

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091689** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2020.10.22**

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.01.28**

**(54) СИСТЕМА И СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИМЕСЕЙ,  
ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ СОБОЙ ВАРИАНТЫ, ОТЛИЧАЮЩИЕСЯ ПО РАЗМЕРУ  
И ЗАРЯДУ, В ПРОДУКТЕ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕМ СОБОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЕ  
СРЕДСТВО**

(31) **62/624,366**

(72) Изобретатель:  
**Ванг Шунхай (US)**

(32) **2018.01.31**

(33) **US**

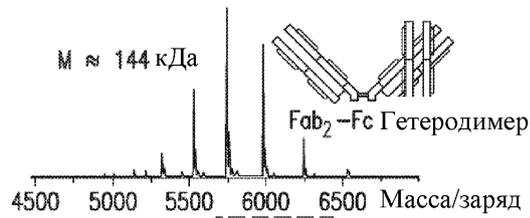
(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(86) **PCT/US2019/015359**

(87) **WO 2019/152303 2019.08.08**

(71) Заявитель:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(57) Предусмотрены системы и способы определения характеристик примесей, представляющих собой варианты, отличающиеся по размеру и заряду, в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство.



**202091689**

**A1**

**A1**

**202091689**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563470EA/018

### **СИСТЕМА И СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИМЕСЕЙ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ СОБОЙ ВАРИАНТЫ, ОТЛИЧАЮЩИЕСЯ ПО РАЗМЕРУ И ЗАРЯДУ, В ПРОДУКТЕ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕМ СОБОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в целом направлено на способы разделения белков и способы культивирования клеток.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Моноклональные антитела (mAb) успешно использовались для применения в широком диапазоне терапевтических областей в течение последних двух десятилетий (Walsh G., Biopharmaceutical benchmarks 2014, Nature biotechnology 2014; 32:992-1000; Lawrence S. Billion dollar babies--biotech drugs as blockbusters. Nature biotechnology 2007; 25:380-2).

Гетерогенность антител известна из уровня техники. Например, низкомолекулярные (LMW) соединения и высокомолекулярные (HMW) соединения являются примерами связанных с продуктом примесей, которые вносят вклад в гетерогенность по размеру продуктов на основе mAb. Образование HMW соединений в продукте, представляющем собой терапевтическое лекарственное средство на основе mAb, в результате агрегации белка может потенциально поставить под угрозу как эффективность продукта, так и его безопасность. Протеолитические фрагменты также могут вносить вклад в профиль примесей продукта.

Хотя mAb обладают консервативной ковалентной гетеротетрамерной структурой, состоящей из двух тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью, каждая из которых ковалентно связана посредством дисульфидной связи с легкой цепью, эти белки часто содержат низкие уровни связанных с продуктом примесей даже после стадий глубокой очистки. Низкомолекулярные соединения (LMW) (например, фрагменты Fab и мономер без плеча Fab) и высокомолекулярные соединения (HMW) (например, тример mAb и димер mAb) являются примерами связанных с продуктом примесей, которые вносят вклад в гетерогенность по размеру продуктов на основе mAb. Образование HMW-соединений в продукте, представляющем собой терапевтическое лекарственное средство на основе mAb, в результате агрегации белка может потенциально поставить под угрозу как эффективность продукта, так и его безопасность (например, вызывая нежелательный иммуногенный ответ) (Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. The AAPS journal 2006; 8:E501-7; Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Narhi LO, et al. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. Journal of Pharmaceutical Sciences 2016; 105:417-30). LMW-соединения любого терапевтического белка могут являться результатом протеазной активности клетки-хозяина во время продуцирования. LMW-соединения часто характеризуются низкой или существенно

сниженной активностью по сравнению с мономерной формой антитела, в то же время подвергаясь воздействию новых эпитопов, которые могут приводить к иммуногенности или потенциально влиять на фармакокинетические свойства *in vivo* (Vlasak J, Ionescu R. Fragmentation of monoclonal antibodies. *mAbs* 2011; 3:253-63). В результате и HMW соединения, и LMW соединения считаются критическими качественными признаками, которые регулярно контролируются во время разработки лекарственного средства и в качестве части тестирования готовой продукции очищенного лекарственного вещества во время изготовления.

Гетерогенность по молекулярной массе продуктов на основе mAb традиционно характеризуется многими ортогональными аналитическими способами (Michels DA, Parker M, Salas-Solano O. *Electrophoresis* 2012; 33:815-26). Одной из наиболее часто используемых методик оценки чистоты продукта на основе mAb является SDS-PAGE, осуществляемая в невозстанавливающих условиях. Во время анализа можно обычно наблюдать и количественно определять минорные полосы, соответствующие LMW соединениям, включая соединения H2L (2 тяжелые цепи и 1 легкая цепь), H2 (2 тяжелые цепи), HL (1 тяжелая цепь и 1 легкая цепь), HC (1 тяжелая цепь) и LC (1 легкая цепь), в отношении антител (Liu H, Gaza-Bulseco G, Chumsae C, Newby-Kew A. *Biotechnology Letters* 2007; 29:1611-22).

Также могут наблюдаться протеолитические фрагменты. Предполагаемый идентификатор каждой минорной полосы может быть подтвержден с помощью N-концевого секвенирования посредством расщепления по Эдману, расщепления трипсином в геле с последующим масс-спектрометрическим анализом и вестерн-блоттинга с использованием антител к Fc и к легкой цепи. Однако любые предполагаемые структуры, полученные с помощью этих способов, не могут быть однозначно подтверждены на интактном уровне белка. Кроме того, в условиях подготовки образца, используемых в экспериментах SDS-PAGE, могут образовываться LMW-артефакты посредством перестановки дисульфидных связей, что может приводить к переоценке минорных LMW-соединений (Zhu ZC, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83:89-95 (2013)).

Совсем недавно капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (CE-SDS) стал современным эквивалентом SDS-PAGE, обеспечивающим превосходную воспроизводимость, чувствительность и пропускную способность (Rustandi RR, Washabaugh MW, Wang Y. *Electrophoresis*, 29:3612-20 (2013); Lacher NA, et al., *Journal of Separation Science*, 33:218-27 (2010); Hunt G, et al., *Journal of Chromatography A* 744:295-301 (1996)). Во время CE-SDS-анализа продуктов на основе mAb обычно могут наблюдаться минорные пики с более коротким временем миграции (LMW-формы), чем у интактного антитела. В отличие от SDS-PAGE-анализа эти LMW-примеси не могут быть извлечены или подвергнуты дальнейшему анализу. В результате идентификаторы LMW-примесей, наблюдаемые в способах CE-SDS, часто предлагаются исключительно на основе эмпирических знаний.

Точное измерение массы интактных белков mAb с помощью современных масс-спектрометров становится все более популярным в биофармацевтической промышленности как одна из самых надежных методик идентификации (Kaltashov IA, et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21:323-37 (2010); Zhang H, Cui W, Gross ML. *FEBS Letters*, 588:308-17 (2014)). В частности, различные способы «комбинированной хроматографии-масс-спектрометрии» продемонстрировали способность выявлять примеси с низкой интенсивностью в продуктах на основе mAb и обеспечивать очень подробные анализы, которые не могут быть достигнуты ни SDS-PAGE, ни CE-SDS способами (Le JC, Bondarenko PV. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*; 16:307-11 (2015); Habegger M, et al. *mAbs* 8:331-9 (2016)). Например, хроматография с обращенной фазой (RPLC) в сочетании с масс-спектрометрией может использоваться для выявления свободной легкой цепи и ассоциированных с ней посттрансляционных модификаций (например, цистеинилирование и глутатионилирование), присутствующих в продуктах, представляющих собой лекарственное средство на основе mAb. Однако по сравнению со способами SDS-PAGE и CE-SDS, RPLC часто не обладает достаточным разрешением для разделения LMW-соединений и, таким образом, не может выявить полный профиль LMW-соединений. Например, никогда не сообщалось об идентификации соединений H2L в продуктах, представляющих собой лекарственное средство на основе mAb, с помощью интактного массового анализа на основе RPLC из-за их низкой интенсивности и низкого разрешения от основного интактного антитела.

Другая методика на основе MS, которая является перспективной для определения характеристик примесей, связанных с продуктом на основе mAb, представляет собой масс-спектрометрию с нативной электрораспылительной ионизацией (Native ESI-MS), которая особенно информативна в сочетании с эксклюзионной хроматографией (SEC) (Habegger M, et al. *mAbs*; 8:331-339 (2016)). Тем не менее, LMW-соединения, идентифицированные в анализе с помощью нативной SEC-MS, часто не совпадают с теми, которые идентифицированы с помощью SDS-PAGE или CE-SDS, из-за существенно различающихся экспериментальных условий, используемых в этих способах. В частности, получение образца, необходимое для SDS-PAGE и CE-SDS, часто начинается с денатурации белка, когда нарушаются нековалентные связи между N-концевыми областями пар HC-LC и C-концевыми областями пар HC-HC. В результате LMW-примеси, такие как H2L, полуантитела и вещества в виде свободных легких цепей, способны диссоциировать от молекулы mAb, если межцепочечные дисульфидные связи разорваны.

Для сравнения, нативная SEC-MS анализирует образцы mAb в почти нативных условиях, позволяя сохранять сильные нековалентные межцепочечные связи и давая возможность сохранять четырехцепочечную структуру молекулы mAb, даже если межцепочечные дисульфидные связи разрываются. Хотя достижения в области химии колонок SEC сделали возможным использование денатурирующих буферов (например, 30% ацетонитрила, 0,1% FA и 0,1% TFA), которые обычно используются в хроматографии

с обращенной фазой, для разделения в SEC и прямого связывания с масс-спектрометрическим анализом в режиме реального времени (Liu H, Gaza-Bulsecu G, Chumsae C. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20:2258-64 (2009), разрешение LC все еще неоптимально для выявления многих LMW-соединений.

