 М NaCl + 0,05% (в/о) полисорбата 80, рН 7,0 $\pm$ 0,2.

Промывочный буфер III: 10 мМ фосфатного буфера + 125 мМ NaCl + 0,025% (в/о) полисорбата 80, рН 6,0 $\pm$ 0,2.

Элюирующий буфер: 20 мМ цитратного буфера + 0,025% (в/о) полисорбата 80, рН 3,0 $\pm$ 0,2.

Буфер СІР: 0,1 М NaOH.

Использованные параметры процесса:

Таблица 31

№ п/п	Этап процесса	Объем колонки	Линейный расход (м3/ч)
1	Уравновешивание	5	<300
2	Загрузка (мл)	Фактическое значение	<300
3	Промывка I	2	<300
4	Промывка II	4	<300
5	Промывка III	4	<300
6	Элюирование	5	<300
7	Очистка	3	<300
8	Хранение	2	<300

1. Вирусная инактивация при низком рН.

i. Элюат после аффинной хроматографии на основе связывания с белком А подвергали воздействию среды с низким рН, т.е. 3,5 $\pm$ 0,1, в течение 60 $\pm$ 10 минут для инактивации вирусных частиц.

ii. После выдержки при низком рН элюат нейтрализовывали с использованием нейтрализующего буфера, т.е. 1 М трис-цитратного буфера с рН 7,0 $\pm$ 0,2. Далее нейтрализованный раствор фильтровали с использованием фильтров с размером ячейки 0,8/0,45 мкм или 0,8/0,2 мкм.

iii. Электропроводность нейтрализованного элюата регулировали с использованием воды для инъекций с 0,025% (в/о) полисорбата 80.

2. Катионообменная хроматография.

Положительно заряженные молекулы антител связываются с колонкой, тогда как отрицательно заряженные молекулы поступают в элюат. Связанные с колонкой молекулы антител элюируют с использованием солевого градиента.

Использованные материалы:

Использованная смола: Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Fractogel SE Hicap (Merck).

Время удерживания: 4,00-7,00 минут.

Использованная колонка: ХК 26.

Предварительное уравновешивание: 200 мМ цитратного буфера с рН 6,0 $\pm$ 0,2.

Уравновешивание: 10 мМ цитратного буфера + 0,025% (в/о) полисорбата 80, рН 6,0 $\pm$ 0,2.

Загрузка: Нейтрализация после выдержки при низком pH.

Промывочный буфер А: 10 мМ цитратного буфера с pH 6,0±0,2.

Промывочный буфер В: 20 мМ цитратного буфера + 300 мМ NaCl, pH 6,0±0,2.

Буфер СІР: 0,5 М NaOH.

Буфер для хранения: 20% этанола + 150 мМ NaCl.

Таблица 32

## Параметры процесса

№ п/п	Этап процесса	ОК	Линейный расход (м3/ч)
1	Предварительное уравнивание	2	<300
2	Уравнивание	5	<300
3	Объем	Фактическое значение	<300
4	Промывка	5	<300
5	Элюирование 0-60% В	15	<300
	(градиент)		
6	100% В	2	<300
7	СІР	3	<300

Таблица 33

## Сбор фракций при градиенте

№ п/п	Наименование фракции	Критерии сбора (UV <sub>280</sub> ), мЕОП
1	Фракция 01	До 300
2	Фракция 02	300 - 700
3	Фракция 03	От 700 до базовой линии
4	Фракция 04 (100% В)	От базовой линии до базовой линии

Анионообменная хроматография:

Все отрицательно заряженные примесные частицы связываются с мембраной, тогда как антитела поступают в элюат.

Использованные материалы:

Использованная мембрана/смола: Sartobind Q single Sep mini (Sartorius)/Eshmuno Q.

Объем загрузки: 150-1000 мг/мл.

Использованная колонка: ХК 26.

Очистной буфер: 0,5 М NaOH.

Буфер для предварительного уравнивания: 200 мМ цитратного буфера с pH 6,0±0,2.

Уравнивающий буфер: 20 мМ цитратного буфера с pH 6,0±0,2 и дополнительно 0,025% полисорбата 80.

pH 6,0±0,2.

Буфер для хранения: 20% этанола + 150 мМ NaCl или 0,1 М NaOH.

