

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091598** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.10.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.12.01**

(51) Int. Cl. *C12P 21/00* (2006.01)  
*C07K 16/00* (2006.01)  
*C07K 14/00* (2006.01)  
*C12P 21/02* (2006.01)

---

(54) **ПРОЦЕСС КОНТРОЛЯ УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКАНОВ В СОСТАВЕ**

---

(31) **62/085,759**

(32) **2014.12.01**

(33) **US**

(62) **201791223; 2015.12.01**

(71) Заявитель:  
**ЭМДЖЕН ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Лейске Дэниел Р., Тренталанж  
Майкл Т. (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В настоящем изобретении предложен способ управления содержанием фукозилированных гликанов в рекомбинантном белке.

**A2**

**202091598**

**202091598**

**A2**

**ПРОЦЕСС КОНТРОЛЯ УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКАНОВ В СОСТАВЕ  
ГЛИКОПРОТЕИНОВ**

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Множество посттрансляционных модификаций, включая метилирование, сульфатирование, фосфорилирование, добавление липидов и гликозилирование, проводят на белках, экспрессируемых высшими эукариотами. Гликозилирование включает ковалентное присоединение сахаров к конкретным аминокислотам и является одной из наиболее распространенных и важных посттрансляционных модификаций рекомбинантных белков. Белковое гликозилирование играет роль в многочисленных функциях, включая фолдинг белка и контроль качества, молекулярный перенос и сортировку, а также взаимодействие рецепторов на поверхности клетки. Известно, что многие из секретируемых белков, мембранных белков и белков, предназначенных для везикул или некоторых внутриклеточных органелл, являются гликозилированными.

Хотя гликозилирование может принимать различные формы, наиболее распространенным является N-связанное гликозилирование. N-связанное гликозилирование включает добавление олигосахаридов к аспарагиновому остатку, обнаруженному в определенных последовательностях узнавания в белках (например, Asn-X-Ser/Thr). N-связанные гликопротеины содержат стандартные разветвленные структуры, которые состоят из маннозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина и нейраминовых кислот. N-связанное гликозилирование Fc-домена рекомбинантно экспрессируемых терапевтических антител является важной посттрансляционной модификацией. Типичные терапевтические антитела имеют сложные гликоформы, содержащие фукозилированные двуразветвленные гликаны с триманнозным остовом, увенчанным остатком N-ацетилгалактозамина (GlcNAc), галактозы и N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac) на каждой ветви. Другие гликоформы могут быть афукозилированы, галактозилированы, сиалилированы, иметь терминальную или бисекторную GlcNAc, быть высокоманнозными (5-9 остатков) и т.д.

Гликозилирование может влиять на терапевтическую эффективность лекарственных средств на основе рекомбинантных белков. Хорошо известно, что вариации гликозилирования Fc-домена могут влиять на Fc-опосредованные эффекторные функции. Некоторые гликоформы, такие как галактозилирование и сиалилирование, являются желательными для снижения иммуногенности, а другие, такие как афукозилирование, бисекторные остатки GlcNAc и высокоманнозные гликаны, усиливают активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Гликозилирование важно для определения структуры и функции терапевтических антител. Оно определяет возможности связывания и часто определяет распознавание и обработку антитела после его введения при терапевтическом применении. В случае галактозилирования и фукозилирования они определяют комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и функции ADCC, соответственно, на которые они влияют.

Уровень  $\beta$ -галактозилирования связан с более «зрелыми» гликоформами. Добавление галактозы является одной из последних стадий гликозилирования, которая происходит в аппарате Гольджи до секреции. Терминальная галактоза необходима для сиалилирования, которое может быть заключительной стадией гликозилирования некоторых белков. Галактоза также служит в качестве лиганда для галактозосвязывающих белков и является основой для различных антигенных ответов, которые связаны с содержанием углеводов. Было также показано, что галактоза влияет на конформацию белка в растворе. (Furukawa and Sato, (1999) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1473 (1), pages 54-86 и Houde et al., (2010) *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(8), pages 1716-1728).

Фукозилирование также происходит в аппарате Гольджи как часть созревания белка до секреции. Если белок фукозилирован, то это обычно происходит до галактозилирования в пути гликозилирования. Однако для продолжения процесса галактозилирования не требуется фукозилирование (Hossler et al., (2009) *Glycobiology*, 19(9), pages 936-949).

Влияние гликозилирования на биоактивность, фармакокинетику, иммуногенность, растворимость и клиренс *in vivo* терапевтических гликопротеинов сделали мониторинг и контроль гликозилирования критическим параметром для биофармацевтического производства. Поэтому было бы полезно использовать методы манипулирования уровнем содержания гликанов в терапевтических белках.

Существует необходимость в фармацевтической промышленности манипулировать и контролировать уровень содержания гликанов в рекомбинантных терапевтических гликопротеинах и способы их достижения без существенного влияния на рост клеток, жизнеспособность и продуктивность. Настоящее изобретение обеспечивает способ манипулирования содержанием фукозилированных гликанов в рекомбинантном белке путем регулирования содержания меди и марганца, и pH в клеточной культуральной среде.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение предлагает способ управления содержанием фукозилированных гликанов в рекомбинантном белке, включающий инокуляцию биореактора клетками-хозяевами, экспрессирующими рекомбинантный белок, культивирование клеток-хозяев в бессывороточной среде заданного химического состава; причем клеточная культуральная среда содержит от 10 до 100 частей на миллиард меди и от 50 до 1000 нМ марганца при pH 7,0, сбор рекомбинантного белка, продуцируемого клеткой-хозяином, при этом уровень афукозилированных гликанов в рекомбинантном белке увеличивается по сравнению с уровнем афукозилированных гликанов, полученных в той же самой клеточной культуральной среде при более низком pH.

В одном варианте реализации изобретения способ дополнительно включает повышение уровня  $\beta$ -галактозилирования рекомбинантного белка.

В одном варианте реализации изобретения концентрация меди составляет 100 частей на миллиард.

В одном варианте реализации изобретения концентрация марганца составляет 1000 нМ.

В одном варианте реализации изобретения содержание фукозилированных гликанов регулируется для воздействия на эффекторную функцию рекомбинантного белка.

В одном варианте реализации изобретения способ дополнительно включает температурный сдвиг. В смежном варианте реализации изобретения температурный сдвиг составляет сдвиг с 36 °С до 31 °С. В другом связанном варианте реализации изобретения температурный сдвиг происходит при переходе между фазой роста и фазой продукции. В еще одном связанном варианте реализации изобретения температурный сдвиг происходит во время фазы продукции.

В одном варианте реализации изобретения клетку-хозяина, экспрессирующую рекомбинантный белок, культивируют в периодической культуре, культуре с подпиткой, проточной культуре или их комбинациях. В связанном варианте реализации изобретения культура представляет собой перфузионную культуру. В другом родственном варианте реализации изобретения перфузия включает непрерывную перфузию. В другом связанном варианте реализации изобретения скорость перфузии является постоянной. В другом связанном варианте реализации изобретения перфузия выполняется со скоростью меньшей или равной 1,0 рабочему объему в день. В еще одном связанном варианте реализации изобретения перфузия достигается путем чередования тангенциального потока.

В одном варианте реализации изобретения биореактор имеет объем, равный по меньшей мере 500 л.

В одном варианте реализации изобретения биореактор имеет объем, равный по меньшей мере 500-2000 л.

В одном варианте реализации изобретения биореактор имеет объем, равный по меньшей мере 1000-2000 л.

В одном варианте реализации изобретения биореактор инокулируют по меньшей мере  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл.

В одном варианте реализации изобретения бессывороточная клеточная культуральная среда заданного химического состава является перфузионной клеточной культуральной средой.

В одном варианте реализации изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающего.

В одном варианте реализации изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки яичника китайского хомячка (СНО).

В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок представляет собой гликопротеин.

В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного гибридного белка или цитокина.

В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок, продуцируемый клеткой-хозяином, очищают и предоставляют в форме фармацевтически приемлемого состава.

В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок получают способом по данному изобретению. В связанном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок согласно изобретению очищают. В еще одном связанном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок предоставляют в форме фармацевтически приемлемого состава.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 Интегрированная плотность жизнеспособных клеток ( $10^6$  клеток сутки/мл)

pH 6,85 50  $Mn^{2+}$  10  $Cu^{2+}$  (серая пунктирная линия с +)

pH 6,85 50  $Mn^{2+}$  100  $Cu^{2+}$  (серая линия с +)

pH 6,85 1000  $Mn^{2+}$  10  $Cu^{2+}$  (серая пунктирная линия с пустым кругом)

pH 6,85 50  $Mn^{2+}$  100  $Cu^{2+}$  (серая линия с пустым кругом)

pH 7,0 50  $Mn^{2+}$  10  $Cu^{2+}$  (черная пунктирная линия с +)

pH 7,0 50  $Mn^{2+}$  100  $Cu^{2+}$  (черная линия с +)

pH 7,0 1000  $Mn^{2+}$  10  $Cu^{2+}$  (черная пунктирная линия с пустым кругом)

pH 7,0 50  $Mn^{2+}$  100  $Cu^{2+}$  (черная линия с пустым кругом)

pH оказался единственным фактором, влияющим на рост клеток. Концентрации марганца и меди, по-видимому, не влияют на рост клеток.

Фиг. 2 Жизнеспособность (%)

pH 6,85 50  $Mn^{2+}$  10  $Cu^{2+}$  (серая пунктирная линия с +)

pH 6,85 50  $Mn^{2+}$  100  $Cu^{2+}$  (серая линия с +)

pH 6,85 1000 Mn<sup>2+</sup> 10 Cu<sup>2+</sup> (серая пунктирная линия с пустым кругом)

pH 6,85 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (серая линия с пустым кругом)

pH 7,0 50 Mn<sup>2+</sup> 10 Cu<sup>2+</sup> (черная пунктирная линия с +)

pH 7,0 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (черная линия с +)

pH 7,0 1000 Mn<sup>2+</sup> 10 Cu<sup>2+</sup> (черная пунктирная линия с пустым кругом)

pH 7,0 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (черная линия с пустым кругом)

На 17 сутки культуры с pH 6,85 имели более высокую конечную жизнеспособность по сравнению с культурами с pH 7,0. Однако конечная жизнеспособность составляла более 80 %, независимо от pH. Концентрация меди и марганца в тестируемых диапазонах не влияла на жизнеспособность.

Фиг. 3 Приведенный титр осажденных клеток (г/л)

pH 6,85 50 Mn<sup>2+</sup> 10 Cu<sup>2+</sup> (серая пунктирная линия с +)

pH 6,85 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (серая линия с +)

pH 6,85 1000 Mn<sup>2+</sup> 10 Cu<sup>2+</sup> (серая пунктирная линия с пустым кругом)

pH 6,85 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (серая линия с пустым кругом)

pH 7,0 50 Mn<sup>2+</sup> 10 Cu<sup>2+</sup> (черная пунктирная линия с +)

pH 7,0 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (черная линия с +)

pH 7,0 1000 Mn<sup>2+</sup> 10 Cu<sup>2+</sup> (черная пунктирная линия с пустым кругом)

pH 7,0 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (черная линия с пустым кругом)

pH, как оказалось, не оказывает статистического влияния на приведенный титр осажденных клеток, аналогично, концентрация меди и марганца не влияет на данную клеточную линию и процесс.

Фиг. 4 Плотность жизнеспособных клеток (10<sup>5</sup> клеток сутки/мл)

pH 6,85 50 Mn 10 Cu (серая пунктирная линия с +)

pH 6,85 50 Mn 100 Cu (серая линия с +)

pH 6,85 1000 Mn 10 Cu (серая пунктирная линия с пустым кругом)

pH 6,85 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (серая линия с пустым кругом)

pH 7,0 50 Mn<sup>2+</sup> 10 Cu<sup>2+</sup> (черная пунктирная линия с +)

pH 7,0 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (черная линия с +)

pH 7,0 1000 Mn<sup>2+</sup> 10 Cu<sup>2+</sup> (черная пунктирная линия с пустым кругом)

pH 7,0 50 Mn<sup>2+</sup> 100 Cu<sup>2+</sup> (черная линия с пустым кругом)

В реакторах, запущенных при pH 6,85, рост происходил до плотности клеток на около 10<sup>6</sup> клеток на мл больше, чем в реакторах, в которых рост происходил при pH 7,0. Концентрация меди и марганца не имела статистически значимого влияния на рост клеток в данном эксперименте для данной клеточной линии и процесса. pH был единственным фактором, влияющим на рост клеток.

Фиг. 5 β-галактозилирование (Привед. R<sup>2</sup> = 0,95) Профиль предсказания, созданный с использованием программного обеспечения для статистических расчетов JMP. Профиль иллюстрирует направленность и величину изменений β-галактозилирования в результате изменения pH и концентрации марганца. Условия в профиле представляют оставшиеся условия в статистической модели после удаления тех условий, которые не были статистически значимыми. Добавление марганца оказывает значительное влияние на уровень бета-галактозилирования; чем выше концентрация марганца, тем выше процент бета-галактозилирования. pH также оказывает статистически значимое влияние на бета-галактозилирование, при увеличении pH бета-галактозилирование также увеличивается, однако не в такой степени, в которой это наблюдается при добавлении марганца.