Целью настоящего изобретения является обеспечение систем и способов определения характеристик вариантов, отличающихся по размеру, примесей в белковом лекарственном средстве.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, со сниженными уровнями примесей.

Еще одной целью настоящего изобретения является предоставление способов получения продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, со сниженными уровнями примесей в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Предусмотрены системы и способы определения характеристик примесей, представляющих собой варианты, отличающиеся по размеру и заряду, в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления используется эксклюзионная хроматография (SEC) с водной подвижной фазой в сочетании с нативным масс-спектрометрическим анализом, чтобы выявить и определить характеристики вариантов, отличающихся по размеру, примесей в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство. В другом варианте осуществления используется ионообменная хроматография (IEX), предпочтительно сильная катионообменная хроматография с водной подвижной фазой в сочетании с нативным масс-спектрометрическим анализом с определением характеристик примесей в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления после удаления N-связанных гликанов из продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, например продукта, представляющего собой лекарственное средство на основе антитела, элюирование вариантов, отличающихся по размеру или заряду, примесей соответственно из колонки SEC или IEX определяется размером и/или зарядом соединения с определенной молекулярной массой.

Раскрыты системы и способы могут использоваться для определения характеристик вариантов, отличающихся по размеру, вариантов, отличающихся по заряду, связывания антитело-антиген, определения характеристик посттрансляционной модификации (PTM), определения характеристик частично восстановленного и алкилированного mAb, определения характеристик димера для комбинированных лекарственных средств, определения характеристик обмена Fab IgG4 и определения характеристик высокогетерогенного образца с использованием снижения заряда. Типичные PTM, которые могут быть выявлены и идентифицированы и которые вносят вклад в кислотные варианты, включают без ограничения гликирование,

глюкуронылирование, карбоксиметилирование, сиалилирование, неконсенсусное гликозилирование в Fab-области. PTM, которые могут быть выявлены и идентифицированы и которые вносят вклад в основные варианты, включают без ограничения образование сукцинимидов, N-концевой глутамин (не превращенный в пироглутамат), C-концевой Lys и негликозилированные/частично гликозилированные соединения.

Иллюстративные низкомолекулярные (LMW) примеси в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, которые можно выявить и охарактеризовать с помощью раскрытых систем, включают без ограничения предшественники, продукты разложения, усеченные соединения, протеолитические фрагменты, в том числе Fab, фрагменты лиганда или рецептора или фрагменты тяжелой цепи, свободную легкую цепь, полуантитело, H2L, H2, HL, HC или их комбинации.

Иллюстративные высокомолекулярные (HMW) примеси включают без ограничения тримеры mAb и димеры mAb.

Иллюстративные промежуточные HMW включают без ограничения мономер со сверхлегкими цепями (соединения H2L3 и H2L4), комплексы мономер плюс фрагменты Fab, Fab2-Fab2, Fc-Fc и Fab2-Fc.

Раскрытые системы и способы SEC-нативной MS и IEX-нативной MS предусматривают подробную информацию об идентификации вариантов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. Надежная идентификация и подробная структурная информация, полученная с помощью раскрытых систем и способов, очень важна для углубленного определения характеристик примесей в продуктах, представляющих собой белковое лекарственное средство, что часто требуется для разработки молекулы на поздней стадии. Кроме того, поскольку в раскрытых системах и способах используется более осторожное получение образцов, чем с помощью либо SDS-PAGE, либо CE-SDS, вероятность возникновения артефактов ниже. Раскрытые системы и способы могут использоваться в качестве полуквантитативного анализа для сравнения профилей примесей между образцами или могут быть просто применены качественно.

Один вариант осуществления предусматривает продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий белковое лекарственное средство и вспомогательное вещество, где продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит от 0,05 до 30,0% вес/вес примесей с низким значением молекулярной массы, высоким значением молекулярной массы, промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном средстве или их комбинации.

Предпочтительный вариант осуществления предусматривает продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий белковое лекарственное средство и вспомогательное вещество, где продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит от 0,05 до 30,0% вес/вес примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном

средстве.

Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, может представлять собой антитело, слитый белок, рекомбинантный белок или их комбинацию. В других вариантах осуществления продукт, представляющий собой лекарственное средство, содержит от 1 до 25%, от 1 до 15%, от 1 до 10% или от 1 до 5% вес/вес примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном средстве.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ определения характеристик вариантов, отличающихся по размеру или заряду, примесей в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, включающий стадии дегликозилирования образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, разделения белковых компонентов образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью SEC или IEX хроматографии и анализа выделенных белковых компонентов с помощью нативной масс-спектрометрии с определением характеристик вариантов, отличающихся по размеру или заряду, примесей в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, содержащихся в образце продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. Способ дополнительно предусматривает необязательную стадию восстановления. Образец продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, может быть получен из периодической культуры с подпиткой. Как отмечено выше, продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, может представлять собой антитело, слитый белок, рекомбинантный белок или их комбинацию.

Еще один вариант осуществления предусматривает способ получения антитела, включающий стадии культивирования клеток, продуцирующих антитело в клеточной культуре, получения образца из клеточной культуры, определения характеристик и количественного определения вариантов, отличающихся по размеру или заряду, примесей в белковом лекарственном средстве в образце в соответствии с описанными выше способами и модифицирования одного или более условий культивирования клеточной культуры с уменьшением количества охарактеризованных низкомолекулярных примесей в белковом лекарственном средстве, образующихся в ходе культивирования клеток, продуцирующих антитело. В некоторых вариантах осуществления образец отбирают во время культивирования клеток с любым интервалом. В других вариантах осуществления образец отбирают после производственного культивирования, после сбора белка или после очистки. Одно или более условий культивирования клеток, которые изменяются с уменьшением количества низкомолекулярных примесей в белковом лекарственном средстве, могут быть выбраны из группы, состоящей из температуры, pH, плотности клеток, концентрации аминокислот, осмоляльности, концентрации факторов роста, перемешивания, парциального давления газа, поверхностно-активных веществ или их комбинаций. Клетки могут являться эукариотическими или прокариотическими. Клетки могут представлять собой клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1,

DXB-11 CHO, Veggie-CHO), клетки COS (например, COS-7), клетки сетчатки, клетки Vero, клетки CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), клетки HeLa, клетки HepG2, клетки WI38, клетки MRC 5, клетки Colo25, клетки HB 8065, клетки HL-60, лимфатические клетки, например, аутологичные Т-клетки, Jurkat (Т-лимфоциты) или Daudi (В-лимфоциты), клетки A431 (эпидермальные), клетки U937, клетки 3Т3, L-клетки, клетки C127, клетки SP2/0, клетки NS-0, клетки ММТ, стволовые клетки, опухолевые клетки и клеточную линию, происходящую от любой из вышеупомянутых клеток. В одном варианте осуществления клетки представляют собой клетки гибридомы или квадromы. Еще один вариант осуществления относится к антителу, полученному посредством способов, описанных в данном документе.

Еще один вариант осуществления предусматривает систему для определения характеристик примесей, представляющих собой варианты, отличающихся по размеру и заряду, в лекарственном средстве. Система включает систему SEC или IEX хроматографии, связанную с водной подвижной фазой и сообщаемую по текучей среде с системой нативной масс-спектрометрии.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На фигурах 1А и 1В представлены хроматограммы разделения образца лекарственного вещества mAb-1 с помощью SEC-MS в режиме реального времени. На фигуре 1А представлен ультрафиолетовый профиль, а на фигурах 1В-1Е представлен профиль масс-спектрометрии соответственно мономера, димера, тримера и квадromера.

На фигуре 2А представлен профиль масс-спектрометрии гомодимера Fab<sub>2</sub> из образца лекарственного вещества на основе mAb-1. На фигуре 2В представлен профиль масс-спектрометрии гетеродимера Fab2-Fc из образца лекарственного вещества на основе mAb-1. На фигуре 2С представлен профиль масс-спектрометрии гомодимера Fc из образца лекарственного вещества на основе mAb-1. На фигуре 2D представлена общая ионная хроматограмма разделения mAb-1.

На фигуре 3А показана общая ионная хроматограмма разделения образца лекарственного вещества на основе mAb-2 с помощью SEC-MS в режиме реального времени. На фигуре 3В показан профиль масс-спектрометрии низкой молекулярной массы из фракции, сконцентрированной на 26 мин. На фигуре 3С показан профиль масс-спектрометрии низкой молекулярной массы из фракции, сконцентрированной на 31 мин.

На фигуре 4 представлена хроматограмма общего ионного тока анализа лекарственного вещества на основе mAb-1 с помощью SEC-MS в режиме реального времени из обогащенного LMW-образца (дегликозилированного).

На фигуре 5А представлена хроматограмма общего ионного тока анализа лекарственного вещества на основе mAb-3 с помощью SEC-MS в режиме реального времени, показывающая выявление примесей в виде димера, промежуточного НМW-соединения и мономера. На фигуре 5В представлена хроматограмма общего ионного тока, показывающую выявление мономерных примесей. На фигуре 5С-5Е представлены профили масс-спектрометрии примесей в виде димера, промежуточного НМW-

соединения и мономера.

На фигуре 6 представлены подвергнутые деконволюции масс-спектры промежуточных HMW-соединений в mAb-3, показывающие прогнозируемую массу H2L3, составляющую 167850 Да.

На фигуре 7А показаны экстрагированные ионные хроматограммы mAb-4, показывающие выявление примесей в виде вариантов, отличающихся по заряду. На фигуре 7В показан профиль масс-спектрометрии указанных вариантов, отличающихся по заряду, примесей.

На фигуре 8 представлена общая ионная хроматограмма mAb-4, показывающая определение характеристик вариантов, отличающихся по заряду, на субдоменном уровне с помощью нативной SCX-MS.