Таблица 34

Параметры процесса			
№ п/п	Этап процесса	Объем колонки (ОК)	Линейный расход (м <sup>3</sup> /ч)
1	Очистка	10	<300
2	Предварительное уравнивание	10	<300
3	Уравнивание	20	<300
4	Объем	Фактическое значение	<300
5	Промывка после загрузки	20	<300
6	Очистка	10	<300

## 3. Фильтрация:

Для удаления любых вирусных частиц, которые могли присутствовать в терапевтическом белке, использовали нанофильтр с размером ячейки 20 нм, а именно Viresolve PRO (Merck).

## 4. Тангенциальная поточная фильтрация/ультрафильтрация:

Антитела концентрировали до необходимой концентрации и заменяли буфер на одну из трех буферных смесей.

Использованный материал:

Буферная смесь:

Буфер 1: 25 мМ гистидинового буфера + 75 мМ аргининового буфера + 75 мМ NaCl, pH 6,50±0,25;

Буфер 2: 25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 101 мМ NaCl;

Буфер 3: 25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 75-101 мМ NaCl, 0,002% в/о полисорбата 80;

Очистной буфер: 0,5 М NaOH.

Буфер для хранения: 20% этанола + 150 мМ NaCl или 0,1 М NaOH.

Использованная мембрана: PALL Centramate серии T, полиэфирсульфоновая мембрана с номинальным отсечением по молекулярной массе: 30 кДа.

Таблица 35

Параметры процесса			
№ п/п	Этап процесса	Описание	Примечание
1	Очистка	0,5 М NaOH	30 минут циркуляции
2	Очистка ВДИ	ВДИ до электропроводности ниже 1,3 мкСм/см	-
3	Уравнивание	400 мл	-
4	Концентрация и диафильтрация	~ 10-12 объемов диафильтрации	-
5	ВДИ	Промывка ВДИ, 1000 мл	-
6	Очистка	0,5 М NaOH	30 минут циркуляции

Стерилизующая фильтрация.

В раствор антител добавляли стабилизатор и выполняли стерилизующую фильтрацию через фильтр с размером ячейки 0,2 мкм.

Результаты:



Таблица 36

Поэтапная степень извлечения различных этапов процесса очистки

№ п/п	Этап	Степень извлечения (%) *
1	Аффинная хроматография на основе связывания с белком А	94
2	Вирусная инактивация при низком рН	98
3	Катионообменная хроматография	94
4	Анионообменная хроматография	95
5	Нанофильтрация	100
6	ТПФ/ультрафильтрация	98
7	Получение композиции и стерилизующая фильтрация	100

Было установлено, что общая степень извлечения процесса составляет >80%.

Таблица 37

Данные примесей

Количественное определение	Критерий приемлемости	Серия 1	Серия 2
Концентрация по UV280 (мг/мл)	-	26,19	24,39
Чистота по эксклюзионной ВЭЖХ (содержание мономера, %)	Содержание мономера должно составлять >90,00%.  Время удерживания мономера должно быть сопоставимым с временем удерживания стандартного образца	100	100
ДСН-ПААГ в невозстанавливающих условиях (кДа)	-	156,0	156,0
ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях (кДа)	-	50,4/27,7	50,7/27,9
Остаточная ДНК СНО (пг/мг mAb)	<2 пг/мг IgG	0,34	0,17
Остаточный белок А (нг/мг mAb)	≤ 10,00 нг/мг IgG	<10	<10
Остаточный белок СНО (нг/мг mAb)	≤ 100,00 нг/мг IgG	5,50	7,94
Бактериальный эндотоксин (ЕЭ/мг белка)	≤ 0,1 ЕЭ/мг белка	0,35	0,5

Таблица 38

Поэтапный выход и чистота			
№ п/п	№ серии	Степень извлечения (%)	Чистота (%)
1	Серия 1	82	99,4
2	Серия 2	80	99,6

Было установлено, что общая чистота моноклональных антител к вирусу бешенства составляет >99%, а общая степень извлечения - >80%.

Пример 12.

