

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2018119112, 25.05.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
27.05.2011 US 61/490,998(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2012121876 25.05.2012(43) Дата публикации заявки: 07.11.2018 Бюл. №  
31

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, д. 25,  
строение 3, ООО "Юридическая фирма  
Городисский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):

ЭББВИ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ ЛТД. (ВМ)

(72) Автор(ы):

ХАРТМАН Теймар (US),  
СОЭР Пол У. (US),  
БЕРКИ Джон Е. (US),  
ВЕССОН Марк С. (US),  
ХУАН Пин И. (US),  
РОБИНСОН Томас Дж. (US),  
ПАРТРИДЖ Бреден (US),  
ТСО Дж. Юнь (US)(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ НА ОСНОВЕ DAS НУР**

## (57) Формула изобретения

1. Модифицированная клетка NS0, которая адаптирована к росту в бессывороточных и не содержащих холестерина средах и которая сконструирована для экспрессии рекомбинантного белка, где указанная клетка способна достигать объемного выхода, превышающего 100 мг/л/сутки рекомбинантного белка, в культуре объемом 100 л в 10-суточном способе с подпиткой при культивировании в бессывороточных и не содержащих холестерина средах.

2. Модифицированная клетка NS0 по п. 1, которая способна достигать объемного выхода, превышающего 100 мг/л/сутки рекомбинантного белка, в культуре объемом 1000 л в 10-суточном способе с подпиткой при культивировании в средах, не содержащих холестерина и компонентов животного происхождения.

3. Модифицированная клетка NS0 по п. 1, которая способна достигать объемного выхода, превышающего 100 мг/л/сутки рекомбинантного белка, в культуре объемом 16000 л в 10-суточном способе с подпиткой при культивировании в средах, не содержащих холестерина и компонентов животного происхождения.

4. Модифицированная клетка NS0 по одному из пп. 1-3, где указанный способ с подпиткой включает добавление питательной среды, которую добавляют по следующей схеме, где добавленный объем представляет процент от первоначального объема клеточной культуры:

Сутки	Добавленный объем
0	0
1	0
2	4

3	7,8
4	7,8
5	7,8
6	11
7	13
8	15
9	15
10	0

5. Модифицированная клетка NS0 по п. 1, которая способна достигать объемного выхода, превышающего 200 мг/л/сутки рекомбинантного белка, в культуре объемом, по меньшей мере, 100 л в 13-суточном способе с подпиткой.

6. Модифицированная клетка NS0 по п. 5, которая способна достигать объемного выхода, превышающего 200 мг/л/сутки рекомбинантного белка, в культуре объемом 1000 л в 13-суточном способе с подпиткой при культивировании в средах, не содержащих холестерина.

7. Модифицированная клетка NS0 по п. 5, которая способна достигать объемного выхода, превышающего 100 мг/л/сутки рекомбинантного белка, в культуре объемом 16000 л в 10-суточном способе с подпиткой при культивировании в бессывороточных и не содержащих холестерина средах.

8. Модифицированная клетка NS0 по п. 1, которую стабильно трансфектируют нуклеиновой кислотой, пригодной для экспрессии моноклонального анти-CD25-антитела.

9. Модифицированная клетка NS0 по п. 8, где моноклональное анти-CD25-антитело содержит  $V_L$  легкой цепи, соответствующую по последовательности положениям 21-233 в SEQ ID NO:2, и  $V_H$  тяжелой цепи, соответствующую по последовательности положениям 20-465 в SEQ ID NO:4.

10. Модифицированная клетка NS0 по п. 1, которую трансформируют вектором pAbX.gpt.

11. Модифицированная клетка NS0 по п. 1, которую трансформируют вектором pHAT.IgG1.rg.dE.

12. Способ получения рекомбинантного белка, включающий культивирование модифицированной клетки NS0 по одному из пп. 1-11.

13. Способ по п. 12, в котором модифицированную клетку NS0 культивируют в условиях, которые приводят к продукции, по меньшей мере, 100 мг/л/сутки рекомбинантного белка, в 100, 1000 или 16000 л культуры в 10-суточном способе с подпиткой, или, по меньшей мере, 200 мг/л/сутки рекомбинантного белка в 100, 1000 или 16000 л культуры в 13-суточном способе с подпиткой.

14. Способ по п. 12 или 13, в котором модифицированную клетку NS0 культивируют в отсутствии сыворотки крови и холестерина.

15. Способ по п. 14, в котором модифицированную клетку NS0 культивируют в отсутствии трополона и гидрокортизона.

16. Способ по п. 12 или 13, в котором модифицированную клетку NS0 культивируют в базальной и/или питательной среде, содержащей 10-35 г/л глюкозы.