Фиг. 6 Афукозилирование (Привед. R<sup>2</sup> = 0,92) Профиль предсказания, созданный с использованием программного обеспечения для статистических расчетов JMP. Профиль иллюстрирует направленность и величину изменений в афукозилировании в результате изменения pH и концентрации марганца и меди. Условия в профиле представляют оставшиеся условия в статистической модели после удаления тех условий, которые не были статистически значимыми. И медь, и марганец, и pH имели статистически значимое влияние на уровни афукозилирования. Увеличение уровня содержания меди и марганца, как и увеличение pH, приводило к увеличению афукозилирования.



Фиг. 7 Относительная цитотоксичность ADCC, при исходном аффукозилировании (4 %), аффукозилировании, равном 6 % и аффукозилировании, равном 8 %.

Фиг. 8 Вычисленный для CDC дозозависимый ответ, при исходном  $\beta$ -галактозилировании, (2,7 %), 25 %  $\beta$ -галактозилировании и 50 %  $\beta$ -галактозилировании.

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Варьирование концентрации марганца в клеточной культуральной среде может влиять на степень  $\beta$ -галактозилирования рекомбинантных антител. Марганец действует как кофактор в модуляции активности галактозилтрансферазы. В реакции, опосредованной галактозилтрансферазой, в качестве кофактора используется UDP-галактоза в качестве сахарного субстрата и марганец. Изменение уровня галактозилирования может быть вызвано изменением доступности UDP-галактозы или изменением ферментативной активности (например, путем изменения концентрации кофактора марганца) или тем и другим.

Аналогичным образом, фукозилирование может быть ослаблено путем изменения уровней субстрата GDP-фукозы, путем вмешательства в активность фукозилтрансферазы или путем модификации механизма переноса GDP-фукозы. Однако не сообщалось, что ионы металлов играют прямую роль в любом из этих механизмов. Как описано в настоящем документе, обнаружено, что повышение уровня марганца и меди влияет на содержание фукозилированных гликанов в рекомбинантном белке, значительно увеличивая уровень аффукозилированных гликанов. Кроме того, было установлено, что pH также играет важную роль в определении принципов гликозилирования.

Известно, что тип и степень N-связанного гликозилирования на IgG1-антителах влияют на Fc-опосредованные эффекторные функции. Например, уровень аффукозилирования сильно увеличивает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) за счет увеличения аффинности связывания с Fc $\gamma$ -рецепторами, тогда как уровень галактозилирования может влиять на активность комплементарной цитотоксичности (CDC). Это делает критически важным понимание и контролирование природы и уровня

гликозилирования терапевтических белков. Описанное в настоящем документе, усиление афукозилирования и галактозилирования оказало существенное влияние на эффекторы ADCC и CDC.

Предложен способ улучшения контроля уровней афукозилированных гликанов в рекомбинантном белке путем управления рН и концентрациями марганца ( $Mn^{2+}$ ) и меди ( $Cu^{2+}$ ) в клеточной культуральной среде. Уровни афукозилированных и  $\beta$ -галактозилированных гликанов были увеличены без влияния на характеристики культуры клеток.

Настоящее изобретение предлагает способ управления содержанием фукозилированных гликанов в рекомбинантном белке, включающий инокуляцию биореактора клетками-хозяевами, экспрессирующими рекомбинантный белок, культивирование клеток-хозяев в бессывороточной среде заданного химического состава; причем клеточная культуральная среда содержит от 10 до 100 частей на миллиард меди и от 50 до 1000 нМ марганца при рН 7,0, сбор рекомбинантного белка, продуцируемого клеткой-хозяином, при этом уровень афукозилированных гликанов в рекомбинантном белке увеличивается по сравнению с уровнем афукозилированных гликанов, полученных в той же самой клеточной культуральной среде при более низком рН. В одном варианте реализации изобретения способ дополнительно включает повышение уровня  $\beta$ -галактозилирования рекомбинантного белка. В одном варианте реализации изобретения концентрация меди составляет 100 частей на миллиард. В одном варианте реализации изобретения концентрация марганца составляет 1000 нМ. В одном варианте реализации изобретения содержание фукозилированных гликанов регулируется для воздействия на эффекторную функцию рекомбинантного белка.

В одном варианте реализации изобретения способ дополнительно включает температурный сдвиг. В смежном варианте реализации изобретения температурный сдвиг составляет сдвиг с 36 °С до 31 °С. В другом связанном варианте реализации изобретения температурный сдвиг происходит при переходе между фазой роста и фазой продукции. В еще одном связанном варианте

реализации изобретения температурный сдвиг происходит во время фазы продукции.

В одном варианте реализации изобретения клетку-хозяина, экспрессирующую рекомбинантный белок, культивируют в периодической культуре, культуре с подпиткой, проточной культуре или их комбинациях. В связанном варианте реализации изобретения культура представляет собой перфузионную культуру.

В другом родственном варианте реализации изобретения

перфузия включает непрерывную перфузию. В другом связанном варианте реализации изобретения скорость перфузии является постоянной. В другом связанном варианте реализации изобретения перфузия выполняется со скоростью меньшей или равной 1,0 рабочему объему в день. В еще одном связанном варианте реализации изобретения перфузия достигается путем чередования тангенциального потока.

В одном варианте реализации изобретения биореактор имеет объем, равный по меньшей мере 500 л. В одном варианте реализации изобретения биореактор имеет объем, равный по меньшей мере 500-2000 л. В одном варианте реализации изобретения биореактор имеет объем, равный по меньшей мере 1000-2000 л. В одном варианте реализации изобретения биореактор инокулируют по меньшей мере  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл.

В одном варианте реализации изобретения бессывороточная клеточная культуральная среда заданного химического состава является перфузионной клеточной культуральной средой. В одном варианте реализации изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающего. В одном варианте реализации изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки яичника китайского хомячка (СНО).

В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок представляет собой гликопротеин. В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного гибридного белка или цитокина. В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок, продуцируемый клеткой-хозяином, очищают и

предоставляют в форме фармацевтически приемлемого состава. В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок получают способом по данному изобретению. В связанном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок согласно изобретению очищают. В еще одном связанном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок предоставляют в форме фармацевтически приемлемого состава

#### Культура клеток

Под «культурой клеток» или «культурой» понимается рост и размножение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия для клеток млекопитающих известны в данной области техники. См., например, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих можно культивировать в суспензии или прикрепленными к твердой подложке.

Используемые в настоящем документе термины «питательная среда для культивирования клеток» (также называемая «культуральная среда», «питательная среда для культуры клеток», «питательная среда для культуры тканей») относятся к любому питательному раствору, используемому для выращивания клеток, например, клеток животных или млекопитающих, и который обычно обеспечивает по меньшей мере один или несколько компонентов из следующих: источник энергии (обычно в форме углеводов, таких как глюкоза); одна или более из всех незаменимых аминокислот, и, как правило, двадцать основных аминокислот, плюс цистеин; витамины и/или другие органические вещества, как правило, необходимые в низких концентрациях; жиры или свободные жирные кислоты; и микроэлементы, например, неорганические соединения или природные элементы, которые обычно требуются в очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне.

Питательный раствор может необязательно быть дополнен дополнительными необязательными компонентами для оптимизации роста клеток, такими как гормоны и другие факторы роста, например, инсулином, трансферрином, эпидермальным фактором роста, сывороткой и т. д. ; солями, например, кальция, магния и фосфатами; буферами, например, HEPES; нуклеозидами и

основаниями, например аденозином, тимидином, гипоксантином; гидролизатами белков и тканей, например гидролизованным животным белком (пептоном или смесью пептона, которые могут быть получены из побочных продуктов животного происхождения, очищенным желатином или материалом растительного происхождения); антибиотиками, например гентамицином; средствами для защиты клеток или поверхностно-активными веществами, полиаминами, например путресцином, спермидином или спермином (см., например, публикацию ВОИС № WO 2008/154014) и пируватом (см., например, патент США № 8053238) в зависимости от требований клеток, которые необходимо культивировать и/или желаемых параметров культуры клеток.

Неионные поверхностно-активные вещества также могут быть добавлены в клеточную культуральную среду. Примеры неионных поверхностно-активных веществ включают, но не ограничиваются ими, поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль и неионные поверхностно-активные блок-сополимеры. Также включены алкилполиэтиленоксид, сополимеры полиэтиленоксида и полипропиленоксида (EO-PO- блоксополимеры), поливинилпирролидон, алкилполиглюкозиды (такие как моностеарат сахарозы, лаурилдиглюкозид или *сорбитан монолаурат*, октилглюкозид и децилмалозид), жирные спирты (цетиловый спирт или олеилловый спирт) или кокамиды (кокамид MEA, кокамид DEA и кокамид TEA).

Также включены блоксополимеры на основе этиленоксида и пропиленоксида, также называемые блоксополимерами полиоксипропилен-полиоксиэтилен. Эти молекулы представляют собой неионные триблоксополимеры, имеющие центральную гидрофобную цепь полиоксипропилена (полипропиленоксид), фланкированную двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (полиэтиленоксид). Особый интерес представляют те, которые имеют 70 полиоксипропиленовых звеньев и 30 звеньев каждой из полиоксиэтиленовых цепей. В предпочтительном варианте реализации изобретения блоксополимер представляет собой полксамер 188 (CAS № 90003-11-6 со средней молекулярной массой 8,4 кДа, BASF Chemical, Вашингтон, штат Нью-Джерси), который

продается под различными торговыми марками, такими как Pluronic® F68, Kolliphor® P -188, Lutrol® F68 и Lutrol® 188. Такие неионные поверхностно-активные вещества могут добавляться в концентрациях до 5 г/л или более и могут использоваться для поддержания жизнеспособности клеток при более длительных сроках культивирования в условиях перфузии с чередованием тангенциального потока.

В настоящем изобретении предложена клеточная культуральная среда, которая содержит от 10 до 100 частей на миллиард меди и от 50 до 1000 нМ марганца. В одном варианте реализации изобретения клеточная культуральная среда содержит 100 частей на миллиард марганца. В другом варианте реализации изобретения клеточная культуральная среда содержит 1000 нМ марганца. В другом варианте реализации изобретения клеточная культуральная среда содержит 100 частей на миллиард марганца и 1000 нМ марганца. Соли меди и марганца, пригодные для данного изобретения, включают, но не ограничиваются ими, меди сульфат пентагидрат и марганца сульфат моногидрат.

Компоненты клеточной культуральной среды, включая медь и марганец, могут быть полностью измельчены в порошкообразный препарат; частично измельчены с добавками жидкости, добавляемыми в культуральную среду клеток по мере необходимости; или компоненты клеточной культуральной среды могут быть добавлены в полностью жидкой форме в клеточную культуру.

Клеточные культуральные среды включают те, которые обычно используются в и/или известны для использования в любом процессе культивирования клеток, таком как, без ограничений, периодическое, расширенное периодическое, периодическое с подпиткой и/или проточное или непрерывное культивирование клеток.

«Базовая» (или исходная) клеточная культуральная среда относится к среде для культуры клеток, которая обычно используется для инициации культуры клеток и является достаточно полной для поддержания культуры клеток.

«Ростовая» питательная клеточная культуральная среда относится к питательной среде для культуры клеток, которая обычно используется в клеточных культурах в период экспоненциального роста, «фазы роста», и является достаточно полной для поддержания клеточной культуры во время этой фазы. Ростовая питательная среда для культуры клеток может также содержать агенты, которые обеспечивают устойчивость или выживаемость селективных маркеров, введенных в клеточную линию хозяина. Такие селективные агенты включают, но не ограничиваются ими, генетицин (G4118), неомицин, гигромицин В, пурамицин, зеоцин, метионин сульфоксимин, метотрексат, питательную среду для культуры клеток без глутамина, питательную среду для культуры клеток без глицина, гипоксантина и тимидина, или только тимидина.

«Продуктивная» питательная среда для культуры клеток относится к питательной среде для культуры клеток, которая обычно используется в культурах клеток в течение переходного периода и фазы продукции, когда заканчивается экспоненциальный рост и начинается продуцирование белка, и является достаточно полной для поддержания желаемой плотности, жизнеспособности и/или титра клеток в течение этих фаз.

«Перфузионная» среда для культуры клеток относится к среде для культуры клеток, которая обычно используется в клеточных культурах, которые поддерживаются перфузионным или непрерывным способами культивирования, и является достаточно полной для поддержания культуры клеток во время этого процесса. Состав перфузионной среды для культуры клеток может быть более богатым или более концентрированным, чем состав базовой среды для культуры клеток, чтобы обеспечить способ, используемый для удаления отработанной питательной среды. Перфузионная среда для культуры клеток может быть использована в фазах роста и продукции.

Клеточные культуры могут быть дополнены концентрированной питательной средой, содержащей компоненты, такие как питательные вещества и аминокислоты, которые потребляются в течение фазы продуцирования культуры. Концентрированная

питательная среда для культуры клеток может содержать некоторые или все питательные вещества, необходимые для поддержания культуры клеток; в частности, концентрированная питательная среда может содержать идентифицированные или известные питательные вещества, потребляемые в течение фазы продукции культурой клеток. Концентрированная питательная среда может быть основана на любом составе питательной среды для культуры клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать некоторые или все компоненты сред для культивирования клеток в количестве, составляющем, например, около 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 25X, 30X, 40X, 50X, 75X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X или даже 1000X от их нормального количества.