Очищенные моноклональные антитела к вирусу бешенства использовали для получения композиции в соответствии с блок-схемой, приведенной на фиг. 2:

вспомогательные вещества, т.е. аргинин, гистидин, NaCl, сахарозу и полисорбат 80, добавляли и тщательно перемешивали с использованием магнитной мешалки при 50-60 об/мин с получением смеси вспомогательных веществ. Затем эту смесь постепенно добавляли в собранные mAb к вирусу денге после ТПФ, продолжая перемешивать при 50-60 об/мин. Проверяли pH (6,5) и при необходимости регулировали гистидин-аргининовым буфером. Конечную композицию фильтровали через фильтр с размером ячейки 0,2 мкм и расфасовывали в конечную упаковку.

Концентрация каждого компонента в конечной композиции:

Таблица 39

Ингредиент	Композиция 1	Композиция 2	Композиция 3
Маб к вирусу бешенства	10 мг/мл	25 мг/мл	50 мг/мл
Гистидин	25 мМ	25 мМ	25 мМ
Аргинин	75 мМ	75 мМ	75 мМ
Хлорид натрия	101 мМ	101 мМ	101 мМ
Сахароза	0,5% в/о	0,5% в/о	0,5% в/о
Полисорбат 80	0,02% в/о	0,02% в/о	0,02% в/о
pH	6,5+0,5	6,5+0,5	6,5+0,5
Осмоляльность	386 мОсм/кг	386 мОсм/кг	386 мОсм/кг

Эти композиции далее испытывали на чистоту, стабильность, эффективность и активность на протяжении 9 месяцев.

Пример 13. Аналитические испытания на чистоту и стабильность композиции моноклональных антител к вирусу бешенства при условиях хранения при 2-8, 25 и 40°C на протяжении 0 месяцев, 1 месяца, 3 месяцев и 6 месяцев.

13.1 Анализ агрегации и чистоты.

Для оценки агрегатов в нерасфасованной и конечной композиции моноклональных антител к вирусу денге использовали эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (эксклюзионную ВЭЖХ). В данном способе использовали колонку phenomenex Bio-Sec-S 3000 для демонстрации процентного содержания агрегатов и мономера моноклональных антител к вирусу бешенства путем введения общего количества антител ~50 мкг и хроматографирования с расходом 1 мл/мин в течение 35 минут. В качестве подвижной фазы использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с pH 6,5.

Результаты:

Таблица 40

Результаты эксклюзионной ВЭЖХ (%)				
Темп.	0 сутки	1 месяц	3 месяца	6 месяцев
2-8°C	100	99,70	99,40	99,60
25°C	100	99,60	-	-
40°C	100	99,20 (7 суток)	-	-

Композиция моноклональных антител к вирусу бешенства не показала наличия агрегации, зависимость от времени, а чистота/содержание мономера составляли >99%.

13.2 Анализ ДСН-ПААГ, серия 1 - испытуемый образец при 2-8°C.

Таблица 41

			0 сутки	1 месяц	3 месяца	6 месяцев
<b>ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях (кДа)</b> Молекулярная масса тяжелых и легких цепей должна находиться в пределах $\pm 10\%$ молекулярной массы стандартного образца. Общее содержание тяжелых и легких цепей должно составлять $>95\%$ . Общее содержание, %: 100	Испытуемый образец при 2-8°C	Тяжелая цепь	50,8	49,8	49,3	49,2
		Легкая цепь	25,6	25,7	25,6	26,4
	Стандартный образец	Тяжелая цепь	50	50	50	50
		Легкая цепь	25	25	25	25
<b>ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях (кДа)</b> <b>СО – стандартный образец</b> Молекулярная масса основной полосы должна находиться в пределах $\pm 10\%$ молекулярной массы стандартного образца (СО).	Испытуемый образец при 2-8°C		151,0	156,7	157,2	157,6
	Стандартный образец		150	150	150	150

Испытуемый образец при 25°C.

			0 сутки	30 суток
<b>ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях (кДа)</b> Молекулярная масса тяжелых и легких цепей должна находиться в пределах $\pm 10\%$ молекулярной массы стандартного образца. Общее содержание тяжелых и легких цепей должно составлять $>95\%$ .  Общее содержание, %: 100	Испытуемый образец при 25°C	Тяжелая цепь	50,8	47,5
		Легкая цепь	25,6	25,5
	Стандартный образец	Тяжелая цепь	50	50
		Легкая цепь	25	25
<b>ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях (кДа)</b> <b>СО – стандартный образец</b>  Молекулярная масса основной полосы должна находиться в пределах $\pm 10\%$ молекулярной массы стандартного образца (СО).	Испытуемый образец при 25°C		151,0	151,6
	Стандартный образец		150	150

Заключение: Композиция моноклональных антител к вирусу бешенства не показала наличия значимых изменений агрегации и молекулярной массы, зависящих от времени. Таким образом, установлено, что композиция сохраняет стабильность при 2-8°C, 25°C и 40°C.