17. Способ по п. 16, в котором модифицированную клетку NS0 культивируют в базальной среде, содержащей 15 г/л глюкозы, и/или питательной среде, содержащей 28 г/л глюкозы.

18. Способ по п. 17, в котором базальная среда состоит из компонентов PFBM2±10%.

19. Способ по п. 17, в котором питательная среда состоит из компонентов PFFM3±10%.

20. Способ по п. 18 или 19, в котором клетку культивируют в базальной среде в течение 1-3 суток и затем в питательной среде в течение 10-13 суток.

21. Способ по п. 18, в котором питательную среду добавляют по схеме, приведенной в таблице 7  $\pm$  10%.

22. Вектор, пригодный для рекомбинантной экспрессии интересующего белка, содержащий слабый промотор, регулирующий экспрессию селективируемого маркера, функционирующего в клетках млекопитающих, и сильный промотор, регулирующий экспрессию интересующего белка.

23. Вектор по п. 22, где интересующий белок является терапевтическим антителом.

24. Вектор по п. 23, где терапевтическое антитело представляет анти-CD25-антитело.

25. Вектор по п. 24, где анти-CD25-антитело содержит CDR даклизумаба.

26. Вектор по п. 25, где анти-CD25-антитело представляет даклизумаб.

27. Способ получения клетки-хозяина млекопитающих, которая имеет высокий объемный выход интересующего белка, включающий трансфектирование клетки вектором по одному из пп. 22-26 и отбор клетки, которая способна продуцировать, по меньшей мере, 100 мг/л/сутки рекомбинантного белка в 100, 1000 или 16000 л культуры в 10-суточном способе с подпиткой, или, по меньшей мере, 200 мг/л/сутки рекомбинантного белка в 100, 1000 или 16000 л культуры в 13-суточном способе с подпиткой.

28. Композиция, содержащая даклизумаб, в которой даклизумаб отличается присутствием N-связанной изоформы тяжелой цепи pE/Q и/или N-концевой изоформы тяжелой цепи Q/VHS.

29. Композиция по п. 28, в которой N-концевая изоформа тяжелой цепи pE/Q составляет примерно 3-17% или 6-15% даклизумаба.

30. Композиция по п. 28, в которой N-концевая изоформа тяжелой цепи pE/Q составляет примерно 5-12 или 7-12% даклизумаба.

31. Композиция по одному из пп. 28-30, в которой N-концевая изоформа тяжелой цепи Q/VHS составляет примерно 1-15% даклизумаба.

32. Композиция по п. 31, в которой N-концевая изоформа тяжелой цепи Q/VHS составляет примерно 3-12% даклизумаба.

33. Композиция по п. 28, в которой тяжелая цепь даклизумаба находится в следующих N-концевых изоформах:

Изоформа	Содержание
pE/pE	25-50%
pE/Q	6-15%
pE/VHS	25-48%
Q/VHS	1-15%
VHS/VHS	0,5-25%

34. Композиция по п. 28, в которой тяжелая цепь даклизумаба находится в следующих N-концевых изоформах:

Изоформа	Содержание
pE/pE	31-46%
pE/Q	5-12%
pE/VHS	31-42%
Q/VHS	3-12%
VHS/VHS	1-17%

35. Композиция по п. 28, в которой даклизумаб отличается профилем изоформ при катионообменной хроматографии по существу аналогичным представленному на фигуре 18.