На фигуре 9А показаны экстрагированные ионные хроматограммы фрагментов Fab<sub>2</sub>, охарактеризованные с помощью нативной SCX-MS. На рисунке 9В показаны профили масс-спектрометрии вариантов, отличающихся по заряду.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **I. Определения**

Использование терминов в единственном числе и подобных определений в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должны толковаться как охватывающие и единственное число, и множественное число, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

Предусматривается, что приведение диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения индивидуального указания на каждое отдельное значение, входящее в данный диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в настоящее описание, как если бы оно было отдельно упомянуто в данном документе.

Использование термина «приблизительно» предназначено для описания значений либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно +/- 10%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно +/- 5%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно +/- 2%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно +/- 1%. Предполагается, что предыдущие диапазоны будут понятны из контекста, и никаких дополнительных ограничений не предполагается. Все способы, описанные в данном документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или иллюстративной формулировки (например, «такой как»), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения, и не предназначено для ограничения объема

настоящего изобретения, если не заявлено иное. Никакая формулировка в данном описании не должна толковаться как указание на то, что какой-либо незаъявленный элемент является существенным для осуществления настоящего изобретения на практике.

Термин «низкомолекулярная (LMW) примесь в белковом лекарственном средстве» включает без ограничения предшественники, продукты разложения, усеченные соединения, протеолитические фрагменты, в том числе фрагменты Fab, фрагменты Fc или тяжелой цепи, фрагменты лиганда или рецептора, соединения H2L (2 тяжелых цепи и 1 легкая цепь), H2 (2 тяжелые цепи), HL (1 тяжелая цепь и 1 легкая цепь), HC (1 тяжелая цепь) и LC (1 легкая цепь). LMW-примесь в белковом лекарственном средстве может представлять собой любой вариант, который является неполной версией белкового продукта, такой как один или более компонентов мультимерного белка. Примесь белкового лекарственного средства, примесь лекарственного средства или примесь продукта являются терминами, которые могут использоваться взаимозаменяемо во всем описании. LMW-примеси в лекарственном средстве или продукте обычно рассматриваются как молекулярные варианты со свойствами, такими как активность, эффективность и безопасность, которые могут отличаться от свойств требуемого продукта, представляющего собой лекарственное средство.

Деградация белкового продукта является проблематичной во время продуцирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, в системах клеточных культур. Например, протеолиз белкового продукта может происходить вследствие высвобождения протеаз в среде для культивирования клеток. Добавки к среде, такие как источники растворимого железа, добавляемые для ингибирования металлопротеаз, или ингибиторы сериновых и цистеиновых протеаз, внедряли в клеточную культуру для предупреждения дегградации (Clincke, M.-F., et al, *BMC Proc.* 2011, 5, P115). С-концевые фрагменты могут расщепляться во время продуцирования из-за карбоксилпептидаз в клеточной культуре (Dick, LW et al, *Biotechnol Bioeng* 2008; 100:1132-43).

Термин «высокомолекулярные (HMW) примеси в белковом лекарственном средстве» включает без ограничения тримеры mAb и димеры mAb. HMW-соединения можно разделить на две группы: 1) мономер со сверхлегкими цепями (соединения H2L3 и H2L4) и 2) комплексы мономер плюс фрагменты Fab. Кроме того, после обработки с помощью ферментативного расщепления с помощью IdeS образуются различные димеризованные фрагменты (Fab<sub>2</sub>-Fab<sub>2</sub>, Fc-Fc и Fab<sub>2</sub>-Fc).

«Белок» относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, связанных друг с другом посредством пептидной связи. Белок включает в себя полипептиды и пептиды и может также включать продукты модификаций, таких как гликозилирование, липидное присоединение, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, и белки включают, среди прочего, ферменты,

лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных способов культивирования клеток и, как правило, вводятся в клетку с помощью методик генной инженерии (например, с помощью последовательности, кодирующей химерный белок, или кодон-оптимизированной последовательности, последовательности без интронов и т. д.), при этом в клетке генетический материал может находиться в виде эписомы или может быть интегрирован в геном клетки.

«Антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, содержащей четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). VH- и VL-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним различным эпитопом. Биспецифические антитела в целом описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527, которая включена в данную заявку посредством ссылки.

«Слитые белки, содержащие фрагмент Fc» включают в себя часть белка или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые иначе не встречаются вместе в природе. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая домен Fc), было описано, например, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990 и Hollenbaugh et al., «Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins» в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, стр. 10.19.1-10.19.11, 1992. «Слитые белки рецептор-Fc» включают в себя один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которой следуют CH2- и CH3-домены иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий Fc, включает в себя две

или более различных рецепторных цепи, которые связываются с одним или более лигандом(-ами). Например, слитый белок, содержащий Fc, представляет собой белок trap, такой как, например, IL-1 trap или VEGF trap.

«Клеточная культура» относится к размножению или пролиферации клеток в сосуде, таком как колба или биореактор, и включает без ограничения периодическую культуру с подпиткой, непрерывную культуру, перфузионную культуру и т. п.

## **II. Продукты, представляющие собой белковое лекарственное средство**

### **A. Белки, представляющие интерес**

Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, может представлять собой любой белок, представляющий интерес, подходящий для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках, и может использоваться в сконструированной клетке-хозяине. Например, белок, представляющий интерес, включает без ограничений антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, слитый белок, содержащий Fc, или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент. Белки, представляющие интерес, могут представлять собой простые полипептиды, состоящие из одной субъединицы, или сложные мультисубъединичные белки, содержащие две или более субъединиц. Белок, представляющий интерес, может представлять собой биофармацевтический продукт, пищевую добавку или консервант или любой белковый продукт, подлежащий очистке и стандартам качества.

В некоторых вариантах осуществления белковый продукт (белок, представляющий интерес) представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к рецептору запрограммированной гибели клетки 1 (например, антитела к PD1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела к лиганду-1 запрограммированной гибели клетки (например, антитело к PD-L1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), антитела к Dll4, антитела к ангиопоэтину-2 (например, антитело к ANG2, как описано в патенте США № 9402898),

антитела к ангиопоэтин-подобному белку 3 (например, антитело к AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитело к PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела к Erb3, антитела к рецептору пролактина (например, антитело к PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела к компоненту системы комплемента 5 (например, антитело к C5, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0313194A1), антитела к TNF, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитело к EGFR, как описано в патенте США № 9132192, или антитело к EGFRvIII, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0259423A1), антитело к пропротеинконвертазе субтилизин/кексин-9 (например, антитело к PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или публикации заявки на патент США № US2014/0044730A1), антитела к фактору-8 роста и дифференцировки (например, антитело к GDF8, также известное как антитело к миостатину, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела к рецептору глюкагона (например, антитело к GCGR, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитело к IL4R, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271681A1 или патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, антитело к IL6R, как описано в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к интерлейкину 33 (например, антитело к IL33, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2014/0271658A1 или US2014/0271642A1), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, антитело к RSV, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271653A1), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, антитело к CD3, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1 и в патенте США № 62/222605), антитела к кластеру дифференцировки 20 (например, антитело к CD20, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1 и в патенте США № 7879984), антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, антитело к CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела к Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, антитело к MERS, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0337029A1), антитела к вирусу Эбола (например, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к гену активации лимфоцитов 3 (например, антитело к LAG3 или антитело к CD223), антитела к фактору роста нервной ткани (например, антитело к NGF, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0017029 и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела к активину А. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела к CD3 и CD20 (как описано

в публикациях заявок на патенты США №№№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела к CD3 и к муцину-16 (например, биспецифического антитела к CD3 и к Muc16) и биспецифического антитела к CD3 и к простат-специфическому мембранному антигену (например, биспецифическое антитело к CD3 и к PSMA). В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-атто, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белимумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаб-kxwh, эмтанзина алирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гуселькумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-абда, инфликсимаба-дииба, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, слитый белок, содержащий Fc). В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий Fc, представляет собой слитый белок рецептор-Fc, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с фрагментом Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следует CH2- и CH3-домены IgG. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий рецептор Fc, содержит две или более различных рецепторных цепей, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, слитый белок, содержащий Fc, представляет собой белок TRAP, такой как, например, IL-1 trap (например, рилонацепт, который содержит связывающую лиганд IL-1RAcP область, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc-фрагментом hIgG1; см. патент США № 6927004, который полностью включен в данный документ посредством ссылки) или VEGF trap (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит домен Ig 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом Ig 3 рецептора VEGF Flk1, слитого с Fc-фрагментом hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления слитый белок, содержащий Fc, представляет собой слитый белок ScFv-Fc, который содержит один или более антигенсвязывающий(-их) домен(-ов), таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи антитела, связанного с Fc-фрагментом.

### **В. Клеточная культура**

Белок, представляющий интерес, может быть получен в «периодической клеточной

культуре с подпиткой» или «культуре с подпиткой», что относится к периодической культуре, где клетки и среду для культивирования изначально добавляют в сосуд для культивирования, и дополнительные питательные вещества для культуры дискретными приращениями медленно подают в культуру во время культивирования с периодическим сбором клеток и/или продукта до завершения культивирования или без такового. Периодическая культура с подпиткой включает «полунепрерывную периодическую культуру с подпиткой», где периодически целую культуру (которая может включать клетки и среду) удаляют и заменяют свежей средой. Периодическая культура с подпиткой отличается от простой «периодической культуры», поскольку все компоненты для культивирования клеток (включая клетки животных и все питательные вещества культуры) подаются в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования в периодической культуре. Периодическая культура с подпиткой может отличаться от «перфузионной культуры», поскольку супернатант не удаляется из сосуда для культивирования во время стандартного периодического процесса с подпиткой, тогда как при культивировании с перфузией клетки удерживаются в культуре, например с помощью фильтрации, и среда для культивирования непрерывно или периодически вводится и удаляется из сосуда для культивирования. Тем не менее, предполагается отбор образцов для целей тестирования во время периодического культивирования клеток с подпиткой. Периодический процесс с подпиткой продолжается до тех пор, пока не будет определено, что максимальный рабочий объем и/или продуцирование белка достигнуты, и пока белок не будет затем собран.