**Перечень последовательностей**

Seq ID 1: Последовательность аминокислот VH-области VIS513 (моноклонального антитела к вирусу денге)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKAGFNKDVYMSWVRQAPEQGLEWMGRIDPENGDTKYD 60

PKLQGRVTMTADTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGWEGFAYWGQGLVTVSSASTKG 120

PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL 180

SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL 240

FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV 300

VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ 360

VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV 420

FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 445

Seq ID 2: Последовательность аминокислот VL-области VIS513 (моноклонального антитела к вирусу денге)

DIVMTQSPASLAIVSLGERATISCRASENVDKYGNFSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASELQW 60

GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQRSNEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF 120

IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS 180

STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 218

Seq ID 3: Последовательность аминокислот тяжелой цепи SII RmAb (RAB1)(17C7)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSTYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGR  
TKDY 60

ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTEDTAVYFCARERFSGAYFDYWGQGLTVTVS  
SA 120

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
G 180

LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP  
240

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NS 300

TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
M 360

TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQ 420

QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 449

Seq ID 4: Последовательность аминокислот легкой цепи SII RmAb (RAB1)(17C7)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA  
60

RFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYSCQQRNNWPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVSVFIF  
120

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS  
ST 180

LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 219

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения стабильной композиции, включающей фармацевтический антигенсвязывающий белок с высоким выходом и минимальной агрегацией, представляющий собой моноклональное антитело к вирусу денге в соответствии с SEQ ID 1 и SEQ ID 2, содержащий следующие этапы:

а) культивирование в больших масштабах клеток млекопитающих, которые экспрессируют антигенсвязывающий белок, в производственной среде для культивирования клеток, в котором этап культивирования эффективно поддерживает количество клеток в диапазоне от  $10 \times 10^6$  до  $20 \times 10^6$  клеток/мл и обеспечивает выход по меньшей мере 2 г/л, причем клеточная линия млекопитающих представляет собой CHO-K1 SV GS-KO;

б) очистку антигенсвязывающего белка из собранной надосадочной жидкости, полученной на этапе (а), в которой очистка обеспечивает степень извлечения по меньшей мере 80% и чистоту по меньшей мере 99%; при этом этапы очистки содержат аффинную хроматографию, вирусную инактивацию при низком рН, катионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию, нанофильтрацию, тангенциальную поточную фильтрацию/ультрафильтрацию в последовательном порядке; причем матрица для аффинной хроматографии выбрана из белка А и концентрация солей в буферах, используемых для очистки, находится в диапазоне 30-500 мМ; и

с) подготовку стабильной композиции, включающей антигенсвязывающий белок, в которой осмоляльность композиции находится в диапазоне 300-400 мОсм/кг, а вязкость композиции составляет меньше 2,5 мПа·с; причем композиция антигенсвязывающего белка содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий белок, по меньшей мере один стабилизатор, по меньшей мере один буфер, по меньшей мере одно вещество, регулирующее тоничность, и по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество; и при этом композиция содержит:

- i. 1-100 мг/мл антигенсвязывающего белка;
- ii. 20-40 мМ гистидина;
- iii. 50-100 мМ аргинина;
- iv. 0,002-0,02% (в/о) полисорбата 80;
- v. 50-150 мМ NaCl;
- vi. 0,1-2,5% в/о сахарозы;

при этом рН композиции составляет  $6,5 \pm 0,5$ ; и причем композиция сохраняет стабильность при 2-8°C на протяжении по меньшей мере 9 месяцев, при 25°C на протяжении по меньшей мере 1 месяца, при 40°C на протяжении по меньшей мере 40 суток, при 50°C на протяжении по меньшей мере 2 суток.