Клеточная культуральная среда, в некоторых вариантах реализации изобретения, может быть бессывороточной и/или не содержать продуктов или ингредиентов животного происхождения. Клеточная культуральная среда в определенных вариантах реализации изобретения может быть заданного химического состава, где известны все химические компоненты.

По мнению практикующего, клетки животных или млекопитающих культивируют в среде, подходящей для конкретных культивируемых клеток, и которые могут быть определены специалистом в данной области без излишнего экспериментирования. Коммерчески доступные среды могут быть использованы и включают, но не ограничиваются ими, модифицированную Исков среду Дульбекко, RPMI 1640 и минимальную существенную среду альфа. (MEM-альфа), модификация Дульбекко среды Игла (DMEM), DME/F12, альфа-MEM, базовая среда Игла с BSS Эрле, DMEM с высоким уровнем глюкозы, с глутамином, DMEM с высоким уровнем глюкозы, без глутамина, DMEM с низким уровнем глюкозы, без глутамина, DMEM:F12 1:1 с глутамином, GMEM (MEM Глазго), GMEM с глутамином, полная среда Грейс для насекомых, среда Грейс для насекомых, без FBS, среда Хэма F-10 с глутамином, среда Хэма F-12 с глутамином, IMDM с HEPES и глутамином, IMDM с HEPES и без глутамина, среда IP41 для насекомых 15 (Лейбовиц) (2X), без глутамина или фенолового красного, 15 (Лейбовиц), без глутамина, модифицированная среда



МакКой 5А, среда 199, MEM Игла без глутамин или фенолового красного (2X), MEM Игла-Эрле BSS с глутамином, MEM Игла-Эрле BSS без глутамин, MEM Игла-Эрле BSS без глутамин, NCTC-109 с глутамином, среда CM Рихтера с глутамином, RPMI 1640 с HEPES, глутамином и/или пенициллином-стрептомицином, RPMI 1640 с глутамином, RPMI 1640 без глутамин, среда Шнайдера для насекомых или любые другие среды, известные специалистам в данной области техники, которые созданы для конкретных типов клеток. К вышеуказанному иллюстративному средству могут быть добавлены дополнительные компоненты или ингредиенты, включая необязательные компоненты, в соответствующих концентрациях или количествах, если это необходимо или желательно, и как было бы известно и практиковалось бы специалистами, использующими стандартные навыки.

Культуры клеток также могут быть дополнены независимыми концентрированными добавками определенных питательных веществ, которые могут сложно изготавливаться или быстро истощаться культурой клеток. Такие питательные вещества могут представлять собой аминокислоты такие, как тирозин, цистеин и/или цистин (см., например, публикацию ВОИС № 2012/145682). Например, концентрированный раствор тирозина можно независимо подавать в культуру клеток, выращенную в клеточной культуральной среде, содержащей тирозин. Концентрированный раствор тирозина и цистина можно также независимо вносить в культуру клеток, выращенную на клеточной культуральной среде, лишенной тирозина, цистина и/или цистеина. Независимая подпитка может начинаться до или в начале фазы продукции. Независимая подпитка может быть достигнута путем периодической подпитки питательной среды для культуры клеток в те же или разные дни, что и подпитка концентрированной питательной средой. Независимая подпитка также может быть перфузирована в те же или другие дни, что и перфузирование средой.

Для непрерывного питания культуры клеток млекопитающих могут быть использованы такие способы, которые не требуют контроля с обратной связью (см. публикацию ВОИС № WO 2013/040444).

### Обработка сред

Клеточную культуральную среду можно обрабатывать с использованием способов или устройств для стерилизации или дезинфекции среды перед добавлением в биореактор и/или культуру клеток. Клеточную культуральную среду можно обрабатывать с использованием высокотемпературной кратковременной обработки (HTST) (см., например, патент США № 7420183). Клеточную культуральную среду можно также обрабатывать с использованием УФ в сочетании с фильтрацией (см., например, публикации ВОИС WO 2008/157247, WO 2012/115874, WO 2013/063298 и WO 2013/138159). Клеточные культуральные среды могут быть подвергнуты нанофильтрации (см., например, Liu et al., (2000) *Biotechnol. Prog.* 16:425-434). Клеточные культуральные среды можно обрабатывать химическими средствами, которые инактивируют вирусы, такие как растворители, детергенты, псорален или бета-пропиолактон.

### Клетки

Клеточные линии (также известные как «клетки-хозяева»), используемые в настоящем изобретении, являются генетически сконструированными для экспрессии полипептида, представляющего коммерческий или научный интерес. Клеточные линии, как правило, получают из линии, происходящей из первичной культуры, которая может поддерживаться в культуре в течение неограниченного времени. Клетки могут содержать введенные, например, путем трансформации, трансфекции, инфицирования или инъекции, экспрессионные векторы (конструкты), такие как плазмиды и т.п., которые содержат кодирующие последовательности или их части, кодирующие белки для экспрессии и продуцирования в процессе культивирования. Такие экспрессионные векторы содержат необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроенной кодирующей последовательности. Способы, которые хорошо известны специалистам и известны на практике, могут быть использованы для конструирования экспрессионных векторов, содержащих последовательности, кодирующие полученные белки и полипептиды, а также соответствующие элементы управления транскрипцией и трансляцией. Эти способы включают технологии рекомбинантной ДНК

*in vitro*, технологии синтеза, и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Такие способы описаны в J. Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4<sup>th</sup> edition Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. или любом из предыдущих изданий; F. M. Ausubel et al., 2013, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, или любом из предыдущих изданий; Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, все из которых включены в настоящий документ для любых целей.

Клетки животных, клетки млекопитающих, культивируемые клетки, клетки-хозяева животных или млекопитающих, клетки-хозяева, рекомбинантные клетки, рекомбинантные клетки-хозяева и т.п. являются терминами для клеток, которые могут быть культивированы в соответствии со способами данного изобретения. Такие клетки обычно представляют собой клеточные линии, полученные или происходящие от млекопитающих и способные расти и переживать при помещении в монослойную культуру или суспензионную культуру на среду, содержащую соответствующие питательные вещества и/или другие факторы, такие как описанные в настоящем документе. Клетки обычно выбирают так, чтобы они могли экспрессировать и секретировать белки или могли быть молекулярно модифицированы для экспрессии и секреции больших количеств конкретного белка, в частности, представляющего интерес гликопротеина, в культуральную среду. Понятно, что белок, продуцируемый клеткой-хозяином, может быть эндогенным или гомологичным клетке-хозяину. И наоборот, белок гетерологичен, то есть чужероден, клетке-хозяину, например, человеческий белок, продуцируемый и секретиремый клеткой-хозяином яичника китайского хомячка (СНО). Кроме того, белки млекопитающих, т.е. получаемые непосредственно или после обработки из организма млекопитающих, получают способами согласно настоящему изобретению и могут секретироваться клетками в культуральную среду.

Способ согласно настоящему изобретению может быть использован в культуре различных клеток. В одном варианте реализации изобретения культивируемые клетки представляют собой

эукариотические клетки, такие как клетки растений и/или животных. Клетки могут быть клетками млекопитающих, клетками рыб, клетками насекомых, клетками-амфибий или клетками птиц. Большое количество различных клеточных линий млекопитающих, пригодных для роста в культуре, доступны в Американской коллекции типовых культур (Манассас, штат Вирджиния) и других депозитариях, а также у коммерческих поставщиков. Клетка, которая может использоваться в способах согласно изобретению, включает, но не ограничивается ими, клетки МК2.7, клетки PER-C6, клетки яичника китайского хомячка (CHO), такие как CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12:555-556; Kolkekar et al., 1997, *Biochemistry*, 36:10901-10909; и WO 01/92337 A2), дигидрофолатредуктаза-негативные клетки CHO (CHO/-DHFR, Urlaub and Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216), и клетки dp12.CHO (патент США №. 5721121); клетки почек обезьян (CV1, ATCC CCL-70); клетки почек обезьян CV1, трансформированные SV40 (клетки COS, COS-7, ATCC CRL-1651); клетки НЕК 293 и клетки Sp2/0, клетки гибридомы 5L8, клетки Дауди, клетки EL4, клетки HeLa, клетки HL-60, клетки K562, клетки Jurkat, клетки THP-1, клетки Sp2/0, первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, эпителиальные клетки шейки матки, эпителиальные клетки бронхов, эпителиальные клетки трахеи, эпителиальные клетки почек и эпителиальные клетки сетчатки) и установленные клеточные линии и их штаммы (например, человеческие эмбриональные почечные клетки (например, клетки 293 или 293 клетки, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59), клетки почки детеныша хомячка (ВНК, ATCC CCL-10), сертолиевы клетки мыши (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251); клетки рака шейки матки человека (HELA, ATCC CCL-2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL-34); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL-75); клетки гепатомы человека (HEP-G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL-51); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL-1442); клетки TRI (Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68); клетки MCR 5; клетки FS4; клетки сетчатки PER-C6, клетки

MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Нер-2, клетки KB, клетки LS 180, клетки LS 174Т, клетки NCI-H-548, клетки RPMI 2650, клетки SW-13, клетки T24, WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-1, клетки LLC-MK<sub>2</sub>, клетки клон М-3, клетки 1-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки LLC-PK<sub>1</sub>, клетки PK (15), клетки GH<sub>1</sub>, клетки GH<sub>3</sub>, клетки L2, клетки LLC-RC 256, клетки MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub>, клетки ХС, клетки MDOК, клетки VSW и клетки TH-I, клетки В1 или их производные), фибробластные клетки из любой ткани или органа (включая, но не ограничиваясь ими, сердце, печень, почку, толстую кишку, кишечник, пищевод, желудок, ткань нервной системы (мозг, спинной мозг), легкое, сосудистую ткань (артерию, вену, капилляр), лимфоидную ткань (лимфатические узлы, аденоиды, миндалины, костный мозг и кровь), линии клеток селезенки, фибробластов и фибробласто-подобных клеток, TRG-2, IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки цитруллинемии, клетки Демпси, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки MiCl<sub>1</sub>, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T3, клетки F9, клетки SV-T2, клетки M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C<sub>3</sub>H/10T1/2, клетки HSDM<sub>1</sub>C<sub>3</sub>, клетки KLN205, клетки McCoy, L-клетки мыши, клетки штамма 2071 (мышь L), LM-клетки (мышь L), L-MTK (мышь L), NCTC-клоны 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1 Швейцарские/3T3-клетки, клетки индийского мунтака, клетки SIRC, клетки CII и клетки Йенсена или их производные) или любой другой тип клеток, известный специалисту в данной области техники.

Клетки могут быть пригодны для адгезивной, монослойной или суспензионной культуры, трансфекции и экспрессии белков, например, антител. Клетки могут использоваться с периодическим, полунепрерывным и проточным или непрерывным культивированием.

### Типы клеточных культур

Для целей понимания, но без ограничения, специалисту в данной области техники будет понятно, что клеточные культуры и циклы культивирования для продуцирования белка могут включать три общих типа, а именно, периодическую или расширенную периодическую культуру, периодическую культуру с подпиткой, перфузионную культуру или их комбинации. В периодической культуре клетки первоначально культивируют в среде, и эту среду не удаляют, не заменяют или не дополняют, то есть клетки не «питаются» свежей средой во время или до окончания цикла культивирования. Желаемый продукт собирают в конце цикла культивирования.

Для периодических культур с подпиткой время культивирования увеличивается за счет добавления питательной среды один или более раз (или непрерывно) свежей средой во время культивирования, т.е. клетки «питаются» новой средой («подпиточной средой») в течение периода культивирования. Полунепрерывные культуры могут включать различные режимы питания и времени, например, ежесуточно, через сутки, каждые двое суток и т.д., более одного раза в сутки или менее одного раза в сутки и так далее. Кроме того, полунепрерывные культуры могут непрерывно подкармливаться питательной средой. Затем желаемый продукт можно собирать в конце цикла культивирования/продукции.

Проточная культура, иногда называемая непрерывной культурой, представляет собой культуру клеток, в которой культура клеток получает свежую перфузионную среду и где отработанная среда удаляется из биореактора во время цикла. Перфузия свежих сред в культуру клеток и удаление расходуемых сред может быть непрерывной, ступенчатой, прерывистой или комбинацией любого или всех из них. Скорости перфузии могут варьировать от менее одного рабочего объема в сутки до многих рабочих объемов в сутки.

Термин «скорость потока перфузии» представляет собой количество питательной среды, которая пропускается через (добавление и удаление) биореактор, и, как правило, выражается

как некоторая часть или кратное от рабочего объема за определенный момент времени. Скорость потока перфузии может изменяться в течение времени цикла клеточной культуры. «Рабочий объем» относится к объему биореактора, используемого для культивирования клеток. В одном варианте реализации изобретения скорость потока перфузии меньше или равна одному рабочему объему в сутки. Перфузионная питательная среда может быть приготовлена для максимизации концентрации перфузионных питательных веществ, чтобы минимизировать скорость перфузии.

Предпочтительно клетки сохраняются в культуре и отработанная питательная среда, которая удаляется, практически не содержит клеток или содержит значительно меньшее количество клеток, чем культура. Рекомбинантные белки, экспрессируемые клеточной культурой, также могут быть сохранены в культуре для последующего сбора или удалены с использованной средой.