Белок, представляющий интерес, может быть получен в непрерывной клеточной культуре. Фраза «непрерывная клеточная культура» относится к методике, используемой для непрерывного роста клеток, обычно в определенной фазе роста. Например, если требуется постоянный источник клеток или требуется продуцирование конкретного представляющего интерес белка, клеточная культура может требовать поддержания на определенной фазе роста. Таким образом, условия должны постоянно контролироваться и корректироваться соответствующим образом, чтобы поддерживать клетки в этой конкретной фазе.

Термины «среда для культивирования клеток» и «среда для культивирования» относятся к питательному раствору, используемому для выращивания клеток млекопитающих, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как источник энергии в виде углеводов, незаменимые (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и заменимые (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин) аминокислоты, следовые элементы, источники энергии, липиды, витамины и др. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые снабжают клетки исходными материалами, поддерживающими рост клеток. Среды могут содержать дрожжевой экстракт или соевый экстракт вместо

животных экстрактов. Среда с определенным химическим составом относится к среде для культивирования клеток, в которой все химические компоненты известны (т. е. имеют известную химическую структуру). Среда с определенным химическим составом не содержит компонентов животного происхождения, таких как пептоны сывороточного или животного происхождения. В одном варианте осуществления среда представляет собой среду с определенным химическим составом.

Раствор также может содержать компоненты, которые увеличивают рост и/или выживаемость выше минимального уровня, включая гормоны и факторы роста. Раствор может быть составлен до pH и концентрации соли, оптимальных для выживания и пролиферации конкретной культивируемой клетки.

«Клеточная линия» относится к клетке или клеткам, которые получены из определенной линии посредством серийного пассирования или субкультивирования клеток. Термин «клетки» используется взаимозаменяемо с «клеточной популяцией».

Термин «клетка» включает любую клетку, которая подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают таковые из прокариот и эукариот, такие как бактериальные клетки, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки нечеловекоподобных животных, клетки птиц, клетки насекомых, дрожжевые клетки или продукты слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квадромы. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомячка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления клетка выбрана из следующих клеток: яичника китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, например, Jurkat (Т-лимфоцит) или Daudi (В-лимфоцит), A431 (эпидермальная), U937, 3Т3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, клетки ММТ, стволовой клетки, опухолевой клетки и линии клеток, происходящих из вышеупомянутой клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6®). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO K1.

### **III. Системы для определения характеристик вариантов примесей белковых лекарственных средств**

Мультисубъединичные терапевтические белки, в частности терапевтические средства на основе моноклональных антител (mAb), по своей природе неоднородны в отношении размера из-за их сложной многоцепочечной структуры и склонности приспосабливаться ко многим ферментативным и химическим посттрансляционным модификациям. Хотя уровни вариантов, отличающихся по размеру, в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, можно легко количественно

определить с помощью различных биофизических методов, однозначная идентификация этих связанных с продуктом примесей была особенно сложной.

Хотя mAb обладают консервативной ковалентной гетеротетрамерной структурой, состоящей из двух тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью, каждая из которых ковалентно связана посредством дисульфидной связи с легкой цепью, эти белки часто содержат низкие уровни связанных с продуктом примесей даже после стадий глубокой очистки. Низкомолекулярные соединения (LMW) (например, фрагменты Fab и мономер без плеча Fab) и высокомолекулярные соединения (HMW) (например, тример mAb и димер mAb) являются примерами связанных с продуктом примесей, которые вносят вклад в гетерогенность по размеру продуктов на основе mAb. Образование HMW-соединений в продукте, представляющем собой терапевтическое лекарственное средство на основе mAb, в результате агрегации белка может потенциально поставить под угрозу как эффективность продукта, так и его безопасность (например, вызывая нежелательный иммуногенный ответ) (Rosenberg AS. *The AAPS journal*, 8:E501-7 (2006); Moussa EM, et al. *Journal of Pharmaceutical Science*, 105:417-30 (2016)). LMW-соединения любого терапевтического белка могут являться результатом протеазной активности клетки-хозяина во время продуцирования. LMW-соединения часто характеризуются низкой или существенно сниженной активностью по сравнению с мономерной формой антитела, в то же время подвергаясь воздействию новых эпитопов, которые могут приводить к иммуногенности или потенциально влиять на фармакокинетические свойства *in vivo* (Vlasak J, Ionescu R. *mAbs*, 3:253-63 (2011)). В результате и HMW соединения, и LMW соединения считаются критическими качественными признаками, которые регулярно контролируются во время разработки лекарственного средства и в качестве части тестирования готовой продукции очищенного лекарственного вещества во время изготовления.

Гетерогенность по молекулярной массе продуктов на основе mAb традиционно характеризуется с помощью многих ортогональных аналитических способов (Michels DA, Parker M, Salas-Solano O. *Electrophoresis*, 33:815-26 (2012)). Одной из наиболее часто используемых методик оценки чистоты продукта на основе mAb является SDS-PAGE, осуществляемая в невосстанавливающих условиях. Во время анализа можно обычно наблюдать и количественно определять минорные полосы, соответствующие LMW-соединениям, включая соединения H2L (2 тяжелые цепи и 1 легкая цепь), H2 (2 тяжелые цепи), HL (1 тяжелая цепь и 1 легкая цепь), HC (1 тяжелая цепь) и LC (1 легкая цепь), в отношении антител (Liu H, Gaza-Bulseco G, Chumsae C, Newby-Kew A. *Biotechnology Letters*, 29:1611-22 (2007)).

Также могут наблюдаться протеолитические фрагменты. Предполагаемый идентификатор каждой минорной полосы может быть подтвержден с помощью N-концевого секвенирования посредством расщепления по Эдману, расщепления трипсином в геле с последующим масс-спектрометрическим анализом и вестерн-блоттинга с использованием антител к Fc и к легкой цепи. Однако любые предполагаемые структуры,

полученные с помощью этих способов, не могут быть однозначно подтверждены на интактном уровне белка. Кроме того, в условиях подготовки образца, используемых в экспериментах SDS-PAGE, могут образовываться LMW-артефакты посредством перестановки дисульфидных связей, что может привести к переоценке минорных LMW-соединений (Zhu ZC, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83:89-95 (2013)).

Совсем недавно капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (CE-SDS) стал современным эквивалентом SDS-PAGE, обеспечивающим превосходную воспроизводимость, чувствительность и пропускную способность (Rustandi RR, Washabaugh MW, Wang Y. *Electrophoresis*, 29:3612-20 (2008); Lacher NA, et al. *Journal of Separation Science*, 33:218-27 (2010) и Hunt G, Moorhouse KG, Chen AB. *Journal of Chromatography A*, 744:295-301 (1996)). Во время CE-SDS-анализа продуктов на основе mAb обычно могут наблюдаться минорные пики с более коротким временем миграции (LMW-формы), чем у интактного антитела. В отличие от SDS-PAGE-анализа эти LMW-примеси не могут быть извлечены или подвергнуты дальнейшему анализу. В результате идентификаторы LMW-примесей, наблюдаемые в способах CE-SDS, часто предлагаются исключительно на основе эмпирических знаний.

Точное измерение массы интактных белков mAb с помощью современных масс-спектрометров становится все более популярным в биофармацевтической промышленности как одна из самых надежных методик идентификации (Kaltashov IA, et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21:323-37 (2010)); Zhang H, Cui W, Gross ML. *FEBS Letters*, 588:308-17 (2014)). В частности, различные способы «комбинированной хроматографии-масс-спектрометрии» продемонстрировали способность выявлять примеси с низкой интенсивностью в продуктах на основе mAb и обеспечивать очень подробные анализы, которые не могут быть достигнуты с помощью способов либо SDS-PAGE, либо CE-SDS (Le JC, Bondarenko PV. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16:307-11 (2005); Habegger M, et al. *mAbs*; 8:331-9 (2016)). Например, хроматография с обращенной фазой (RPLC) в сочетании с масс-спектрометрией может использоваться для выявления свободной легкой цепи и ассоциированных с ней посттрансляционных модификаций (например, цистенилирование и глутатионилирование), присутствующих в продуктах, представляющих собой лекарственное средство на основе mAb. Однако по сравнению со способами SDS-PAGE и CE-SDS, RPLC часто не обладает достаточным разрешением для разделения LMW-соединений и, таким образом, не может выявить полный профиль LMW-соединений. Например, никогда не сообщалось об идентификации соединений H2L в продуктах, представляющих собой лекарственное средство на основе mAb, с помощью интактного массового анализа на основе RPLC из-за их низкой интенсивности и низкого разрешения от основного интактного антитела.

Другая методика на основе MS, которая является перспективной для определения характеристик примесей, связанных с продуктом на основе mAb, представляет собой

масс-спектрометрию с нативной электрораспылительной ионизацией (Native ESI-MS), которая особенно информативна в сочетании с эксклюзионной хроматографией (SEC) (Habegger M, et al. mAbs, 8:331-9 (2016)). Тем не менее, LMW-соединения, идентифицированные в анализе с помощью нативной SEC-MS, часто не совпадают с теми, которые идентифицированы с помощью SDS-PAGE или CE-SDS, из-за существенно различающихся экспериментальных условий, используемых в этих способах. В частности, получение образца, необходимое для SDS-PAGE и CE-SDS, часто начинается с денатурации белка, когда нарушаются нековалентные связи между N-концевыми областями пар HC-LC и C-концевыми областями пар HC-HC. В результате LMW-примеси, такие как H2L, полуантитела и вещества в виде свободных легких цепей, способны диссоциировать от молекулы mAb, если межцепочечные дисульфидные связи разорваны.