2. Способ получения стабильной композиции, включающей фармацевтический антигенсвязывающий белок с высоким выходом и минимальной агрегацией, представляющий собой моноклональное антитело против бешенства в соответствии SEQ ID 3 и SEQ ID 4, содержащий следующие этапы:

а) культивирование в больших масштабах клеток млекопитающих, которые экспрессируют антигенсвязывающий белок, в производственной среде для культивирования клеток, в котором этап культивирования эффективно поддерживает количество клеток в диапазоне от  $10 \times 10^6$  до  $20 \times 10^6$  клеток/мл и обеспечивает выход по меньшей мере 2 г/л;

б) очистку антигенсвязывающего белка из собранной надосадочной жидкости, полученной на этапе (а), в которой очистка обеспечивает степень извлечения по меньшей мере 80% и чистоту по меньшей мере 99%; при этом этапы очистки содержат аффинную хроматографию, вирусную инактивацию при низком рН, катионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию, нанофильтрацию, тангенциальную поточную фильтрацию/ультрафильтрацию в последовательном порядке; причем матрица для аффинной хроматографии выбрана из белка А и концентрация солей в буферах, используемых для очистки, находится в диапазоне 30-500 мМ; и

с) подготовку стабильной композиции, включающей антигенсвязывающий белок, в которой осмоляльность композиции находится в диапазоне 300-400 мОсм/кг, а вязкость композиции составляет меньше 2,5 мПа·с; причем композиция антигенсвязывающего белка содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий белок, по меньшей мере один стабилизатор, по меньшей мере один буфер, по меньшей мере одно вещество, регулирующее тоничность, и по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество; и при этом композиция содержит:

vii. 1-100 мг/мл антигенсвязывающего белка;

viii. 20-40 мМ гистидина;

ix. 50-100 мМ аргинина;

x. 0,002-0,02% (в/о) полисорбата 80;

xi. 50-150 мМ NaCl;

xii. 0,1-2,5% в/о сахарозы;

при этом рН композиции составляет  $6,5 \pm 0,5$ ; и причем композиция сохраняет стабильность при 2-8°C на протяжении по меньшей мере 9 месяцев, при 25°C на протяжении по меньшей мере 1 месяца, при 40°C на протяжении по меньшей мере 40 суток, при 50°C на протяжении по меньшей мере 2 суток.

3. Способ по пп.1-2, в котором в среду для культивирования клеток дополнительно добавляется одно или более других питательных веществ по меньшей мере один раз за время этапа культивирования, а именно в среду для культивирования клеток добавляется питательный раствор, содержащий по меньшей мере одну среду, выбранную из группы, содержащей глюкозу, EX-CELL 293 (Sigma Aldrich), среду 3X Actipro, Cell Vento 220 (3X medium), EX-CELL® Advanced™ CHO Feed 1, EfficientFeed™ A, EfficientFeed™ B и EfficientFeed™ C и их комбинации.

4. Способ по пп.1-2, в котором в среду для культивирования клеток дополнительно вносятся добавки по графику, содержащему добавление в непрерывном режиме, ежедневно, через сутки, через двое суток и их комбинации, а именно в среду для культивирования клеток вносятся добавки, выбранные из группы, содержащей добавку Cell Boost™ 5 (Hyclone), добавки Cell Boost 7a и 7b (Hyclone) и их комбинации.

5. Способ по пп.1-2, в котором среда для культивирования клеток имеет осмоляльность в диапазоне 250-500 мОсм/кг; рН в диапазоне 6,5-7,5; содержание растворенного кислорода поддерживается в диапазоне 10-60%; температура культуры клеток находится в диапазоне от 30 до 38°C; первая температура предпочтительно составляет 36-37°C и в некоторых случаях вторая температура предпочтительно составляет 30-35°C; концентрация глюкозы поддерживается на уровне ниже 7%; предпочтительно от 4% до 5%; сбор клеток осуществляется при снижении жизнеспособности до 80%; в котором условия культивирования клеток поддерживаются таким образом, что концентрация вторичных метаболитов, таких как лактат, не превышает 5 г/л, а концентрация аммиака не превышает 5 ммоль/л.

6. Способ по п.5, в котором осмоляльность культивирования клеток составляет 400-500 мОсм/кг.

7. Способ по пп.1-2, в котором содержание растворенного кислорода в культивировании клеток поддерживается в диапазоне 20-40%.

8. Способ по пп.1-2, в котором клетки культивируют в периодическом, периодическом с подпиткой, непрерывном режиме, перфузионном режиме; более конкретно, в периодическом режиме с подпиткой.