Перфузию можно осуществить несколькими способами, включая центрифугирование, седиментацию или фильтрование, см., например. Voisard et al., (2003), *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. В одном варианте реализации изобретения используется способ фильтрации. Фильтры включают мембранные фильтры, керамические фильтры и металлические фильтры, и могут иметь любую форму, включая спиральную или трубчатую, или в виде листа. Один или более фильтров могут быть соединены посредством жидкостной связи с биореактором совместно или независимо, последовательно или параллельно.

Полые волоконные фильтры могут использоваться в проточной культуре клеток млекопитающих для удерживания клеток и/или рекомбинантного белка. Когда в фильтр вводят клеточную культуру, включая клеточные культуральные среды, клетки (цельные и лизированные), растворимые экспрессированные рекомбинантные белки, белки клеток-хозяев, продукты жизнедеятельности и т.п., в зависимости от размера пор или отсежки молекулярной массы (MWC0) полый волокнистый материал может удерживать определенные компоненты клеточной культуры на стороне просвета (внутри) и пропускать определенные компоненты через фильтр (пермеат) в зависимости от размера пор или отсежки

по молекулярной массе материала из полого волокна. Материал, который удерживается (ретентат), возвращается в биореактор. Свежую перфузионную среду для культивирования клеток добавляют в биореактор, а пермеат отбирают из фильтра с заранее установленными интервалами или непрерывно для поддержания желаемого или постоянного объема биореактора. Пермеат может быть отброшен, храниться в резервуарах-хранилищах, мешках или в больших емкостях или перенесен непосредственно в другую стадию процесса, такую как фильтрация, флокуляция, центрифугирование и/или другие способы очистки ниже по циклу или тому подобное. Полые волокна для микрофильтрации обычно имеют размер пор в диапазоне от 0,1 мкм до 5-10 мкм или отсекают молекулярную массу от 500 кДа или более и могут использоваться для пропускания белка в пермеат. Ультрафильтрационные полые волокна обычно имеют размер пор от 0,01 мкм до 0,1 мкм или отсекают молекулярную массу 300 кДа или менее и могут использоваться для удержания желаемого белка в ретентате и возврата его обратно в биореактор. Это может быть использовано, например, для концентрирования рекомбинантного белкового продукта для сбора. Такие фильтры имеются в продаже, такие как Xampler UFP-750-E-4MA, Xampler UFP-30-E-4MA, (GE Healthcare, Питтсбург, штат Пенсильвания) и модули Midikros TC T02-E030-10, T02-050-10, T02-E750-05, T02-M10U-06 (Spectrum Laboratories, Inc, Домингес, штат Калифорния).

Культуру клеток можно вывести из биореактора и ввести в фильтр с помощью насосной системы, которая прокачивает клеточную культуру через просветную сторону полого волокна. Примеры систем перекачивания клеток включают перистальтические насосы, двухдиафрагменные насосы, насосы с низким усилием сдвига (Levitronix® pumps, Цюрих, Швейцария) и системы чередования тангенциальных потоков (ATF™, Refine Technology, Пайн-Брук, штат Нью-Джерси, См., например, патент США № 6544424; Furey (2002) Gen. Eng. News. 22 (7), 62-63). Пермеат может быть извлечен из фильтров с помощью перистальтических насосов. В предпочтительном варианте реализации изобретения



перфузия осуществляется с использованием системы чередования тангенциальных потоков.

#### Процессы клеточной культуры

Культуру клеток можно содержать в условиях для получения рекомбинантных белков в малых и больших масштабах с использованием культуральных сосудов и/или культуральных аппаратов, которые обычно используются для культивирования клеток животных или млекопитающих. Как хорошо известно специалистам в данной области техники, чашки для тканевой культуры, Т-колбы и роллерные колбы обычно используются в лабораторном масштабе. Для культивирования в более крупномасштабном оборудовании, таком как, но не ограничиваясь ими, устройства для культивирования в резервуарах ферментерного типа, устройства для культивирования с воздушным подъемом, биореакторы с псевдооживленным слоем, биореакторы с полыми волокнами, культуры роллер-флаконов, системы биореактора с мешалкой, культуральные аппараты с уплотнённым слоем (racked bed type) и одноразовые мешки одноразового использования или любое другое подходящее средство, известное специалисту в данной области техники. Микроносители могут использоваться с системами роллер-флаконов или биореакторов с мешалкой. Системы могут работать в периодическом, периодическом с подпиткой или перфузионном/непрерывном режиме. Кроме того, культуральный аппарат или система могут быть оборудованы дополнительным устройством, таким как сепараторы клеток, с использованием фильтров, силы тяжести, центробежной силы и т.п.

Получение рекомбинантных белков может быть осуществлено в многофазных культуральных процессах. При многостадийном способе клетки культивируют в две или более фаз. Например, клетки могут быть культивированы сначала в одной или нескольких фазах роста, в условиях среды, которые максимизируют клеточную пролиферацию и жизнеспособность, затем переводят в фазу продуцирования, в условия, которые максимизируют продукцию белка. В коммерческих процессах производства рекомбинантного белка с помощью клеток млекопитающих, существует несколько, например, по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более фаз роста, которые

происходят в разных культуральных сосудах (от N-х до N-1), предшествующих конечной производственной культуре. Фазы роста и продуцирования могут предшествоваться или разделяться одной или несколькими переходными фазами. Фаза продуцирования может проводиться в крупных масштабах.

Термин «фаза роста» клеточной культуры относится к периоду экспоненциального роста клеток (то есть логарифмической фазе), где клетки обычно быстро делятся. Клетки поддерживают на фазе роста в течение около одних суток или около двух суток, или около трех суток, или около четырех суток, или более четырех суток. Продолжительность времени, в течение которого клетки поддерживаются на фазе роста, будет варьировать, например, в зависимости от типа клетки и/или скорости роста клетки и/или условий культивирования.

Термин «переходная фаза» относится к периоду времени между фазой роста и фазой продукции. Как правило, переходная фаза представляет собой время, в течение которого условия культивирования могут контролироваться для поддержки перехода от фазы роста к фазе продукции. Различные параметры клеточной культуры, которые могут контролироваться, включают, но не ограничиваются ими, один или более из следующих параметров: температура, pH, осмоляльность, витамины, аминокислоты, сахара, пептоны, аммоний, соли и т.п.

Термин «фаза продукции» клеточной культуры относится к периоду времени, когда клеточный рост имеет плато. Обычно логарифмический рост клеток заканчивается до или во время этой фазы, и начинается продуцирование белка. Процессы культивирования в периодических с подпиткой и перфузионных клеточных культурах дополняют клеточную культуральную среду или обеспечивают свежую среду для достижения и поддержания требуемой плотности, жизнеспособности и титра продукта на этой стадии. Фаза продуцирования может проводиться в крупных масштабах. Крупномасштабное культивирование может быть проведено в объеме по меньшей мере около 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10,000, 15,000, 20,000 литров. В

варианте реализации изобретения фаза продукции проводится в биореакторах объемом 500 л, 1000 л и/или 2000 л.

Обычно клеточные культуры, которые предшествуют конечной производственной культуре, проходят через две предшествующие фазы, стадию засева и стадию подготовки инокулятов. Стадия засева (N-X) имеет место в небольшом масштабе, где клетки быстро размножаются. Во время стадии подготовки инокулятов (N-1) клетки дополнительно делятся для получения инокулята для продуцирующего биореактора, такого как инокуляты по меньшей мере  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл. Стадия засева и N-1 могут быть получены любым методом культивирования, как правило, при помощи периодической культуры клеток. Плотность клеток N-1  $\geq 0,5 \times 10^5$  клеток/мл типична для посевных биореакторов. Более высокие плотности N-1 клеток могут уменьшать или даже устранять время, необходимое для достижения желаемой плотности клеток в продуцирующем биореакторе. Предпочтительным способом для достижения более высоких плотностей N-1 клеток является перфузионная культура с использованием фильтрации с чередованием тангенциального потока. Культура клеток N-1, выращенная с помощью перфузионного процесса с использованием фильтрации чередующегося тангенциального потока, может обеспечивать клетки с любой требуемой плотностью, такой как плотность  $> 90 \times 10^6$  клеток / мл или более. Культуру клеток N-1 можно использовать для получения одной посевной культуры инокуляции или ее можно использовать в качестве фондовой культуры посевного материала, которую поддерживают для инокуляции множественных биореакторов. Плотность инокуляции клеток может иметь положительное влияние на уровень продуцируемого рекомбинантного белка. Уровни продукта, как правило, увеличиваются с увеличением плотности посева. Улучшение в титре связано не только с более высокой концентрацией инокуляционного материала, но, вероятно, будет зависеть от метаболизма и стадии клеточного цикла клеток, который помещен в производственный процесс. В одном из вариантов реализации изобретения клеточная культура формируется путем инокуляции биореактора по меньшей мере  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл.

Термин «плотность клеток» означает количество клеток в заданном объеме питательной среды. «Плотность жизнеспособных клеток» относится к количеству живых клеток в единице объема питательной среды, как определено стандартной методикой определения жизнеспособности (например, методом исключения красителя трипанового синего). Термин «объем осажденных клеток» (PCV), также упоминается как «процентный объем осажденных клеток» (% PCV), представляет собой отношение объема, занимаемого клетками, к общему объему клеточной культуры, выраженное в процентах (см., Stettler, et al., (2006) *Biotechnol Bioeng.* Dec 20:95(6):1228-33). Объем осажденных клеток представляет собой функциональный показатель плотности клеток и диаметра клеток; увеличение объема осажденных клеток может возникнуть в результате увеличения либо плотности клеток, либо диаметра клеток или и того и другого. Объем осажденных клеток является мерой содержания твердого вещества в культуре клеток.

#### Контроль клеточной культуры

Условия культивирования клеток, подходящие для способов согласно настоящему изобретению, являются такими, которые обычно используются и известны для периодического, периодического с подпиткой или проточного (непрерывного) культивирования клеток, или любой комбинации этих способов с уделением внимания рН, растворенному кислороду ( $O_2$ ) и диоксиду углерода ( $CO_2$ ), перемешиванию, влажности, и температуре. Во время продуцирования рекомбинантного белка желательно иметь контролируруемую систему, в которой клетки выращивают в течение желаемого времени или до желаемой плотности, а затем физиологическое состояние клеток переключается на высокопродуктивное состояние с ограничением или остановкой роста, в котором клетки используют энергию и субстраты для продуцирования рекомбинантного белка вместо увеличения плотности клеток. Для культивирования клеток в промышленном масштабе и производства биологических терапевтических средств очень желательна возможность ограничивать или останавливать рост клеток и возможность поддерживать клетки в состоянии с

ограничением или остановкой роста во время фазы продукции. К таким способам относятся, например, температурные сдвиги, использование химических индукторов продуцирования белка, ограничение питательных веществ или голодание и ингибиторы клеточного цикла либо отдельно, либо в комбинации.

Одним из таких механизмов ограничения или остановки роста является сдвиг температуры во время клеточной культуры. Температурные сдвиги могут возникать в любое время во время культивирования клеток. Фаза роста может протекать при более высокой температуре, чем стадия продуцирования. Культуру клеток можно культивировать при первой заданной температуре от около 35 °С до около 38 °С, а затем температуру сдвигают до второго заданного значения температуры от около 29 °С до около 37 °С, необязательно от около 30 °С до около 36 °С или от около 30 °С до около 34 °С. В одном варианте реализации изобретения сдвиг температуры может происходить во время перехода между фазой роста и фазой продукции. В другом варианте осуществления сдвиг температуры может происходить во время фазы продукции.

Изменение заданного значения температуры может быть выполнено вручную или может быть выполнено автоматически с использованием систем управления биореактором. Заданное значение температуры может изменяться в заданное время или в ответ на один, или несколько параметров клеточной культуры, таких как плотность клеток, титр или концентрация одного или более компонентов среды. В одном из таких способов используется встроенный в систему управления биореактором интерактивный инструмент для контроля биомассы, который запускает изменение заданного значения температуры при достижении требуемой плотности клеток. Например, емкостный зонд биомассы может использоваться для оценки плотности клеток в режиме онлайн, а данные онлайн-измерений могут использоваться для запуска сдвига температуры биореактора. Такие емкостные зонды включают емкостный датчик Fogale (DN12-200) (Ним, Франция).

Могут добавляться химические индукторы продуцирования белка, такие как кофеин, бутират и/или гексаметилен бисацетамид (НМВА), независимо от, во время, до или после температурного

сдвига. Если индукторы добавляются после изменения температуры, то они могут быть добавлены от одного часа до пяти суток после изменения температуры, опционально от одного до двух суток после изменения температуры. Клеточные культуры могут затем поддерживаться в течение нескольких суток или даже недель, в то время как клетки продуцируют нужный белок(и).

Другой способ поддержания клеток в желаемом физиологическом состоянии заключается в индукции остановки роста клеток путем воздействия на культуру клеток низкими содержанием L-аспарагина (см., например, публикацию ВОИС № WO 2013/006479). Замедление роста клеток может быть достигнуто и поддерживаться через культуральную среду, которая содержит ограничивающую концентрацию L-аспарагина и путем поддержания низкой концентрации L-аспарагина в культуре клеток. Поддержание концентрации L-аспарагина при 5 мМ или менее можно использовать для поддержания клеток в состоянии задержки роста.