Для сравнения, нативная SEC-MS анализирует образцы mAb в почти нативных условиях, позволяя сохранять сильные нековалентные межцепочечные связи и давая возможность сохранять четырехцепочечную структуру молекулы mAb, даже если межцепочечные дисульфидные связи разрываются. Хотя достижения в области химии колонок SEC сделали возможным использование денатурирующих буферов (например, 30% ацетонитрила, 0,1% FA и 0,1% TFA), которые обычно используются в хроматографии с обращенной фазой, для разделения в SEC и прямого связывания с масс-спектрометрическим анализом в режиме реального времени (Liu H, Gaza-Bulsecu G, Chumsae C. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 20:2258-64 (2009)), разрешение LC все еще неоптимально для выявления многих LMW-соединений.

Для решения этих проблем предусмотрена платформа, которая сочетает в себе разделение с помощью высокоэффективной SEC и IEX с выявлением с помощью сверхчувствительной нативной масс-спектрометрии Nano-ESI, что позволяет осуществлять глубокое и быстрое определение характеристик терапевтических продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство.

#### **А. Системы для определения характеристик вариантов, отличающихся по размеру и заряду, продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство**

В одном варианте осуществления система включает колонку для эксклюзионной хроматографии (SEC) или систему ионообменной хроматографии (IEX), сообщающуюся по текучей среде с системой нативной масс-спектрометрии. Колонки подходят для использования с дегликозилированными белками. В одном варианте осуществления колонка SEC представляет собой колонку SEC Waters VEN<sup>®</sup> (4,6 × 300 мм). В одном варианте осуществления колонка IEX представляет собой сильную катионообменную колонку. Система нативной масс-спектрометрии может представлять собой систему нативной масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ESI). В одном варианте осуществления система масс-спектрометрии представляет собой масс-спектрометр Thermo Exactive EMR. Система масс-спектрометрии также может содержать детектор ультрафиолетового излучения. Колонки SEC и IEX сообщаются по текучей среде

с масс-спектрометром через аналитический разделитель потока, который может регулировать скорость потока к масс-спектрометру.

В одном варианте осуществления подвижная фаза представляет собой водную подвижную фазу. Иллюстративная водная подвижная фаза содержит 140 мМ ацетата натрия и 10 мМ бикарбоната аммония. Следы УФ-излучения обычно регистрируются при 215 и 280 нм.

Образцы белкового лекарственного средства обычно составляют 5-10 мкг/мл. Инъекционная концентрация обычно составляет 50-100 мкг.

В одном варианте осуществления разделение по размеру достигается при комнатной температуре с использованием изократического потока 0,2 мл/мин в течение 24 минут.

В одном варианте осуществления напряжение для электрораспыления подается через тройник жидкостного перехода непосредственно перед излучателем.

## **В. Способы определения характеристик примесей в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство**

Раскрытые системы и способы могут применяться для определения характеристик вариантов, отличающихся по размеру, вариантов, отличающихся по заряду, связывания антитело-антиген, определения характеристик РТМ, определения характеристик частично восстановленного и алкилированного mAb, определения характеристик димера для комбинированных лекарственных средств, определения характеристик обмена плеча Fab IgG4 и определения характеристик высокогетерогенного образца с использованием снижения заряда. Типичные посттрансляционные модификации (РТМ), которые могут быть выявлены и идентифицированы и которые вносят вклад в кислотные варианты, включают без ограничения гликирование, глюкуронылирование, карбоксиметилирование, сиалилирование, неконсенсусное гликозилирование в Fab-области. РТМ, которые могут быть выявлены и идентифицированы и которые вносят вклад в основные варианты, включают без ограничения образование сукцинимиды, N-концевой глутамин (не превращенный в пироглутамат), C-концевой Lys и негликозилированные/частично гликозилированные соединения.

### **1. Варианты, отличающиеся по размеру**

В одном варианте осуществления предусмотрен способ определения характеристик вариантов, отличающихся по размеру, примесей в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, включающий стадии необязательного дегликозилирования образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, разделения белковых компонентов образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью нативной SEC хроматографии с использованием водной подвижной фазы и анализа выделенных белковых компонентов с помощью масс-спектрометрии с определением характеристик примесей высокомолекулярных соединений, низкомолекулярных соединений и промежуточных высокомолекулярных соединений в продукте, представляющем собой белковое

лекарственное средство, содержащихся в образце продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления подвижная фаза включает в себя ацетат аммония и бикарбонат аммония.

В одном варианте осуществления образец продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, отбирают или очищают из периодической клеточной культуры с подпиткой, непрерывной клеточной культуры или перфузионной клеточной культуры.

Иллюстративные продукты, представляющие собой белковое лекарственное средство, включают без ограничения антитело, слитый белок, рекомбинантный белок или их комбинацию.

Иллюстративные низкомолекулярные примеси в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, включают без ограничения предшественники, продукты разложения, усеченные соединения, протеолитические фрагменты, в том числе фрагменты Fab, лиганда или рецептора, или фрагменты тяжелых цепей, свободную легкую цепь, полуантитело, H2L, H2, HL, HC или их комбинации.

Иллюстративные HMW-примеси включают без ограничения тримеры mAb и димеры mAb.

Иллюстративные промежуточные HMW включают без ограничения мономер со сверхлегкими цепями (соединения H2L3 и H2L4), комплексы мономер плюс фрагменты Fab, Fab2-Fab2, Fc-Fc и Fab2-Fc.

## **2. Определение характеристик вариантов, отличающихся по заряду**

В одном варианте осуществления предусмотрен способ определения характеристик примесей, представляющих собой варианты, отличающиеся по заряду, в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, включающий стадии необязательного дегликозилирования образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, необязательной обработки образца с помощью IdeS от *Streptococcus pyogenes*, разделения белковых компонентов образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью нативной сильной катионообменной хроматографии с использованием водной подвижной фазы и анализа выделенных белковых компонентов с помощью масс-спектрометрии с определением характеристик примесей, представляющих собой варианты, отличающиеся по заряду, в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, содержащихся в образце продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления подвижная фаза включает в себя ацетат аммония и бикарбонат аммония.

В одном варианте осуществления образец продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, отбирают или очищают из периодической клеточной культуры с подпиткой, непрерывной клеточной культуры или перфузионной клеточной культуры.

Типичные варианты, отличающиеся по заряду, включают без ограничения продукты гликирования, глюкуронилирования, карбоксиметилирования, сиалилирования, неконсенсусного гликозилирования в Fab-области. РТМ, которые могут быть выявлены и идентифицированы и которые вносят вклад в основные варианты, включают без ограничения образование сукцинимидов, N-концевой глутамин (не превращенный в пироглутамат), C-концевой Lys и негликозилированные/частично гликозилированные соединения.

### **С. Способы получения продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, высокой чистоты**

Один вариант осуществления предусматривает способ получения антитела, включающий стадии культивирования клеток, продуцирующих антитело, например в периодической клеточной культуре с подпиткой, получения образца из клеточной культуры, определения характеристик и количественного определения низкомолекулярных, высокомолекулярных и промежуточных примесей в образце с использованием систем и способов, раскрытых в данном документе, и модификации одного или более условий культивирования клеточной культуры с целью уменьшения количества охарактеризованных низкомолекулярных примесей в белковом лекарственном средстве, продуцируемых во время культивирования клеток, продуцирующих антитело. Как правило, условия изменяют таким образом, чтобы примеси в белковом лекарственном средстве находились в диапазоне от 0,05% до 30,0%, предпочтительно от 0,05% до 15%, от 0,05% до 10%, от 0,05% до 5% или от 0,05% до 2% (вес/вес).

Одно или более условий культивирования клеток, которые изменяются с уменьшением количества низкомолекулярных примесей в белковом лекарственном средстве, выбраны из группы, состоящей из температуры, pH, плотности клеток, концентрации аминокислот, осмоляльности, концентрации факторов роста, перемешивания, парциального давления газа, поверхностно-активных веществ или их комбинаций.

В одном варианте осуществления клетки, продуцирующие антитело, представляют собой клетки яичника китайского хомячка. В других вариантах осуществления клетки представляют собой клетки гибридомы.

В другом варианте осуществления антитело, полученное в соответствии с представленными в данном документе способами, содержит от 1 до 5%, от 5 до 10%, от 10 до 15%, от 15 до 20% примесей в белковом лекарственном средстве.

### **Примеры**

#### **Пример 1. Разделение с помощью НПЛС образца лекарственного вещества на основе mAb-1**

##### Способы

Разделение с помощью SEC достигалось на колонке Waters VEN<sup>®</sup> SEC (4,6 × 300 мм), которую предварительно уравнивали с помощью подвижной фазы на основе ацетата аммония и бикарбоната аммония при скорости потока 0,2 мл/мин. Разделение с

помощью IEX достигалось на сильной катионообменной колонке при скорости потока 0,4 мл/мин. с использованием буферной системы на основе ацетата аммония. После колонки подключали аналитический разделитель потока, чтобы уменьшить скорость потока до ~1 мкл/мин. перед анализом с помощью масс-спектрометра Thermo Exactive EMR, который был оборудован ионным источником Nanospray Flex™. В зависимости от размера анализируемых веществ регулировали давление захватываемого газа, уровень RF S-линзы, фрагментацию в ионном источнике и энергию столкновения HCD для достижения оптимального растворения.

Таким образом, предложена новая технологическая платформа, которая сочетает в себе разделение с помощью высокоэффективной SEC и IEX с выявлением с помощью сверхчувствительной нативной масс-спектрометрии Nano-ESI, что дает возможность осуществлять глубокое и быстрое определение характеристик терапевтических mAb.