9. Способ по пп.1-2, в котором концентрация солей в буферах, используемых для очистки, находится в диапазоне 50-300 мМ.

10. Способ по пп.1-2, далее содержащий дополнительный этап хроматографии, выбранный из группы, содержащей одну или более из хроматографии гидрофобного взаимодействия, гидрофобной хроматографии с индуцированием заряда, хроматографии с керамическим гидроксипатитом, мультимодаль-

ной хроматографии, мембранной хроматографии.

11. Способ по пп.1-2, в котором хроматография с белком А содержит:

- a) уравнивающий буфер: 20 мМ фосфатного буфера; 100-150 мМ NaCl; 0,05% полисорбата 80; pH 7,0±0,2;
- b) загрузка: очищенные собранные клетки;
- c) промывочный буфер I: 20 мМ фосфатного буфера; 100-150 мМ NaCl, более конкретно 150 мМ; 0,05% полисорбата 80; pH 7,0±0,2;
- d) промывочный буфер II: 20 мМ фосфатного буфера; 250 мМ - 1 М NaCl, более конкретно 1 М; 0,05% полисорбата 80; pH 7,0±0,2;
- e) промывочный буфер III: 10 мМ фосфатного буфера; 100-150 мМ NaCl, более конкретно 125 мМ; 0,05% полисорбата 80; pH 7,0±0,2;
- f) элюирующий буфер: 20 мМ цитратного буфера; pH 3,0±0,2 и дополнительно 0,025% (в/о) полисорбата 80;
- g) буфер СР: 0,1 М NaOH;
- h) время удерживания: 4,00-8,00 мин;
- i) использованная колонка: ХК26; и
- j) линейный расход составляет 10-500 м<sup>3</sup>/ч, более конкретно 100-150 м<sup>3</sup>/ч.

12. Способ по пп.1-2, в котором вирусная инактивация элюата после хроматографии с белком А достигается путем выдержки элюата при pH 3,3-3,5 на протяжении 50-100 мин.

13. Способ по пп.1-2, в котором катионообменную хроматографию выполняют с использованием смолы, выбранной из группы, содержащей одну или более из групп на основе сульфоната; группы на основе сульфозетила; группы на основе сульфопропила; группы на основе сульфоизобутила; группы на основе сульфоксиэтила; группы на основе карбоксиметила; групп на основе сульфоновой и карбоновой кислот; группы на основе карбоновой кислоты; группы на основе сульфоновой кислоты и группы на основе ортофосфата.

14. Способ по пп.1-2, в котором катионообменная хроматография содержит:

- a) буфер для предварительного уравнивания: 200 мМ цитратного буфера; pH 6,0±0,2;
- b) уравнивающий буфер: 10 мМ цитратного буфера; 0,025% (в/о) полисорбата 80; pH 6,0±0,2;
- c) промывочный буфер А: 10 мМ цитратного буфера; pH 6,0±0,2;
- d) промывочный буфер В: 20 мМ цитратного буфера; 300-500 мМ NaCl; pH 6,0±0,2;
- e) буфер СР: 0,5 М NaOH;
- f) время удерживания: 4,00-7,00 мин; и
- g) использованная колонка: ХК26.

15. Способ по пп.1-2, в котором анионообменная хроматография содержит:

- a) очистной буфер: 0,5 М NaOH;
- b) буфер для предварительного уравнивания: 200 мМ цитратного буфера; pH 6,0±0,2;
- c) уравнивающий буфер: 20 мМ цитратного буфера; pH 6,0±0,2 и дополнительно 0,025% полисорбата 80;
- d) буфер для хранения: 0,1 М NaOH;
- e) линейный расход составляет 10-500 м<sup>3</sup>/ч, более конкретно 100-150 м<sup>3</sup>/ч; и
- f) использованная колонка: ХК26.

16. Способ по пп.1-2, в котором анионообменная хроматография осуществляется в "проточном режиме с промывкой" или в режиме "связывания и элюирования".

17. Способ по пп.1-2, в котором удаление вирусных частиц достигается путем нанофильтрации с использованием задерживающего вирусы фильтра.

18. Способ по пп.1-2, в котором антигенсвязывающий белок концентрируют с использованием тангенциальной проточной фильтрации (ТПФ).

19. Способ по п.18, в котором ТПФ осуществляется с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 30 кДа.