36. Композиция по п. 28, в которой даклизумаб представляет DAC НУР.
37. Композиция, содержащая даклизумаб, в которой даклизумаб отличается профилем N-связанного гликозилирования по данным ВЭЖХ, содержащим два основных пика, один соответствующий олигосахариду G0-GlcNAc, и один, соответствующий олигосахариду G0, где объединенные AUC данных двух пиков составляют примерно 75-100%, примерно 80-100% или примерно 88-99,5% от общей AUC всех пиков.
38. Композиция по п. 37, в которой AUC пика G0-GlcNAc составляет примерно 5-20%, примерно 5-18% от общей AUC всех пиков, и AUC пика G0 составляет примерно 70-99%, примерно 75-92% или примерно 75-90% от общей AUC всех пиков.
39. Композиция по п. 38, в которой AUC пика G0-GlcNAc составляет примерно 6-16% или примерно 7-15% от общей AUC всех пиков, и AUC пика G0 составляет примерно 78-90% или примерно 81-88% от общей AUC всех пиков.
40. Композиция по одному из пп. 37-39, в которой профиль N-связанного гликозилирования имеет менее чем примерно 3% Man5.
41. Композиция по п. 40, в которой профиль N-связанного гликозилирования имеет менее чем примерно 0,5% G2, Man6 и/или Man7.
42. Композиция по п. 37, в которой профиль N-связанного гликозилирования содержит третий пик, соответствующий сialiлированным олигосахаридам, и AUC пика сialiлированных олигосахаридов составляет 1% или менее от общей AUC всех пиков.
43. Композиция по п. 37, в которой профиль N-связанного гликозилирования содержит третий пик, соответствующий олигосахариду G1, и AUC пика G1 составляет менее чем примерно 10%, менее чем примерно 5%, менее чем примерно 4%, менее чем примерно 3% или примерно 1-5%, примерно 1-4% или примерно 1-3% от общей AUC всех пиков.
44. Композиция по п. 43, в которой AUC пика G1 составляет примерно 1-2% от общей AUC всех пиков.
45. Композиция по п. 37, в которой даклизумаб имеет профиль N-связанного гликозилирования по данным ВЭЖХ по существу аналогичный представленному на фигуре 19 или представленному на нижней панели фигуры 21.
46. Композиция по п. 37, в которой даклизумаб представляет DAC НУР.
47. Композиция, содержащая даклизумаб, который проявляет менее чем 30%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10% или менее чем 5% среднюю ADCC-цитотоксичность по данным клеточного теста в условиях *in vitro* с использованием эффекторных клеток, по меньшей мере, от 3 здоровых доноров и клеток Kit 225 K6 в качестве клеток-мишеней, в концентрации даклизумаба 1 мкг/мл и при соотношении эффектора к клеткам-мишеням, равным примерно 25:1.
48. Композиция по п. 47, где даклизумаб проявляет 5-30, 5-25, 10-30, 10-25 или 15-25% среднюю ADCC-цитотоксичность в указанном тесте.
49. Композиция по п. 47 или 48, где в указанном тесте используются эффекторные клетки, по меньшей мере, от 6 здоровых доноров.
50. Композиция по п. 47 или 48, где в указанном тесте используются эффекторные клетки, по меньшей мере, от 10 здоровых доноров.
51. Композиция по пп. 47-50, в которой даклизумаб представляет DAC НУР.
52. Композиция, пригодная для получения лекарственной формы даклизумаба, содержащая примерно 150-190 мг/мл даклизумаба и количества наполнителей так, что разведение композиции буфером для разведения дает разбавленную композицию, которая содержит примерно 85-165 мг/мл даклизумаба и имеет осмолярность в пределах примерно 267-327 мОсм/кг и pH в пределах примерно 5,8-6,2 при 25°C, и в которой, по

меньшей мере, примерно 95% даклизумаба находится в мономерной форме по данным эксклюзионной хроматографии.

53. Композиция по п. 52, которая содержит количества наполнителей так, что при разведении композиции буфером для разведения разбавленная композиция содержит примерно 85-115 мг/мл даклизумаба.

54. Композиция по п. 52, которая содержит количества наполнителей так, что при разведении композиции буфером для разведения разбавленная композиция содержит примерно 150±15 мг/мл даклизумаба.

55. Композиция, содержащая примерно от 4 до 15 мг/мл даклизумаба, где 0,1% или менее даклизумаба находится в агрегатной форме.

56. Композиция по п. 55, которую получают очисткой композиции даклизумаба, содержащей примерно от 4 до 15 мг/мл даклизумаба, где до 2,5% даклизумаба находится в агрегатной форме, с использованием колоночной хроматографии на слабой катионообменной смоле.

57. Композиция по п. 56, где слабая катионообменная смола представляет СМ-650М.

58. Композиция по п. 57, где смолу СМ-650М уравнивают буфером для уравнивания, содержащим примерно 20 мМ цитрата натрия, рН 4,4-4,6, и даклизумаб элюируется буфером для элюирования, содержащим примерно 20 мМ цитрата натрия и примерно 75 мМ сульфата натрия, рН 4,4-4,6.

59. Композиция по п. 58, где хроматографию проводят на цилиндрической колонке с использованием основания смолы с высотой примерно 10-30 см или примерно 17-19 см, и даклизумаб элюируется при температуре в пределах примерно 4-22°C или примерно 18-22°C, и со скоростью потока в пределах примерно 50-200 см/ч или примерно 90-110 см/ч.

60. Композиция, подходящая для введения людям, содержащая примерно 85-165 мг/мл даклизумаба; и примерно 0,02-0,04% (мас./об.) полисорбата 80, где композиция имеет осмолярность в пределах примерно 267-327 мОсм/кг и рН в пределах примерно 5,8-6,2 при 25°C, и по меньшей мере, примерно 95% даклизумаба находится в мономерной форме по данным эксклюзионной хроматографии.