### Результаты

В качестве модельной молекулы использовали образец лекарственного вещества рекомбинантного mAb IgG1 (mAb-1). С использованием SEC-MS низкие уровни вариантов, отличающихся по размеру, в продуктах на основе mAb могут быть эффективно отделены от основных мономерных соединений и подвергнуты чувствительному выявлению с помощью MS. С помощью этого способа можно обычно наблюдать и контролировать как более высокомолекулярные (например, тример mAb и димер mAb), так и более низкомолекулярные соединения (например, фрагменты Fab и мономер без плеча Fab), которые присутствуют при < 1% относительной интенсивности. В частности, интересная категория HMW-соединений, которая элюируется между мономером mAb и димером mAb (называемая промежуточными HMW-соединениями) была выявлена во многих продуктах на основе mAb, несмотря на то, что они обычно присутствуют при очень низких уровнях (< 0,1%). Посредством точного измерения массы можно определить идентификаторы этих промежуточных HMW-соединений и разделить их на две группы: 1) мономер со сверхлегкими цепями (соединения H2L3 и H2L4) и 2) комплексы мономер плюс Fab-фрагменты. Кроме того, после обработки с помощью ферментативного расщепления посредством IdeS различные димеризованные фрагменты (Fab<sub>2</sub>-Fab<sub>2</sub>, Fc-Fc и Fab<sub>2</sub>-Fc) могут быть хорошо разделены и выявлены этим способом, показывая границы димеризации на субдоменном уровне.

С использованием IEX-MS могут быть выявлены различные PTM, вносящие вклад в варианты, отличающиеся по заряду, на интактном уровне mAb. При анализе сотен образцов mAb было обнаружено, что PTM, вносящие вклад в кислотные варианты, включают гликирование, глюкуронылирование, карбоксиметилирование, сиалилирование и неконсенсусное гликозилирование в Fab-области; было обнаружено, что PTM, вносящие вклад в основные варианты, включали образование сукцинимиды, N-концевой глутамин (не превращенный в пироглутамат), C-концевой Lys и негликозилированные/частично гликозилированные соединения. В исследованиях вариантов, отличающихся по заряду

(например, исследованиях сопоставимости и принудительной деградации), этот новый подход оказался очень мощным в выявлении вариантных форм, отличающихся по заряду.

Хотя в вышеприведенном описании настоящее изобретение было описано применительно к некоторым вариантам его осуществления и было приведено много подробностей с целью иллюстрации, специалистам в данной области будет очевидно, что настоящее изобретение допускает дополнительные варианты осуществления, и что некоторые из подробностей, описанных в данном документе, могут значительно варьироваться без отклонения от основных принципов настоящего изобретения.

Все публикации, упомянутые во всем настоящем изобретении, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Все ссылки, цитируемые в данном документе, полностью включены посредством ссылки. Настоящее изобретение может быть осуществлено в других конкретных формах без отклонения от его сущности или основных атрибутов, и соответственно следует сделать ссылку на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, которое указывает на объем настоящего изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий: белковое лекарственное средство и вспомогательное вещество, где продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит от 0,05% до 30,0% (вес/вес) примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном средстве.

2. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по п. 1, где продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, выбран из группы, состоящей из антитела, слитого белка, рекомбинантного белка или их комбинации.

3. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по п. 1 или п. 2, где примеси с промежуточным значением молекулярной массы в белковом лекарственном средстве выбраны из группы, состоящей из мономера с дополнительными легкими цепями, включая соединения H2L3 и H2L4, комплексов мономер плюс Fab-фрагменты и их комбинаций.

4. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по любому из пп. 1-3, где продукт, представляющий собой лекарственное средство, содержит от 0,05% до 25% вес/вес примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном средстве.

5. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по любому из пп. 1-3, где продукт, представляющий собой лекарственное средство, содержит от 0,05% до 15% вес/вес примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном средстве.

6. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по любому из пп. 1-3, где продукт, представляющий собой лекарственное средство, содержит от 0,05% до 10% вес/вес примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном средстве.

7. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по любому из пп. 1-3, где продукт, представляющий собой лекарственное средство, содержит от 0,05% до 5% вес/вес примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном средстве.

8. Способ определения характеристик примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, предусматривающий:

дегликозилирование образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство;

разделение белковых компонентов образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью нативной эксклюзионной хроматографии с использованием водной подвижной фазы;

анализ разделенных белковых компонентов с помощью масс-спектрометрии с определением характеристик примесей с промежуточным значением высокой

молекулярной массы в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, содержащихся в образце продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

9. Способ по п. 8, где образец продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, получен из периодической культуры с подпиткой.

10. Способ по п. 8 или п. 9, где продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, выбран из группы, состоящей из антитела, слитого белка, рекомбинантного белка или их комбинации.

11. Способ по любому из пп. 8-10, где примесь с промежуточным значением высокой молекулярной массы в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, охарактеризована как примесь с промежуточным значением высокой молекулярной массы в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, выбранная из группы, состоящей из мономера с дополнительными легкими цепями, включая соединения H2L3 и H2L4, комплексов мономер плюс Fab-фрагменты и их комбинаций.

12. Способ получения антитела, предусматривающий:

культивирование клеток, продуцирующих антитело в клеточной культуре;

получение образца из клеточной культуры;

определение характеристик и количественное определение примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в образце в соответствии со способом по любому из пп. 8-11 и

модификацию одного или более условий культивирования клеточной культуры с целью уменьшения количества охарактеризованных низкомолекулярных примесей в белковом лекарственном средстве, образующихся в ходе культивирования клеток, продуцирующих антитело.

13. Способ по п. 12, где одно или более условий культивирования клеток, которые изменяют с целью уменьшения количества примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном средстве, выбраны из группы, состоящей из pH, плотности клеток, концентрации аминокислот, осмоляльности, концентрации факторов роста, перемешивания, парциального давления газа, поверхностно-активных веществ или их комбинаций.

14. Способ по п. 12 или п. 13, где клетки выбраны из группы, состоящей из бактериальных клеток, дрожжевых клеток, клеток яичника китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), клеток COS (например, COS-7), клеток сетчатки, клеток Vero, клеток CV1, клеток почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), клеток HeLa, клеток HepG2, клеток WI38, клеток MRC 5, клеток Colo25, клеток HB 8065, клеток HL-60, лимфатических клеток, например, аутологичных Т-клеток, Jurkat (Т-лимфоцитов) или Daudi (В-лимфоцитов), клеток A431 (эпидермальных), клеток U937, клеток 3Т3, L-клеток, клеток C127, клеток SP2/0, клеток

NS-0, клеток ММТ, стволовых клеток, опухолевых клеток и клеточной линии, происходящей от любой из вышеупомянутых клеток.

15. Способ по п. 12 или п. 13, где клетки представляют собой клетки гибридомы или клетки квадромы.

16. Антитело, полученное посредством способа по любому из пп. 12-15.

17. Антитело по п. 16, содержащее от 0,05 до 30,0% (вес/вес) примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в белковом лекарственном средстве.

18. Система с определением характеристик примесей с промежуточным значением высокой молекулярной массы в лекарственном средстве, предусматривающая

систему нативной эксклюзионной хроматографии, содержащую эксклюзионную колонку, соединенную с колонкой с подвижной фазой, содержащей водную подвижную фазу, где эксклюзионная колонка сообщается по текучей среде с системой масс-спектрометрии с Nano-ESI.

19. Способ определения характеристик примесей, представляющих собой варианты, отличающиеся по заряду, в лекарственном средстве, предусматривающий:

дегликозилирование образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство;

разделение белковых компонентов образца продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью нативной хроматографии с сильной катион-эксклюзионной средой с использованием водной подвижной фазы;

анализ разделенных белковых компонентов с помощью масс-спектрометрии с Nano-ESI с определением характеристик примесей, представляющих собой варианты, отличающиеся по заряду, в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, содержащихся в образце продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

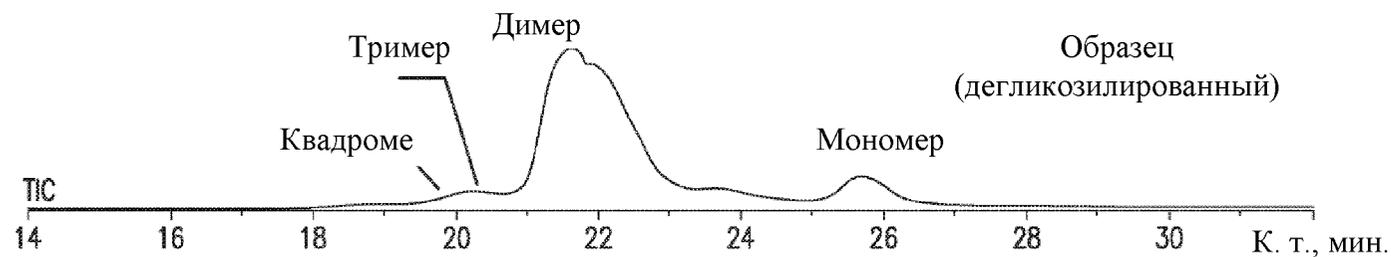
20. Способ по п. 19, где образец продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, получен из периодической культуры с подпиткой.

21. Способ по п. 19 или п. 20, где продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, выбран из группы, состоящей из антитела, слитого белка, рекомбинантного белка или их комбинации.