Ингибиторы клеточного цикла представляют собой соединение, известное или предполагаемое в качестве регулятора прогрессии клеточного цикла, и связанных с ним процессов транскрипции, репарации ДНК, дифференцировки, старения и апоптоза, связанных с этим, и также полезного для индукции остановки роста клеток. Ингибиторы клеточного цикла, которые взаимодействуют с циклическим механизмом, такие как циклинзависимые киназы (CDK), являются пригодными, как и те молекулы, которые взаимодействуют с белками из других путей, таких как АКТ, mTOR и другие пути, которые прямо или косвенно влияют на клеточный цикл.

#### Сбор и очистка

Экспрессируемые рекомбинантные белки могут секретироваться в культуральную среду, из которой они могут быть извлечены и/или собраны. Затем рекомбинантные белки могут быть подвергнуты одной или более стадиям обработки, включающим сбор, очистку, эндотоксиновую и/или вирусную инактивацию/фильтрацию и/или ультрафильтрацию/диафильтрацию.

Экспрессированные рекомбинантные белки могут быть захвачены в собранном пермеате. Белки могут быть очищены или частично очищены из собранного пермеата сбора с использованием

процессов и коммерчески доступных продуктов, известных в данной области и/или доступных от коммерческих поставщиков. Такие способы включают флокуляцию, центрифугирование, преципитацию, методы фильтрации, такие как глубинная фильтрация, хроматографии, включая аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию смешанного типа, хроматографию гидрофобного взаимодействия и гидроксипатитную хроматографию, среди других доступных способов.

Очищенные белки могут быть затем «сформированы», что означает замену буферного раствора, стерилизацию, упаковку для оптовой продажи и/или упаковку для конечного потребителя. Пригодные препараты для фармацевтических композиций известны в данной области и включают те, которые описаны в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

#### Аналитические методики процесса

Аналитические технологии процесса и методы доступны для слежения за и оценки образцов, взятых во время процессов культивирования клеток и очистки, для количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и производственного процесса. Эта информация в реальном времени или потоковая информация могут использоваться для контроля и/или управления параметрами продукта и производства, такими как титр, плотность клеток; характеристиками качества продукта, такими как посттрансляционные модификации; изменчивость продукта или процесса, такие как примеси и т.п., чтобы принимать своевременные решения и, при необходимости, модифицировать процессы.

Контроль каждого предыдущего этапа процесса культивирования клеток или последующего процесса очистки может обеспечить информацию о величине определенной характеристики качества продукта (PQA) и управлять этим PQA с заданной целью и диапазоном.

Образцы могут быть взяты с перерывами, с желаемой частотой или непрерывно. Образцы могут быть проанализированы в реальном

времени или почти в реальном времени или могут сохраняться для последующего анализа. Эта информация может использоваться для внесения изменений во время процессов предшествующих и последующих процессов.

Обнаружение характеристики качества продукта может быть выполнено с использованием масс-спектрометрии, жидкостной хроматографии при помощи УФ- и/или масс-спектрометрического детектирования и капиллярного электрофореза, и т.п.

Эти процессы можно адаптировать к непрерывному контролю с ручными или автоматическими корректировками процесса, такими как подпитка, температура, длительность процесса, определяемые уровнем указанной характеристики качества продукта.

Анализ интактной массы для обнаружения присутствия посттрансляционных модификаций, таких как процессинг аминокислот и гликозилирование, может быть осуществлен с использованием колонки полигидроксиаспартамида, работающей в режиме исключения по размеру, и в сочетании с ЭРИ-МС (Brady et al., (2008) J Am Soc Mass Spectro, 19: 502-509)

Контроль в режиме реального времени элюируют с помощью ионообменной хроматографии, контролируя нормализованное отношение ЖХ/УФ для каждой фракции с использованием детектора лазерного рассеяния света и УФ-поглощения, см. Публикацию патента США № US 2013-0303732.

Многоатрибутный метод использует единичную жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию (ЖХ/МС) для поиска и характеристики tandemных данных МС с использованием различных баз данных и поисковых платформ, таких как Sequest (Научно-исследовательский институт Скриппса, Ла Холла, штат Калифорния), X!Tandem (The Global Proteome Machine Organization) или Mascot (Matrix Science, Бостон, Массачусетс). Образцы можно денатурировать при высоком рН или поддерживать изоформы дисульфида и защищенные сукцинимидные варианты при низком рН. Образец затем восстанавливают и алкилируют с последующей ферментацией трипсином. Затем образец вводят в МС (например, масс-спектрометр Q Exactive™ Hybrid Quadrupole Orbitrap, Thermo Fischer Scientific, Волтэм, штат Массачусетс)



и выполняют анализ с использованием программного обеспечения Pinpoint (Thermo Fischer Scientific). Характеристики, которые можно идентифицировать, количественно оценивать и контролировать, включают изомеризацию, дезаминирование, восстановление дисульфидов, загрязнение белками клетки-хозяина, мутации, ошибочные включения, гидроксизин, тиоэфир, негликозилированные тяжелые цепи, C-терминальное амидирование, остаточный белок А, характеризуют гликаны и обеспечивают идентичность молекул. Точность массы для каждой отслеживаемой характеристики может быть установлена на уровне менее 5 частей на миллион от прогнозируемой массы. Идентификация пептида/характеристики подтверждается методами фрагментации MS2 и ортогональной характеризации (например, HILIC-MS (Жидкостная хроматография, основанная на гидрофильном взаимодействии-МС) для гликозилирования). Экспериментальное изотопное распределение должно иметь показатель точечного продукта лучше, чем 0,95 по сравнению с теоретическим изотопическим распределением. Для каждой характеристики устанавливается окно временного хранения, и для количественного определения учитываются все определяемые состояния заряда для каждой характеристики. Определяется критерий, определяющий изменения в характеристике. Например, дезаминирование можно контролировать, определяя значение дезаминирования (дезаминированный пептид, деленный на сумму дезаминированного пептида и немодифицированного исходного пептида, умноженный на 100). Гликозилирование можно контролировать, сравнивая каждый конкретный гликан с суммой всех детектируемых гликанов.

#### Белки

Используемые в настоящем документе термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются как взаимозаменяемые и относятся к молекуле, состоящей из двух или более остатков аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Пептиды, полипептиды и белки также включают модификации, включающие, без ограничения, гликозилирование, приводящее к образованию гликопротеинов, присоединение липидов, сульфатацию,

гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксигликозилирование и АДФ-рибозилирование.

Используемый в настоящем документе термин «гликопротеин» относится к пептидам и белкам, имеющим по меньшей мере одну боковую цепь олигосахарида, содержащую остатки маннозы. Гликопротеины могут быть гомологичными клетке-хозяину, или могут быть гетерологичными, т. е. привнесенными в используемую клетку-хозяина, такие как, например, человеческий гликопротеин, продуцируемый клетками-хозяевами яичника китайского хомячка (CHO). Такие гликопротеины, как правило, называют «рекомбинантные гликопротеины». В некоторых вариантах реализации изобретения, гликопротеины, экспрессируемые клеткой-хозяином секретируются непосредственно в среду.

Белки могут иметь научный или коммерческий интерес, включая, лекарства, основанные на белках. Белки включают, среди прочего, антитела и химерные белки. Пептиды, полипептиды и белки могут быть получены из рекомбинантной линии клеток животных с использованием методов культуры клеток и могут упоминаться как «рекомбинантный пептид», «рекомбинантный полипептид», «рекомбинантный белок», «рекомбинантный гликопротеин». Экспрессированный белок (белки) может быть продуцирован внутриклеточно или секретироваться в питательную среду, из которой он может быть восстановлен и/или собран.

Неограничивающие примеры белков млекопитающих, которые могут быть с успехом продуцированы способами согласно настоящему изобретению, включают белки, содержащие аминокислотные последовательности, идентичные или по существу аналогичные полностью или частично одному из следующих белков: фактор некроза опухолей (ФНО), лиганд *flt3* (WO 94/28391), эритропоэтин, тромбопоэтин, кальцитонин, ИЛ-2, ангиопоэтин-2 (Maisonpierre et al. (1997), *Science* 277(5322): 55-60), лиганд рецептора-активатора фактора транскрипции каппа В (RANKL, WO 01/36637), фактор некроза опухоли (ФНО)-связанный апоптозиндуцирующий лиганд (TRAIL, WO 97/01633), тимусный стромальный лимфопоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор

(GM-CSF, патент Австралии № 588819), фактор роста тучных клеток, фактор роста стволовых клеток (Патент США № 6204363), эпидермальный фактор роста, фактор роста кератиноцитов, фактор роста и развития мегакариоцитов, цитокин А5, человеческий фибриноген-подобный белок второго типа (FGL2; номер доступа NCBI NM\_00682; Rüegg and Pytela (1995), Gene 160:257-62) гормон роста, инсулин, инсулинотропин, инсулиноподобный фактор роста, паратиреоидный гормон, интерферон, включая  $\alpha$ -интерферон,  $\gamma$ -интерферон, а также консенсусные интерфероны (патенты США № 4695623 и 4897471), нейротрофический ростовой фактор, нейротрофический фактор головного мозга, изоформы белков синаптоагмина (SLP 1-5), нейротрофин-3, глюкагон, интерлейкины, колониестимулирующие факторы, лимфотоксин- $\beta$ , фактор, ингибирующий лейкемию, и онкостатин-М. Описания белков, которые могут быть получены в соответствии с предлагаемыми способами, можно найти, например, в, Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, all volumes (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); и The Cytokine Handbook, Vols. 1 and 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

Дополнительно способы согласно настоящему изобретению были бы полезны для получения белков, содержащих всю или часть аминокислотной последовательности рецептора для любого из указанных выше белков, антагониста таких рецепторов или какой-либо из указанных выше белков, и/или белков по существу сходных с такими рецепторами или антагонистами. Эти рецепторы и антагонисты включают: обе формы рецептора фактора некроза опухоли (РФНО, обозначенные как р55 и р75, патент США № 5395760 и патент США № 5610279), рецепторы интерлейкина-1 (ИЛ-1) (типы I и II; европейский патент № 0460846, патент США № 4968607 и патент США № 5767064,), антагонисты рецептора ИЛ-1 (патент США № 6337072), антагонисты или ингибиторы ИЛ-1 (патенты США № 5981713, 6096728 и 5075222) рецепторы ИЛ-2, рецепторы ИЛ-4 (европейский патент № 0367566 и патент США № 5856296),

рецепторы ИЛ-15, рецепторы ИЛ-17, рецепторы ИЛ-18, рецепторы Fc, рецептор гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора, рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, рецепторы для онкостатина-М и фактора, ингибирующего лейкоз, рецептор-активатор ядерного фактора (NF)-каппа В (RANK, WO 01/36637 и патент США № 6271349), остеопротегерин ( патент США № 6015938), рецепторы для TRAIL (включая TRAIL-рецепторы 1, 2, 3 и 4), а также рецепторы, которые содержат домены смерти, такие как Fas или апоптозиндуцирующий рецептор (AIR).

Другие белки, которые могут быть получены с использованием настоящего изобретения, включают белки, содержащие все или часть из аминокислотных последовательностей антигенов дифференциации (называемых белками CD), или их лиганды или белки по существу аналогичные любому из них. Такие антигены описаны в Leukocyte Typing VI (*Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996*). Подобные CD белки обсуждаются в соответствующих практикумах. Примеры таких антигенов включают CD22, CD27, CD30, CD39, CD40, и лиганды к ним (лиганд CD27, лиганд CD30, и др.). Некоторые из CD-антигенов являются членами семейства рецепторов ФНО, которое также включает 41BB и OX40. Лиганды нередко являются членами семейства ФНО, как и лиганд 41BB и лиганд OX40.

Ферментативноактивные белки и их лиганды также могут быть получены с использованием настоящего изобретения. Примеры включают белки, содержащие все или часть из следующих белков или их лигандов или белка по существу аналогичного к одному из этих: дезинтегрину и представителям семейства доменов дизинтегрина и металлопротеиназам, включая ФНО-альфа конвертирующий фермент, различным киназам, глюкоцереброзидазе, супероксиддисмутазе, тканевому активатору плазминогена, фактору VIII, фактору IX, аполипопротеину Е, аполипопротеину А-I, глобинам, антагонисту ИЛ-2, альфа-1-антитрипсину, лигандам любого из указанных выше ферментов, а также множеству других ферментов и их лигандов.

Термин «антитело» включает ссылки как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса или на их антигенсвязывающую область, которая конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное, включает человеческие, гуманизированные, химерные, мультиспецифические, моноклональные, поликлональные, а также олигомеры или их антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, включены белки, имеющие антигенсвязывающий фрагмент или участок, такой, как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, диатела, Fd, dAb, макситела, молекулы одноцепочечных антител, фрагменты участка, определяющего комплементарность (CDR), scFv, диатела, триатела, тетратела и полипептиды, содержащие по меньшей мере часть иммуноглобулина, которая является достаточной для выработки специфического антигена связывающего целевой полипептид. Термин «антитело» включает, без ограничения, те, которые получены, экспрессированы, созданы или изолированы для рекомбинантных целей, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела.