61. Композиция по п. 60, в которой, по меньшей мере, примерно 99% даклизумаба находится в мономерной форме по данным эксклюзионной хроматографии.

62. Композиция по п. 60, которая содержит примерно 85-115 мг/мл даклизумаба.

63. Композиция по п. 62, которая в основном состоит примерно из 100 мг/мл даклизумаба, примерно 40 мМ сукцината натрия, примерно 100 мМ хлорида натрия и примерно 0,03% (мас./об.) полисорбата 80, и имеет рН примерно 6,0 при 25°C.

64. Композиция по п. 60, которая содержит примерно 135-165 мг/мл даклизумаба.

65. Композиция по п. 64, которая в основном состоит примерно из 150 мг/мл даклизумаба, примерно 40 мМ сукцината натрия, примерно 100 мМ хлорида натрия и примерно 0,03% (мас./об.) полисорбата 80, и имеет рН примерно 6,0 при 25°C.

66. Композиция по п. 64, которую получают способом, включающим стадии концентрирования композиции даклизумаба, содержащей примерно 4-15 мг/мл даклизумаба, посредством ультрафильтрации в подходящем буфере с достижением концентрации даклизумаба в пределах примерно 85-180 мг/мл и необязательно разведения концентрированной композиции буфером для разведения.

67. Фармацевтическая композиция, подходящая для подкожного введения, содержащая примерно 85-165 мг/мл даклизумаба, в которой процент даклизумаба в агрегатной форме не превышает примерно 3% после хранения в течение 12 месяцев при температуре в пределах примерно 2-8°C.

68. Фармацевтическая композиция по п. 67, которая содержит примерно 85-115

мг/мл даклизумаба.

69. Фармацевтическая композиция по п. 68, которая содержит примерно 135-165 мг/мл даклизумаба.

70. Фармацевтическая композиция по п. 68 или 69, в которой процент даклизумаба в агрегатной форме не превышает примерно 2% после хранения в течение 12 месяцев при температуре в пределах примерно 2-8°C.

71. Фармацевтическая композиция по п. 68 или 69, в которой процент даклизумаба в агрегатной форме не превышает примерно 3% после хранения в течение 18 месяцев при температуре в пределах примерно 2-8°C.

72. Способ сбора рекомбинантного белка из клеточной культуры, включающий стадии:

(i) доведения рН клеточной культуры, которая экспрессирует и секретирует рекомбинантный белок до рН в пределах примерно 4,5-5,5;

(ii) инкубации клеточной культуры с доведенным рН в течение примерно 30-90 мин при температуре в пределах примерно 4-15°C; и

(iii) центрифугирования инкубированной клеточной культуры с доведенным рН для удаления клеточного дебриса.

73. Способ получения очищенной композиции даклизумаба, включающий стадии:

(i) абсорбции даклизумаба из сырого препарата даклизумаба на смолу для аффинной хроматографии;

(ii) промывания смолы для аффинной хроматографии буфером для промывания для удаления загрязняющих примесей;

(iii) элюирования адсорбированного даклизумаба буфером для элюирования;

(iv) инактивации вирусов в элюате доведением рН примерно до рН 3-4 и инкубации элюата с доведенным рН при определенной температуре в течение периода времени, достаточного для инактивации вирусов;

(v) нейтрализации элюата с инаktivированными вирусами до рН в пределах примерно рН 7,7-7,9 (при 25°C);

(vi) пропускания нейтрализованного элюата через смолу для сильной анионообменной хроматографии;

(vii) абсорбции даклизумаба элюата со стадии (vi) на смоле для слабой катионообменной хроматографии; и

(viii) элюирования адсорбированного даклизумаба со смолы для слабой катионообменной хроматографии.

74. Способ по п. 73, в котором сырой препарат даклизумаб собирают из клеточной культуры.

75. Способ по п. 73, в котором даклизумаб собирают с использованием способа по п. 72.

76. Способ по п. 73, который дополнительно включает стадии:

(ix) фильтрования элюированной композиции даклизумаба со стадии (viii) для удаления вирусов; и

(x) концентрирования профильтрованного раствора с использованием ультрафильтрации с получением очищенной композиции даклизумаба, содержащей примерно 85-180 мг/мл даклизумаба.

77. Способ по п. 76, который дополнительно включает стадию разведения очищенной композиции даклизумаба буфером для разведения с получением композиции, содержащей примерно 85-165 мг/мл даклизумаба и примерно 0,02-0,04% (мас./об.) полисорбата 80, где композиция имеет осмолярность в пределах примерно 267-327 мОсм/кг и рН в пределах примерно 5,8-6,2 при 25°C, и, по меньшей мере, примерно 95% даклизумаба находится в мономерной форме по данным эксклюзионной

хроматографии.