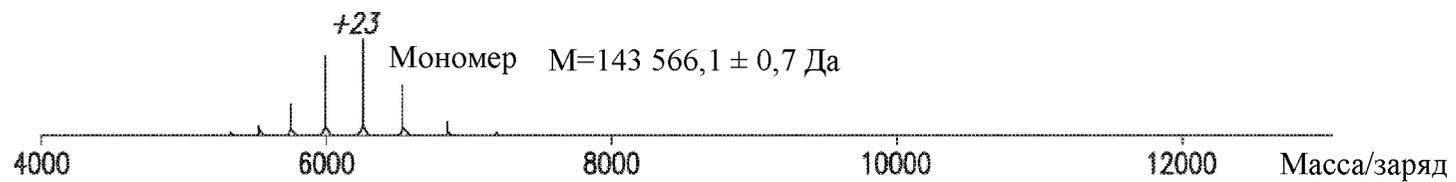
22. Способ по любому из пп. 19-21, где примесь с промежуточным значением высокой молекулярной массы в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, охарактеризована как примесь с промежуточным значением высокой молекулярной массы в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство, выбранная из группы, состоящей из мономера с дополнительными легкими цепями, включая соединения H2L3 и H2L4, комплексов мономер плюс Fab-фрагменты и их комбинаций.

23. Способ по любому из пп. 8-11 и пп. 19-22, где водная подвижная фаза содержит ацетат аммония и бикарбонат аммония.

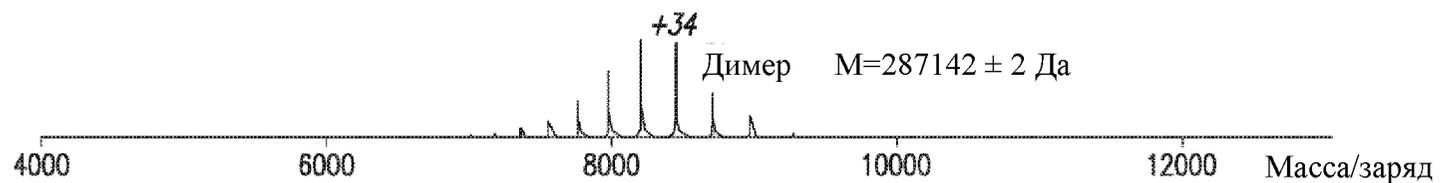




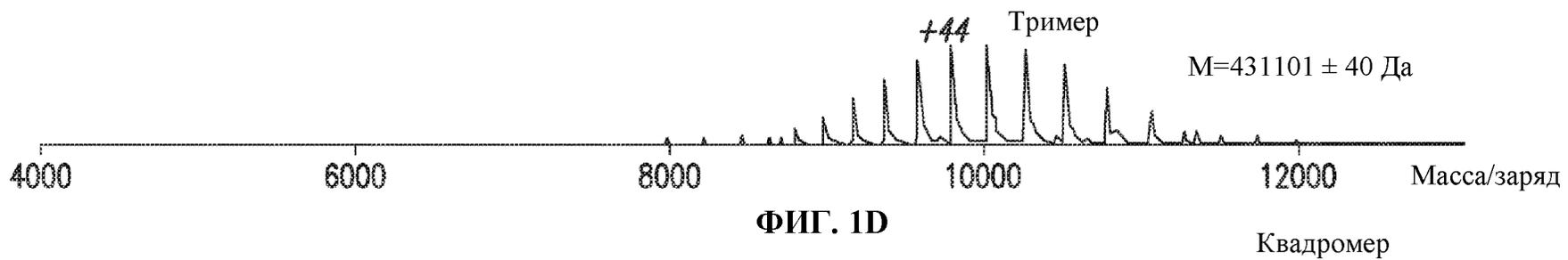
ФИГ. 1А



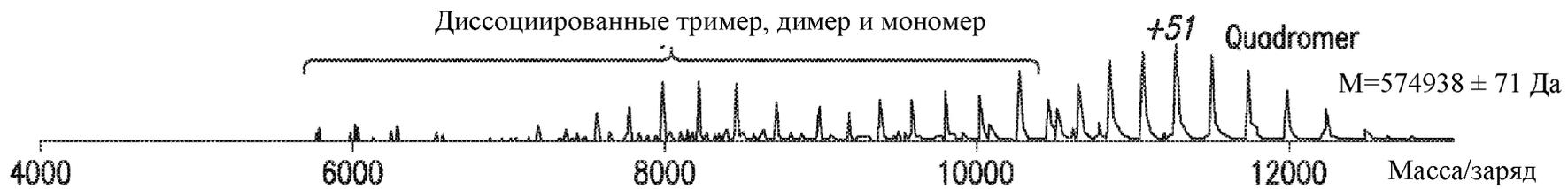
ФИГ. 1В



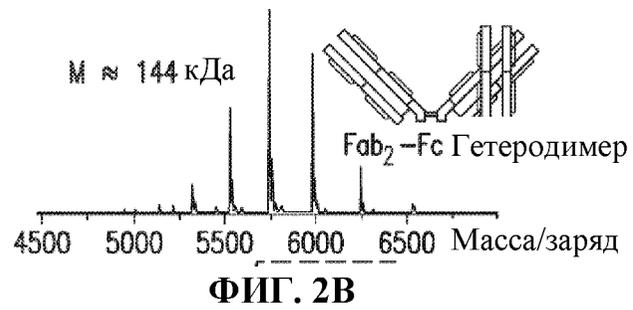
ФИГ. 1С



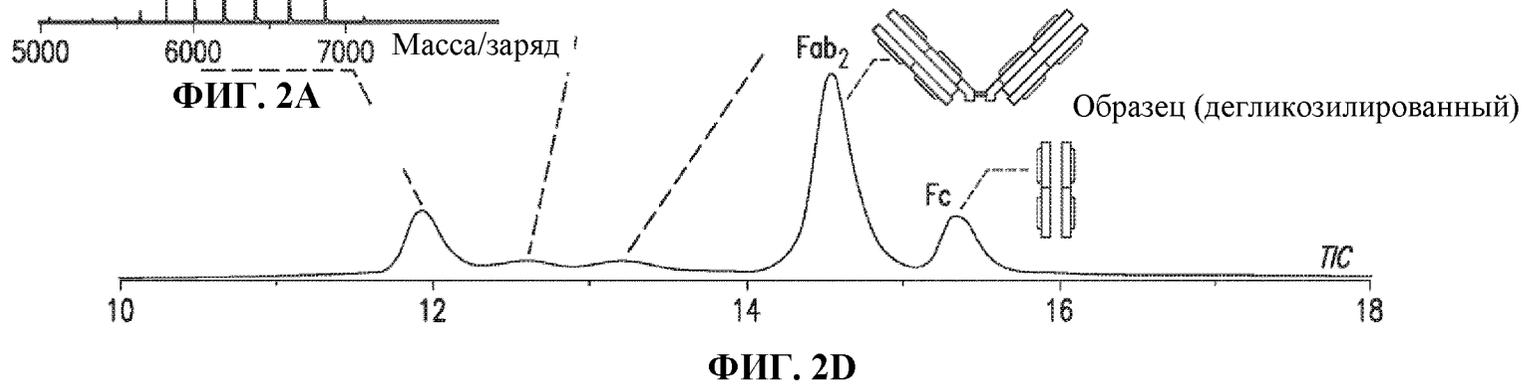
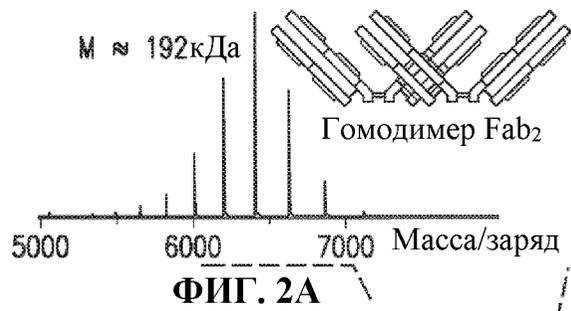
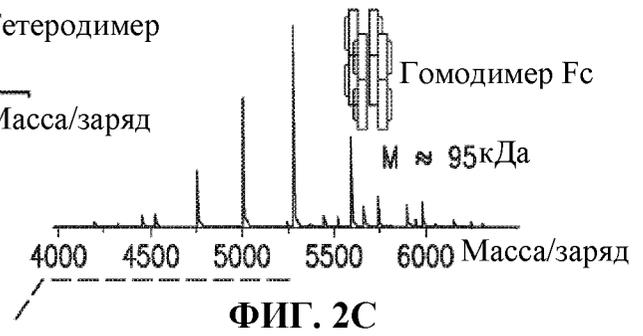
ФИГ. 1D

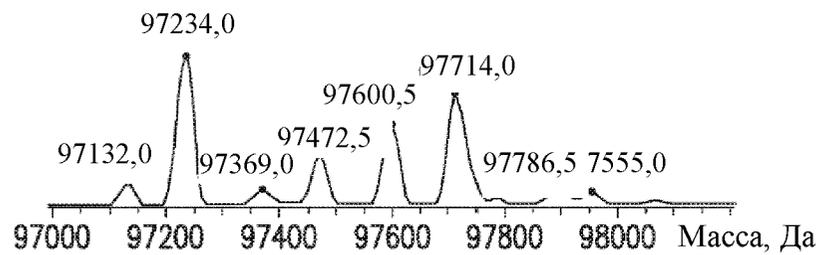


ФИГ. 1E

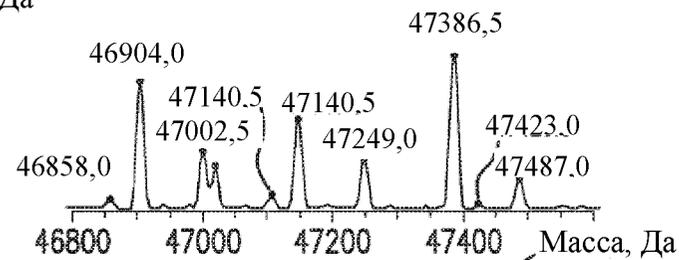


Образец обогащенного димера  
(дегликозилированный)