Примеры антител включают, без ограничения, те, которые распознают любой один или комбинацию белков, включая, без ограничения, вышеупомянутые белки и/или следующие антигены: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD32, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-7, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, субъединица p35 ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-21, ИЛ-23, субъединица p19 ИЛ-23, общая субъединица p40 ИЛ-12/ИЛ-23, субъединицы рецептора ИЛ-2, рецептора ИЛ-4, рецептора ИЛ-6, рецептора ИЛ-13, рецептора ИЛ-17, рецептора ИЛ-18, FGL2, PDGF- $\beta$  и их аналоги (см. патенты США № 5272064 и 5149792), B7RP-1, B7RP-2, VEGF, TGF, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 1, c-fms, рецептор ЭФР (см. патент США № 6235883), рецептор CGRP (кальцитонин-ген-связанного пептида), рецептор VEGF (фактора роста сосудистого эндотелия), фактор роста гепатоцитов, пропротеин-конвертаза субтилизин/кексин тип 9 (PCSK9), FGF21, остеопротегерин-лиганд, интерферон гамма, EGFRvIII, стимулятор В-лимфоцитов (BlyS,

также известный как BAFF, THANK, TALL-1 и zTNF4; см. Do and Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1): 19-25), ST2, комплемент C5, IgE, опухолевый антиген CA125, опухолевый антиген MUC1, антиген PEM, LCG (который является продуктом гена, который экспрессируется в сочетании с раком легкого), HER-2, HER-3, опухолеассоциированный гликопротеин TAG-72, антиген SK-1, опухолеассоциированные эпитопы, которые присутствуют в повышенных количествах в сыворотках пациентов с раком толстой кишки и/или поджелудочной железы, ассоциированные с раком эпитопы или белки, экспрессируемые на клетках рака молочной железы, толстой кишки, сквамозных клеток, предстательной железы, поджелудочной железы, легкого и/или почки, и/или на клетках меланомы, глиомы или нейробластомы, некротическое ядро опухоли, интегрин альфа 4 бета 7, интегрин VLA-4, интегрин B2, TSLP, ИФН $\gamma$ , рецепторы TRAIL 1, 2, 3 и 4, RANK, лиганд RANK, ФНО- $\alpha$ , молекула адгезии VAP-1, молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), межклеточная молекула адгезии-3 (ICAM-3), ангиопоэтин 1 (Ang1), ангиопоэтин 2 (Ang2), адгезин лейкоинтегрин, тромбоцитарный гликопротеин  $\alpha$  IIb/IIIa, тяжелая цепь миозина сердца, паратиреоидный гормон, rNAPc2 (который представляет собой ингибитор фактора VIIa-тканевого фактора), ГКГС I, карциноэмбриональный антиген (CEA), альфа-фетопропротеин (AFP), фактор некроза опухоли (ФНО), CTLA-4 (который представляет собой цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген), белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), лиганд запрограммированной клеточной гибели 1 (PDL-1), лиганд запрограммированной клеточной гибели 2 (PDL-2), ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3), Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и муциновый домен 3 (TIM3), рецептор Fc- $\gamma$ -1, HLA-DR 10 бета, антиген HLA-DR, склеростин, L-селектин, респираторно-синцитиальный вирус, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (HBV), *Streptococcus mutans*, и *Staphylococcus aureus*. Конкретные примеры известных антител, которые могут быть получены с использованием способов согласно настоящему изобретению, включают, без ограничений, адалимумаб, алирокумаб, бевацизумаб, инфликсимаб, абциксимаб, алектумумаб,

бапинеизумаб, базиликсимаб, белимумаб, бриакинумаб, бродалумаб, канакинумаб, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, конатумумаб, деносумаб, дупилилумаб, экулизумаб, гемтузумаб гузелкумаб, озогамидин, голимумаб, ибритутомаб иксекизумаб, липилимумаб, тиуксетан, лабетузумаб, лебрикизумаб, мапатумумаб, маврилимумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, муромонаб-CD3, ниволумаб, натализумаб, нимотузумаб, офатумумаб, омализумаб, ореговомаб, паливизумаб, панитумумаб, пемтумомаб, пертузумаб, пембролизумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, ромосозумаб ровелизумаб, рилотумумаб, тилдракизумаб, тоцилизумаб, тозитумомаб, тралокинумаб, трастузумаб, тремелимумаб, устекинумаб, ведолизумаб, залутумумаб и занолимумаб.

Настоящее изобретение также может быть использовано для получения гибридных рекомбинантных белков, содержащих, например, любой из вышеуказанных белков. Например, гибридные рекомбинантные белки, содержащие один из указанных выше белков плюс домен мультимеризации, такой как лейциновая застёжка, суперспираль, Fc-область иммуноглобулина, или по существу подобные белку, могут быть получены с использованием способов согласно настоящему изобретению. См., например, WO94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262:1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371:80-83; Nåkansson et al. (1999), Structure 7:255-64. В частности, включая среди других рекомбинантных химерных белков, белки, в которых участок рецептора представляет собой слитый с Fc участком антитела, таким как этанерцепт (p75 TNFR:Fc) и белатацепт (CTLA4:Fc). Химерные белки и полипептиды, а также фрагменты или участки, или мутанты, варианты, аналоги какого-либо из вышеупомянутых белков и полипептидов входят также в пригодные белки, полипептиды и пептиды, которые могут быть получены способами настоящего изобретения. Они включают требананиб, ангиопоэтин (Ang) 1 и 2 нейтрализующее пептитело. Также включены биспецифические T-клеточные агенты (BiTE), которые проявляют избирательное действие и направляют иммунную систему человека к действию против опухолевых клеток. Конкретно

среди таких ViTE выделяют нацеленные на CD19, такие как блинатумомаб. Другие молекулы включают афлиберцепт.

Хотя терминология, используемая в настоящей заявке является стандартной в данной области техники, определения некоторых терминов приведены в настоящем документе, чтобы придать ясность и определенность значению формулы изобретения. Единицы, приставки и символы могут быть обозначены в их общепринятой форме системы СИ. Числовые диапазоны, указанные в данном документе, рассчитаны с учетом чисел, определяющих диапазон, и включают и используют всякое целое число в пределах заданного диапазона. Способы и методики, описанные в данном документе, как правило, выполняются в соответствии с общепринятыми способами хорошо известными в данной области техники и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем документе, если не указано иное. См., например, Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) and Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Все документы или части документов, процитированные в настоящей заявке, включая, без ограничений, патенты, заявки на патенты, статьи, книги и трактаты, тем самым явным образом включены посредством ссылки. То, что описано в варианте реализации настоящего изобретения, может быть объединено с другими вариантами реализации настоящего изобретения.

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами реализации, описанными в данном документе, которые предназначены в качестве иллюстрации отдельных аспектов настоящего изобретения и функционально эквивалентных способов и компонентов, находящихся в пределах объема настоящего изобретения. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе, станут понятными для специалистов



в данной области техники из приведенного выше описания и прилагаемых графических материалов. Такие модификации предназначены для того, чтобы находиться в пределах объема приложенной формулы изобретения.

### **Примеры**

#### Клеточная культура

На 0 сутки клетки СНО, экспрессирующие рекомбинантное антитело против ФНО- $\alpha$ , инокулировали в 3 л биореакторы (Applikon, Фостер Сити, штат Калифорния) при  $9,0 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл бессывороточной, химически заданной базовой среды. Культивирование осуществляли при 36 °С, DO при 30 мм рт.ст., перемешивание при 400 об/мин. Культуры клеток инициировали в полупериодическом режиме, а перфузию начинали на 3-й день, используя систему фильтрации с чередующимися тангенциальными потоками ATF-2™ (Refine Technologies, Ганновер, штат Нью-Джерси), снабженную картриджем из полых волокон 30 кДа NFWC GE RTP (GE Healthcare, Питтсбург, штат Пенсильвания). Среда представляла собой бессывороточную химически заданную перфузионную среду, содержащую моногидрат сульфата марганца и пентагидрат сульфата меди и рН, как описано в Таблице 1. Эксперимент проводился в двух повторностях.

**Таблица 1**

<b>рН</b>	<b>Mn<sup>2+</sup> (нМ)</b>	<b>Cu<sup>2+</sup> (частей на миллиард)</b>
6,85	50	10
6,85	50	100
6,85	1000	10
6,85	1000	100
7,0	50	10
7,0	50	100
7,0	1000	10
7,0	1000	100

Скорость перфузии постепенно увеличивалась с 0,3 до 1,0 рабочего объема/сутки в течение цикла культивирования. На сутки

температуру сдвигали до 31 °С и культуру собирали на 17-е сутки. Глюкозу поддерживали между 4-8 г/л.

Для оценки культуры ежедневно брались пробы. pH и парциальное давление CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) и O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>) измеряли с использованием анализатора газов крови Rapid Lab 1260 (Siemens, Малверн, штат Пенсильвания); концентрации глюкозы и лактата, измеряли с использованием NovaFLEX (Nova Biomedical, Волтэм, штат Массачусетс). Осмоляльность определяли осмометром модели 2020 (Advanced Instruments, Норвуд, штат Массачусетс). Температуру, pH, растворенный кислород и перемешивание контролировали с использованием контроллеров Applikon ADI1010.

На 7, 10, 13, 15 и 17 сутки 50 мл образцы культуры изымали из биореакторов для анализа качества продукта. Образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре (Beckman Coulter, Индианаполис, штат Индианаполис), и супернатант фильтровали через фильтр с 0,2 мкм трубкой сверху (Corning, Fisher Scientific, Питтсбург, штат Пенсильвания). Затем свободный супернатант клеток замораживали при -20 °С до оттаивания и очищали белком А до анализа качества продукта. По завершении 17-суточного производства оставшуюся культуру удаляли из биореакторов. Клетки отделяли от надосадочной жидкости центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 минут при 4 °С и кондиционированную культуральную среду стерильно фильтровали, используя 0,2 мкм полиэфирсульфоновый (PES) фильтровали в бутылки Nalgene (Fisher Scientific, Питтсбург, штат Пенсильвания), затем очищали белком А и нейтрализованными элюатами, испытывали, как описано выше.

Плотность жизнеспособных клеток и жизнеспособность клеток были сдержаны при помощи Vi-Cell (Beckman Coulter, Бри, штат Калифорния). Интегрированную жизнеспособную плотность клеток (IVCD) рассчитывали как совокупную жизнеспособную плотность клеток на протяжении всего продуцирования. Титр измеряли с использованием белка А POROS® (Life Technologies, Гранд-Айленд, штат Нью-Йорк). Титр определяли в надосадочной жидкости и затем корректировали объем, который занимали клетки, так что он представлял собой то, что фактически присутствовало в данном

объеме жидкости клеточной культуры. Поскольку объем осажденных клеток выражали в процентах от общего объема, титры, скорректированные с помощью PCV, всегда были ниже, чем титр в супернатанте.

Различные виды N-гликанов анализировали с помощью жидкостной хроматографии с гидрофильным взаимодействием (HILIC) и представляли в виде процента от общей площади пиков комбинированных гликанов. Образцы, содержащие антитела, собирали и очищали с помощью белка А. Очищенные образцы обрабатывали ПНГазой-F и инкубировали при 37 °C в течение 2 часов для высвобождения N-связанных гликанов. Ферментативно высвобожденные гликаны метили 2-аминобензойной кислотой (2-AA) при 80 °C в течение 75 минут. Избыток 2-AA метки затем удаляли с помощью картриджа Glycosclean S. Образцы выпаривали в течение ночи, а полученный сухой осадок восстанавливали водой для последующего анализа HILIC с использованием UPLC (Waters Corporation, Милфорд, штат Массачусетс). Гликаны инъецировали и связывали с колонкой в высоких органических условиях, и элюировали с возрастающим градиентом водного буферного раствора формиата аммония. Обнаружение флуоресценции использовали для контроля элюирования гликанов и вычисляли относительный процент основных и второстепенных гликанов. Уровни  $\beta$ -галактозы включают A1G1F, A2G1F, A2G2F и аналогичные афукозилированные формы. Афукозилированные формы включают A1G0, A2G0, A1G1, A2G1 и A2G2. Были также определены манноза 5 и манноза 7.

Данный эксперимент был разработан для определения эффектов каждого из основных факторов (меди, марганца и pH) и двухсторонних взаимодействий. Эксперимент состоял из трех факторов: полного факториала с двумя уровнями ( $2^3$ ) для определения основных эффектов и двухстороннего взаимодействия, и не включал центральные точки. Исследование предназначалось для получения значений мощности около 0,8 при использовании отношения сигнал/шум, равного 1,25. Профили создавались с использованием статистического программного обеспечения JMP и Prediction Profiler (SAS Institute, Inc., Кэри, Северная Каролина).

## Результаты

Концентрация меди и марганца в перфузионной среде не влияла на производительность или продуктивность культуры клеток. Хотя рН не влиял на рост клеток или производительность, рН 6,85 снижал конечную жизнеспособность на приблизительно 10 % ( $p < 0,001$ ), Фиг. 1-4.

### Высокоманнозные гликаны

рН являлся единственным фактором, который оказал значительное влияние на уровни высокоманнозных гликанов. По мере увеличения рН, так же увеличивался и уровень высокоманнозных гликанов, см. Таблицу 2.