78. Способ по п. 77, в котором полученная композиция содержит менее чем примерно 50 ppm белков клеток-хозяев из рекомбинантного источника даклизумаба, менее чем примерно 10 ppm протеина А, и не более чем 3% даклизумаба в композиции находится в агрегатной форме.

79. Базальная среда PFBM2.

80. Питательная среда PFFM3.

81. Композиция даклизумаба, которую получают способом, включающим стадии культивирования клетки-хозяина по одному из пп. 1-11 в условиях, в которых даклизумаб секретируется в культуральную среду.

82. Композиция даклизумаба по п. 81, где способ дополнительно включает стадию выделения секретированного даклизумаба из клеточной культуральной среды.

83. Буфер, пригодный для санитарной обработки смолы с протеином А для аффинной хроматографии, содержащий примерно 100-500 мМ цитрата натрия, примерно 10-30 мМ NaOH и примерно 0,5-3% (об./об.) бензилового спирта.

84. Способ санитарной обработки колонки с протеином А для аффинной хроматографии, включающий промывание колонки буфером для санитарной обработки по п. 83 со скоростью потока и в течение периода времени, достаточных для санитарной обработки колонки.

85. Способ по п. 84, в котором колонку промывают примерно 1,8 объемами колонки буфера для санитарной обработки со скоростью потока 150 см/ч, промытую колонку инкубируют без протока в течение примерно 30-45 мин и затем уравнивают буфером для уравнивания.

86. Способ по п. 85, в котором буфер для уравнивания содержит примерно 20 мМ цитрата натрия и 150 мМ NaCl, и имеет pH примерно 7 (при 25°C).

87. Способ лечения пациента, страдающего рассеянным склерозом, включающий введение пациенту количества композиции DAC HYP, достаточного для обеспечения терапевтического эффекта.

88. Способ по п. 87, в котором композицию DAC HYP вводят внутривенно.

89. Способ по п. 88, в котором композицию DAC HYP вводят в количестве, соответствующем примерно 0,8-0,9 мг/кг DAC HYP.

90. Способ по п. 89, в котором композицию DAC HYP вводят в количестве, соответствующем примерно 1 мг/кг DAC HYP.

91. Способ по одному из пп. 87-90, в котором DAC HYP вводят один раз в неделю в течение, по меньшей мере, 6 недель, по меньшей мере, 12 недель, по меньшей мере, 24 недель.

92. Способ по одному из пп. 87-91, в котором DAC HYP вводят в виде монотерапии.

93. Способ по п. 92, в котором пациент не отвечал на предшествующую терапию интерфероном-бета или прервал предшествующее лечение интерфероном-бета.

94. Способ по одному из пп. 87-91, в котором DAC HYP вводят дополнительно к интерферону-бета.

95. Способ по п. 87, в котором композицию DAC HYP вводят подкожно.

96. Способ по п. 95, в котором композицию DAC HYP вводят в количестве, соответствующем примерно 1 мг/кг DAC HYP.

97. Способ по п. 96, в котором композицию DAC HYP вводят один раз в две недели.

98. Способ по п. 97, в котором композицию DAC HYP вводят в целом в течение примерно 24 недель.

99. Способ по п. 95, в котором композицию DAC HYP вводят в количестве,

соответствующем примерно 2 мг/кг DАС НУР.

100. Способ по п. 99, в котором композицию DАС НУР вводят в один раз в 4 недели.

101. Способ по п. 100, в котором композицию DАС НУР вводят в целом в течение примерно 24 недель.

102. Способ по п. 101, в котором композицию DАС НУР вводят в количестве, соответствующем от 75 до 300 мг DАС НУР.

103. Способ по п. 102, в котором композицию DАС НУР вводят в количестве, соответствующем 150 мг.

104. Способ по п. 102, в котором композицию DАС НУР вводят в количестве, соответствующем 300 мг.

105. Способ по одному из пп. 101-104, в котором DАС НУР вводят в один раз в 4 недели.

106. Способ по п. 105, в котором композицию DАС НУР вводят в целом в течение примерно 48 недель.

107. Способ по одному из пп. 101-106, в котором DАС НУР вводят в виде монотерапии.

108. Способ по п. 107, в котором пациент не отвечал на предшествующую терапию интерфероном-бета или прервал предшествующее лечение интерфероном-бета.

109. Способ по одному из пп. 101-106, в котором DАС НУР вводят дополнительно к интерферону-бета.