20. Способ по п.18, в котором процесс тангенциальной проточной фильтрации содержит:

- a) диафильтрацию с использованием буфера для диафильтрации: 25 мМ гистидинового буфера; 75 мМ аргининового буфера; 50-150 мМ NaCl; pH 6,50±0,5;
- b) очистной буфер: 0,5 М NaOH;
- c) буфер для хранения: 0,1 М NaOH;
- d) уравнивание с использованием 5-10 объемов мембраны;
- e) концентрацию и диафильтрацию с использованием 10-20 объемов диафильтрации;
- f) промывку водой для инъекций с использованием 3-5 объемов мембраны;
- g) очистку с использованием 0,5-1,0 М NaOH; и
- h) хранение с использованием 0,1 М NaOH.

21. Способ по пп.1-2, в котором стабильная композиция антигенсвязывающего белка содержит не больше 2% агрегатов, предпочтительно меньше 1% агрегатов.



22. Способ по пп.1-2, в котором стабильная композиция антигенсвязывающего белка содержит от 1 до 100 мг/мл антигенсвязывающего белка.

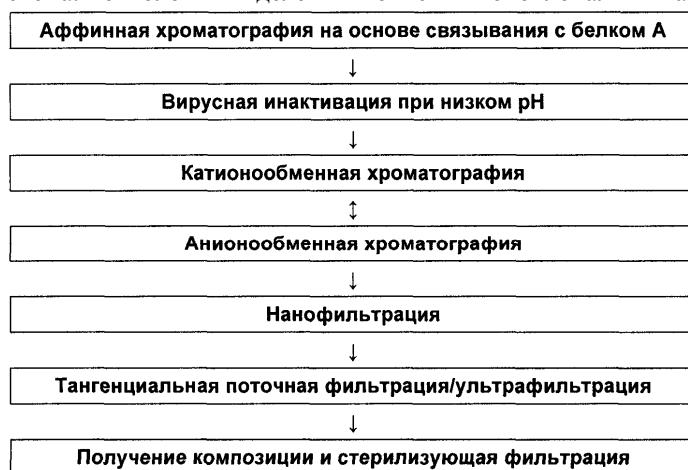
23. Способ по любому из приведенных выше пунктов, в котором композиция антигенсвязывающего белка содержит не более 3% агрегатов, минимальное количество невидимых частиц и обладает улучшенной активностью.

24. Способ по пп.1-2, в котором концентрация мономера антигенсвязывающего белка превышает 99%; концентрация остаточной ДНК СНО составляет не более 2 пг/мг антигенсвязывающего белка, более конкретно не более 0,1 пг/мг антигенсвязывающего белка; концентрация остаточного белка СНО составляет не более 100 нг/мг антигенсвязывающего белка, более конкретно не более 10 нг/мг антигенсвязывающего белка; концентрация остаточного белка А составляет не больше 10 нг/мг антигенсвязывающего белка, более конкретно не более 1,5 нг/мг антигенсвязывающего белка; и содержание эндотоксина составляет не более 0,1 ЕЭ/мг антигенсвязывающего белка.

25. Способ по пп.1-2, когда композиция содержит:

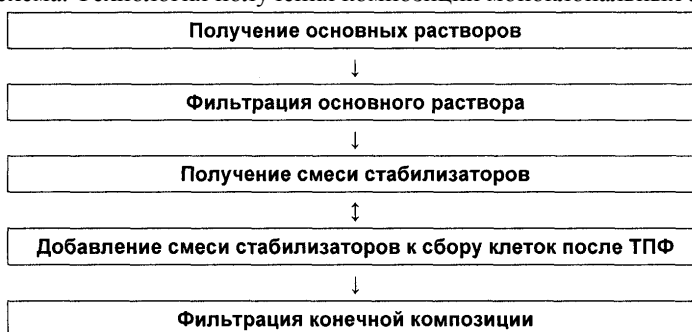
- a) 1-50 мг/мл антигенсвязывающего белка;
- b) 25 мМ гистидина;
- c) 75 мМ аргинина;
- d) 0,02% полисорбата 80 (в/о);
- e) 100-145 мМ NaCl; и
- f) <1% (в/о), более предпочтительно 0,5% (в/о) сахарозы.

Блок схема. Технология выделения и очистки моноклональных антител



Фиг. 1

Блок-схема. Технология получения композиции моноклональных антител



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2