### $\beta$ -галактозилирование

Добавление марганца увеличивает  $\beta$ -галактозилирование. Чем больше концентрация марганца, тем больше процент  $\beta$ -галактозилирования. рН также оказывает статистически значимое влияние на  $\beta$ -галактозилирование. Увеличение рН увеличивало  $\beta$ -галактозилирование, но в меньшей степени, чем по сравнению с увеличением, когда добавляли марганец, см. Фиг. 5. Влияние меди на  $\beta$ -галактозилирование было незначительным.

### Афукозилирование

Медь, марганец и рН все оказывали статистически значимое влияние на уровни афукозилирования. Чем больше концентрация меди и марганца и чем выше рН, тем выше уровень афукозилирования, см. Фиг. 6.

На все ключевые гликаны значительное влияние оказывает рН. На  $\beta$ -галактозилирование значительное влияние оказывает увеличение концентрации марганца. Увеличение уровня содержания марганца до его наивысшего уровня приводило к увеличению  $\beta$ -галактозилирования на приблизительно 14 % по сравнению с исходным значением – наименьшим уровнем меди и марганца, испытанном при том же значении рН, что определялось статистическим моделированием. Значительное влияние на афукозилирование оказало увеличение концентраций меди и марганца. Увеличение уровня содержания меди и марганца увеличило уровень афукозилирования на приблизительно 1,3 % по сравнению с величиной исходного значения. Хотя добавление

высоких концентраций меди и марганца не оказало влияния на характеристики культуры клеток, они действительно влияли на качество продукта. См. Таблицы 2 и 3

Таблица 2. Результаты сбора на 17 сутки

<b>Mn<sup>2+</sup></b> <b>(нМ)</b>	<b>Cu<sup>2+</sup></b> <b>(частей</b> <b>на</b> <b>миллиард)</b>	<b>pH</b>	<b>Афукозили</b> <b>рование</b> <b>(%)</b>	<b>Высокоманноз</b> <b>ные гликаны</b> <b>(%)</b>	<b>β-</b> <b>галактозили</b> <b>рование</b> <b>(%)</b>
50	10	6,85	4,24	2,69	16,14
50	10	7,00	5,19	3,55	18,71
50	100	6,85	4,83	2,54	16,09
50	100	7,00	5,93	3,32	21,90
1000	10	6,85	4,94	2,63	30,79
1000	10	7,00	6,26	3,21	35,14
1000	100	6,85	5,46	2,53	29,31
1000	100	7,00	6,59	3,36	32,93

Таблица 3. Сводная информация по усредненной модели (R<sup>2</sup>) и статистическая значимость условий, которые являются частью модели (значения p).

Параметр	Откорректи- рованный R <sup>2</sup>	Высокий	Высокий	Высокий
		pH	Mn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
		Значения	Значения	Значения
		P	P	P
β- галактозилирование	0,95	0,0028	<0,0001	--
Афукозилирование	0,92	<0,0001	<0,0001	0,0028
Высокоманнозные гликаны	0,93	<0,0001	--	--

Обозначение «Высокий» относится к ситуации, когда pH или другие факторы выше, чем различные типы гликозилирования.

Гликозилирование может влиять на терапевтическую эффективность лекарственных средств на основе рекомбинантных белков. Хорошо известно, что вариации гликозилирования Fc могут влиять на Fc-опосредованные эффекторные функции. Афукозилирование и высокоманнозные гликаны могут усиливать

активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Для использования в анализе ADCC афукозилированное и фукозилированное рекомбинантное антитело против ФНО- $\alpha$  получали отдельно, используя периодический процесс с подпиткой. Афукозилированное антитело получали с помощью добавленного ингибитора фукозилтрансферазы. Полученное рекомбинантное антитело было на около 85 % афукозилировано. Афукозилированный материал антитела затем смешивали с полностью фукозилированным материалом антитела для получения определенных уровней афукозилирования в конечной смеси антител. Материал антитела затем использовали для измерения уровня активности ADCC при различных уровнях афукозилирования для определения чувствительности ответа ADCC.

ADCC-активность смеси антител оценивали в клеточном анализе с использованием клеток CHO M7, которые стабильно экспрессировали трансмембранный ФНО- $\alpha$  в качестве клеток-мишеней ФНО- $\alpha$  конвертирующего фермента (TACE) в качестве резистентной формы. Клетки NK92-M1, стабильно трансфицированные человеческим CD16 (Fc $\gamma$ RIIIa-158V), использовали в качестве эффекторных клеток. Вкратце, клетки-мишени опсонизировали с увеличением концентраций (от 0,143 нг/мл до 40 нг/мл) антитела до совместной инкубации с эффекторными клетками NK92-M1/CD16. После ADCC-опосредованного лизиса клеток-мишеней внутриклеточный фермент аденилаткиназа высвобождался в культуральную среду клетки. Количество выделяемой аденилаткиназы измеряли с использованием набора для биоанализа ToxiLight™ (Lonza, Аллендаль, штат Нью-Джерси). Применяли SoftMax® Pro (Molecular Devices, Саннивейл, штат Калифорния) для выполнения 4-параметрического анализа данных и ограниченной модельной кривой, соответствующей данным о дозах-ответах. Активность тестируемого образца определяли путем сопоставления ответа тестовой пробы с ответом, полученным для эталонного стандарта, и сообщалось об относительной цитотоксичности в процентах.

Для использования в анализе комплементарной цитотоксичности (CDC),  $\beta$ -галактозилированный материал был

получен из хроматографически обогащенной фракции рекомбинантного антитела против ФНО- $\alpha$ . Обогащенное антитело использовали для получения растворов с определенными уровнями  $\beta$ -галактозилирования. Затем измеряли уровень активности CDC при различных уровнях  $\beta$ -галактозилирования для установления чувствительности CDC-ответа.

Степень CDC-активности, вызванной антителом, оценивали в функциональном анализе на основе клеток. Клетки CHO M7 предварительно инкубировали с 20 мкМ кальцеина-AM (Sigma, Сент-Луис, штат Миссури). Кальцеин-AM поступает в клетки и расщепляется неспецифическими эстеразами, чтобы стать флуоресцентным и захваченным внутри неповрежденных клеточных мембран. Целевые клетки, загруженные кальцеином, инкубировали с различными дозовыми концентрациями антитела (от 1,563 нг/мл до 200 нг/мл) с последующим добавлением комплемента (2,5 % конечной концентрации) для второй инкубации.

После инкубации комплемента супернатант удаляли, а флуоресценцию измеряли с использованием микропланшет-ридера (EnVision, Perkin Elmer, Волтэм, штат Массачусетс). Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству клеточного лизиса. Применяли SoftMax<sup>®</sup> Pro (Molecular Devices, Саннивейл, штат Калифорния) для выполнения 4-параметрического анализа данных и ограниченной модельной кривой, соответствующей данным о дозах-ответах. Активность тестируемого образца определяли путем сопоставления ответа тестовой пробы с ответом, полученным для эталонного стандарта, и сообщалось об относительной цитотоксичности в процентах.

Повышение уровня афукозилирования всего на 2 % оказало практическое влияние на активность ADCC (Фиг.7). На активность CDC также явно влияло повышение уровня  $\beta$ -галактозилирования, хотя ответ был намного менее чувствительным (Фиг.8).

Эффективные функции ADCC и CDC могут быть критическими факторами для клинической активности терапевтических белков, и достижение целевых значений для определенных гликанов может быть ключевым для достижения желаемых клинических результатов. Небольшие изменения в афукозилировании могут оказать большое

влияние на активность ADCC гликопротеина. Изменяя содержание меди и марганца, можно контролировать уровни гликанов, которые отвечают за эти эффекторные функции, и управлять качеством продукта.



**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ управления содержанием фукозилированных гликанов в рекомбинантном белке, включающий

Инокулирование биореактора клетками-хозяевами млекопитающих, экспрессирующими рекомбинантный белок,

культивирование клеток-хозяев в бессывороточной, химически заданной клеточной культуральной среде;

причем клеточная культуральная среда содержит от 10 до 100 частей на миллиард меди и от 50 до 1000 нМ марганца,

сбор рекомбинантного белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий повышение уровня  $\beta$ -галактозилирования рекомбинантного белка.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация меди составляет 100 частей на миллиард.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация марганца составляет 1000 нМ.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что содержание фукозилированных гликанов регулируют для воздействия на эффекторную функцию рекомбинантного белка.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий температурный сдвиг.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что температурный сдвиг составляет сдвиг с 36 °С до 31 °С.

8. Способ по п. 6, отличающийся тем, что температурный сдвиг происходит при переходе между фазой роста и фазой продуцирования.

9. Способ по п. 6, отличающийся тем, что температурный сдвиг происходит во время фазы продуцирования.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что клетка-хозяин, экспрессирующая рекомбинантный белок культивируется в периодической культуре, периодической культуре с подпиткой, проточной культуре или их комбинации.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что культура представляет собой перфузионную культуру.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что перфузия

включает непрерывную перфузию.

13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что скорости перфузии является постоянной.

14. Способ по п. 11, отличающийся тем, что перфузия осуществляется со скоростью меньшей или равной 1,0 рабочему объему в сутки.

15. Способ по п. 11, отличающийся тем, что перфузия достигается путем чередования тангенциальных потоков.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что биореактор имеет объем, равный по меньшей мере 500 л.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что биореактор имеет объем, равный от по меньшей мере 500 л до 2000 л.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что биореактор имеет объем, равный от по меньшей мере 1000 л до 2000 л.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что биореактор инокулирован по меньшей мере  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что бессывороточная химически заданная клеточная культуральная среда представляет собой перфузионную клеточную культуральную среду.

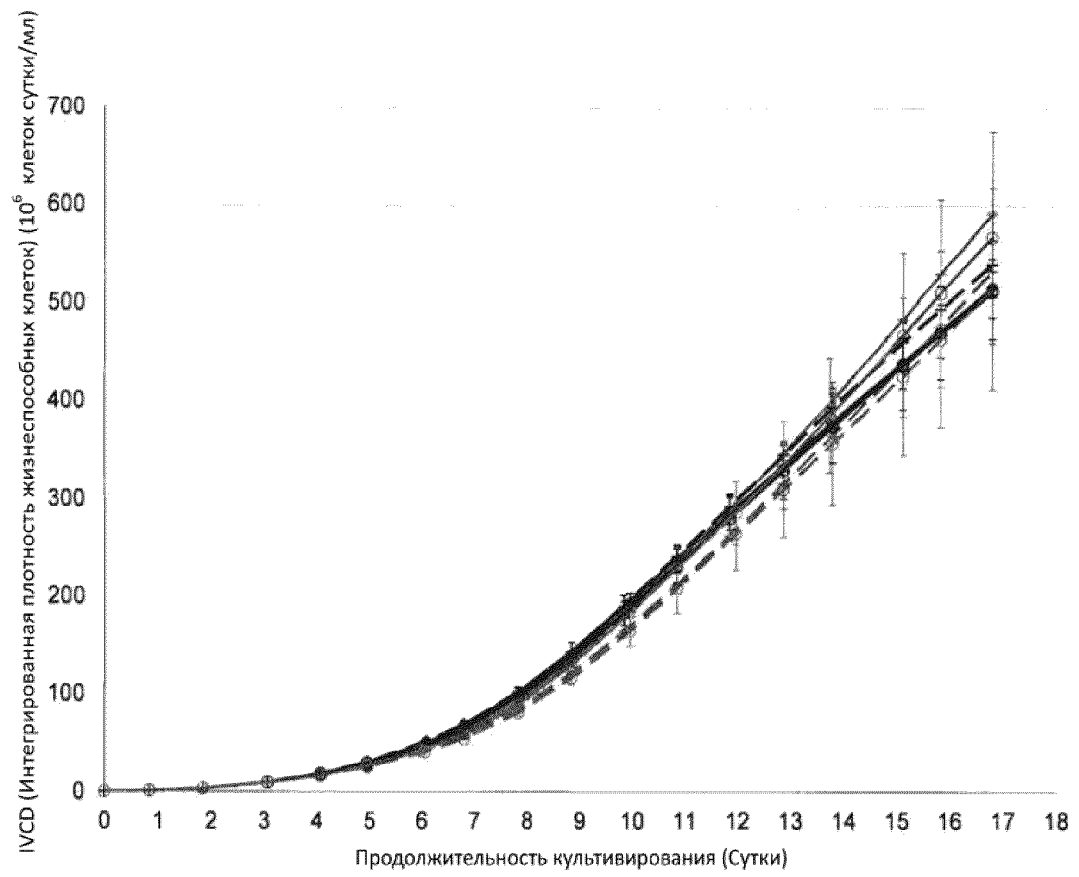
21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что клетки-хозяева представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO).

22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рекомбинантный белок представляет собой гликопротеин.

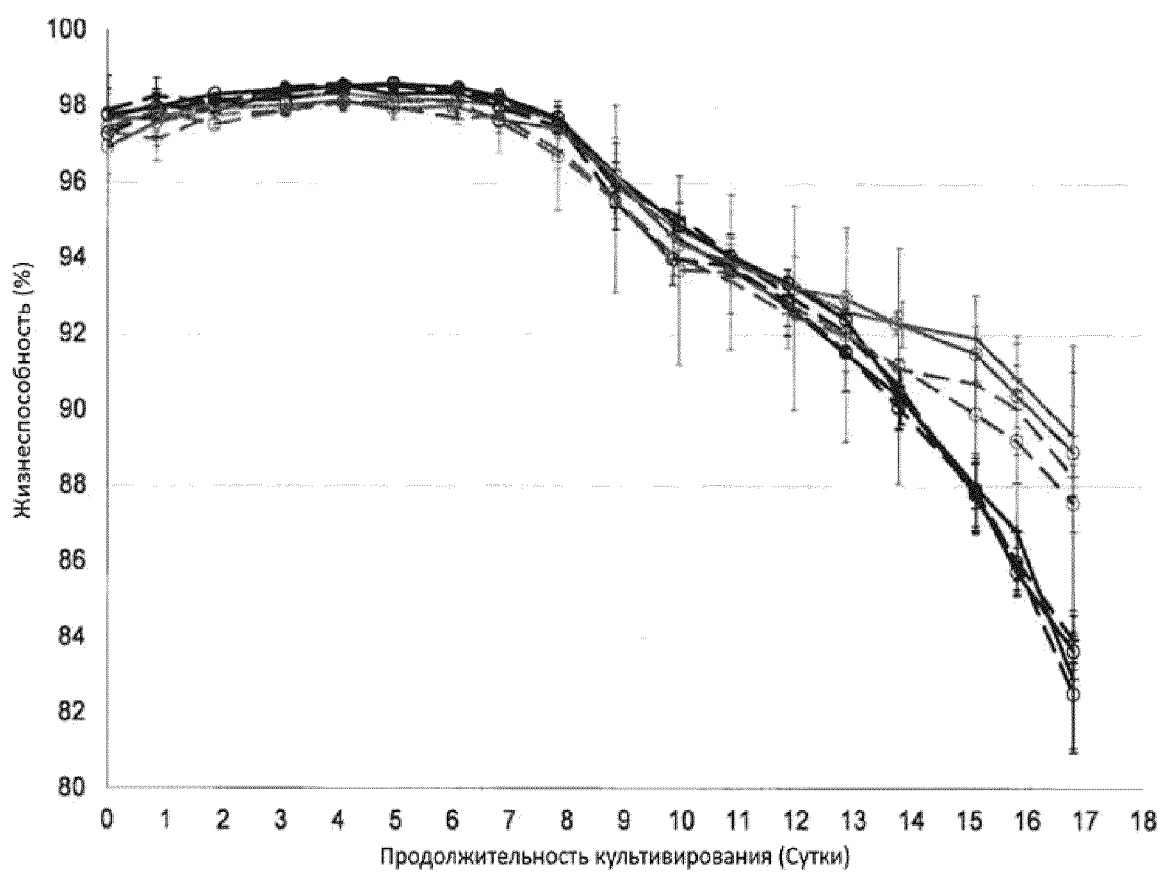
23. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного химерного белка или цитокина.

24. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рекомбинантный белок, продуцированный клеткой-хозяином, является очищенным и предоставлен в составе фармацевтически приемлемой лекарственной формы.

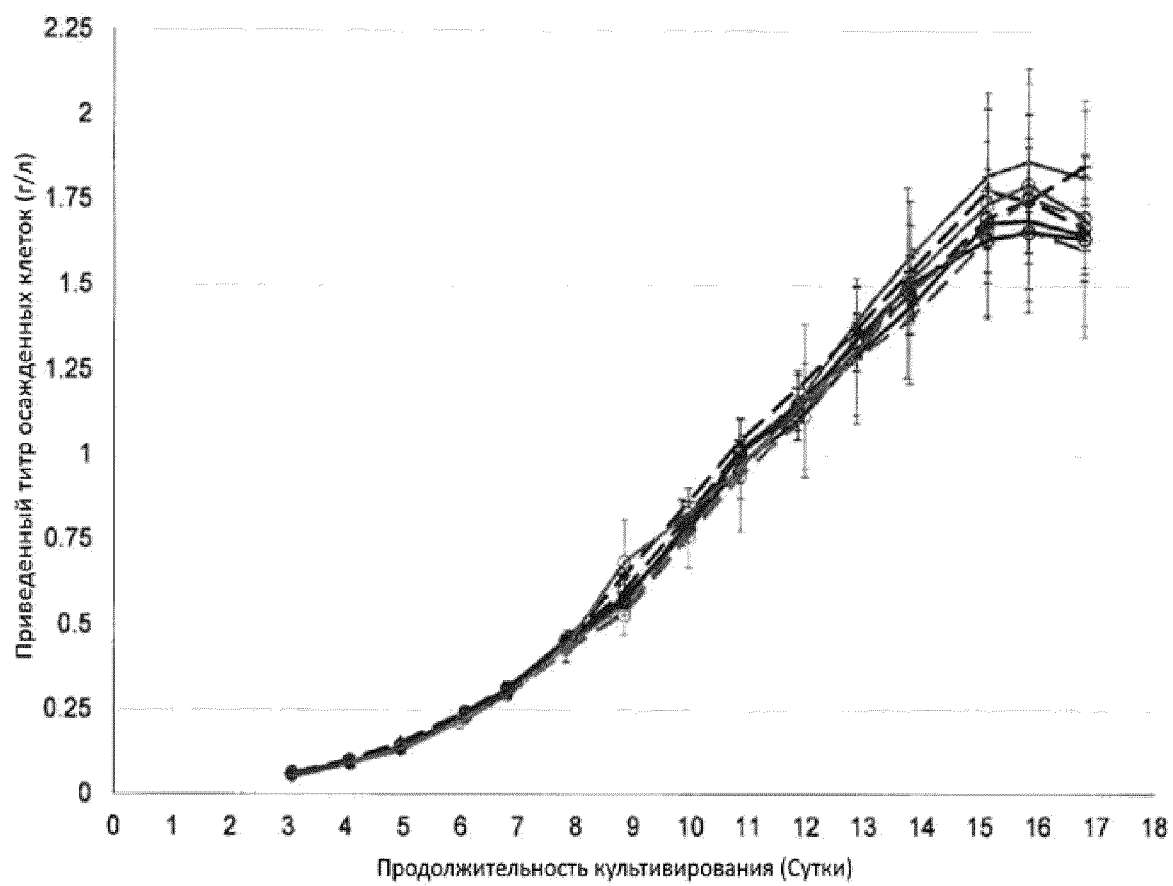
По доверенности



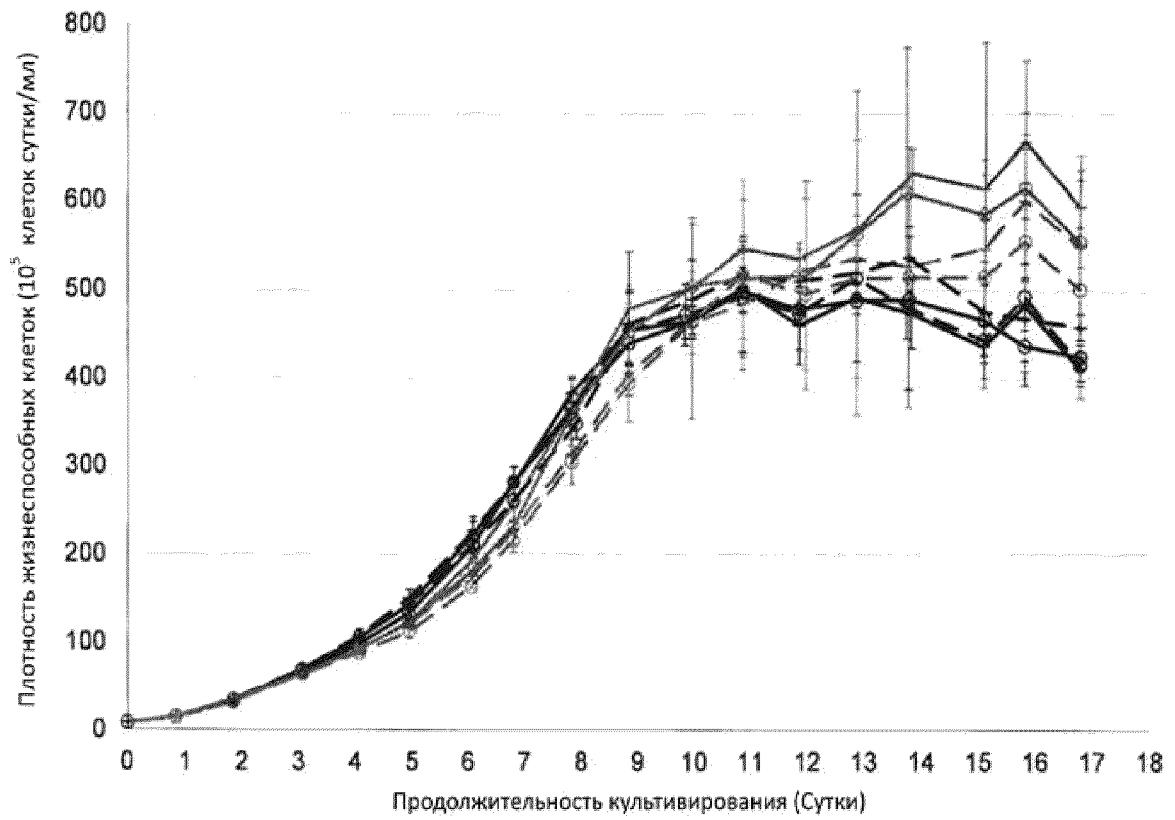
Фиг. 1



Фиг. 2

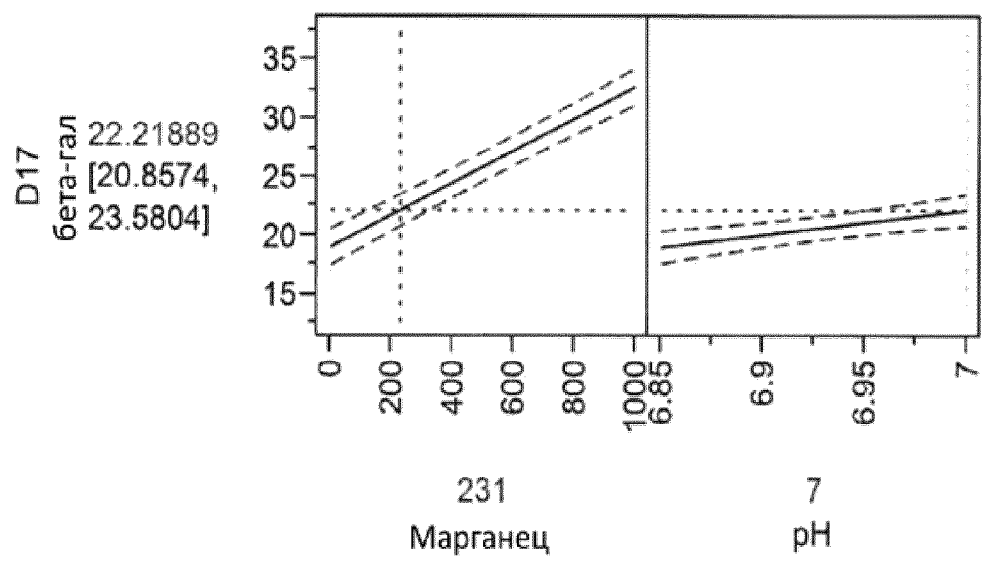


Фиг. 3

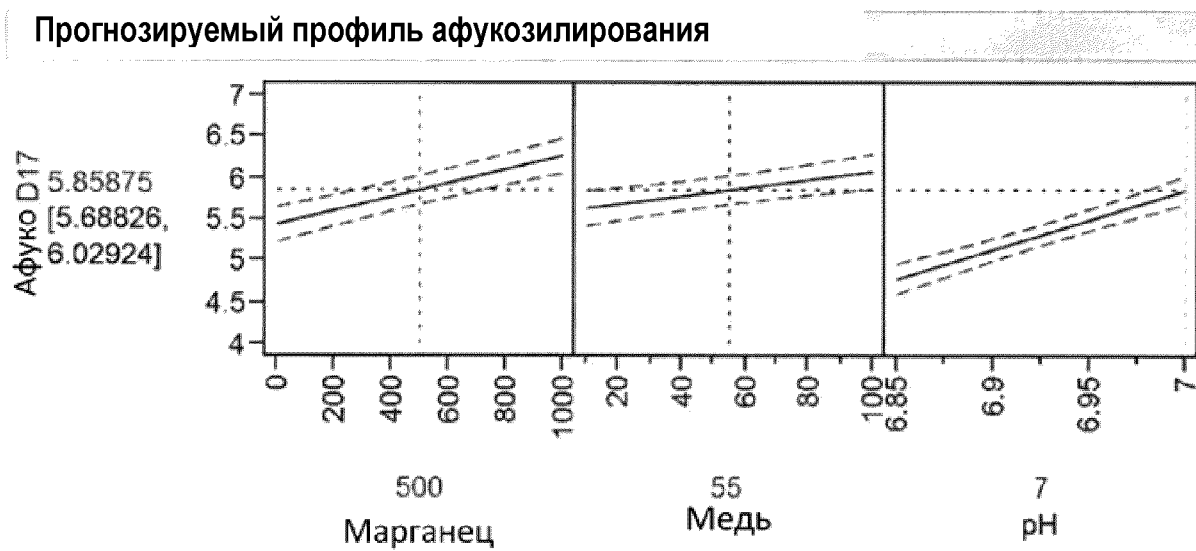


Фиг. 4

### Прогнозируемый профиль бета-галактозилирования



Фиг. 5



Фиг. 6





Фиг. 7



Фиг. 8