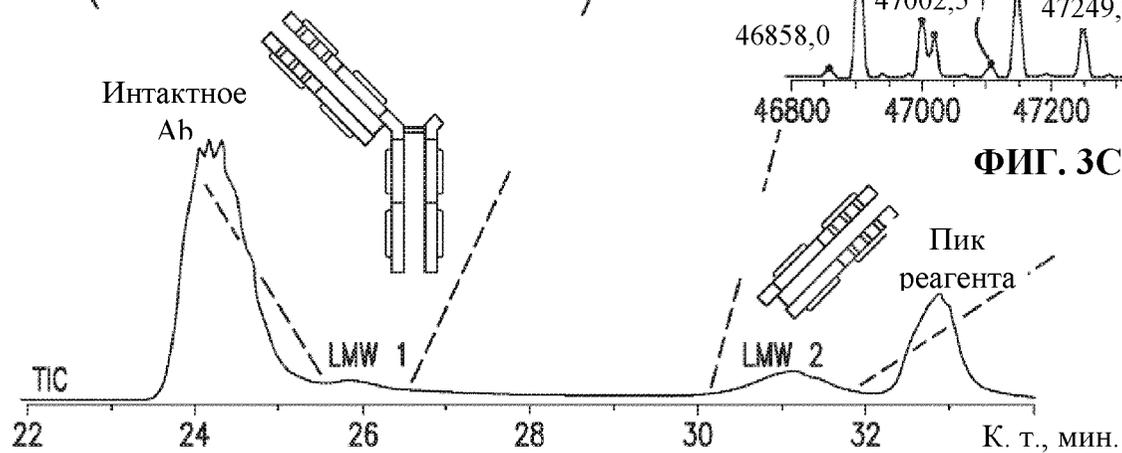




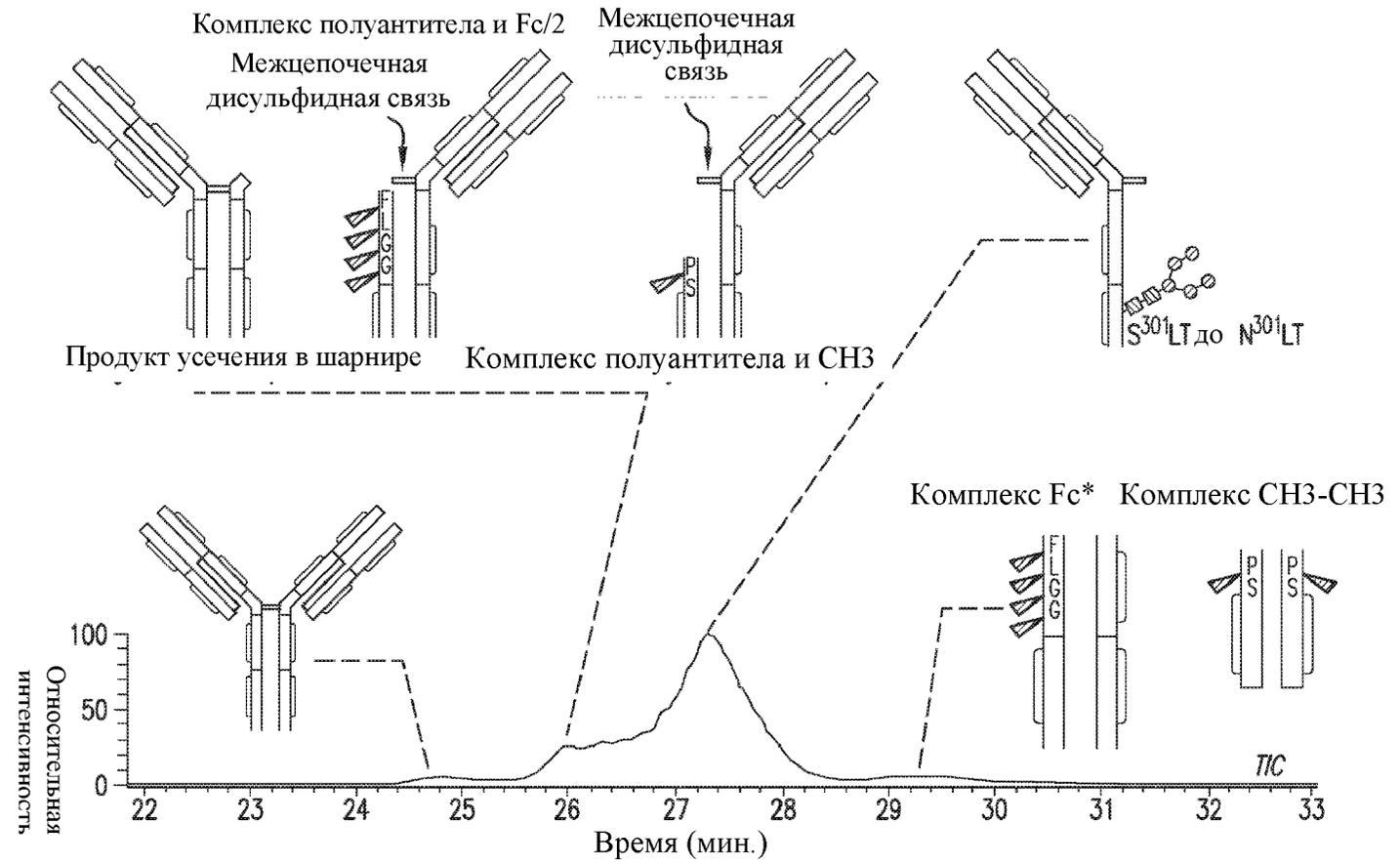
**ФИГ. 3В**



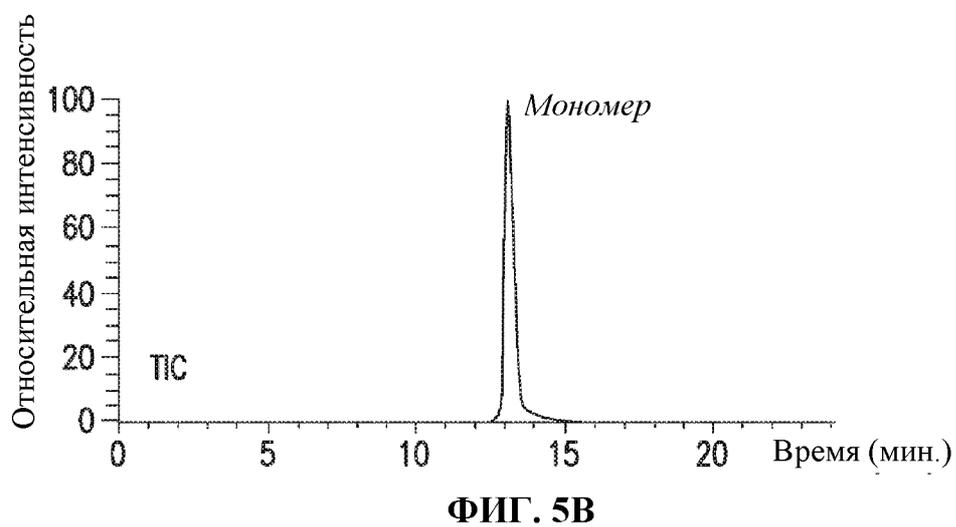
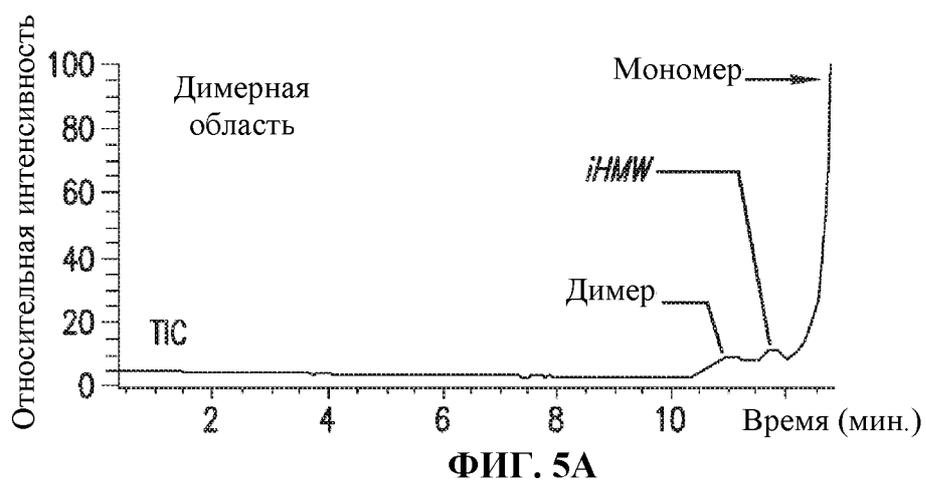
**ФИГ. 3С**

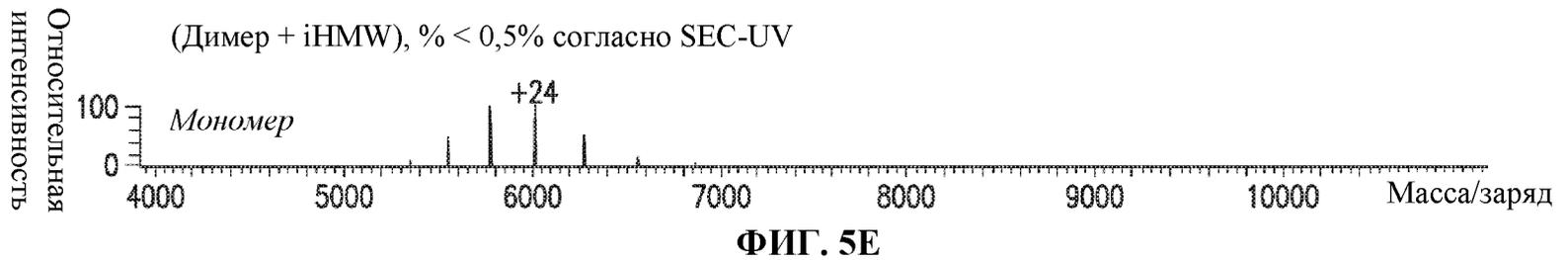
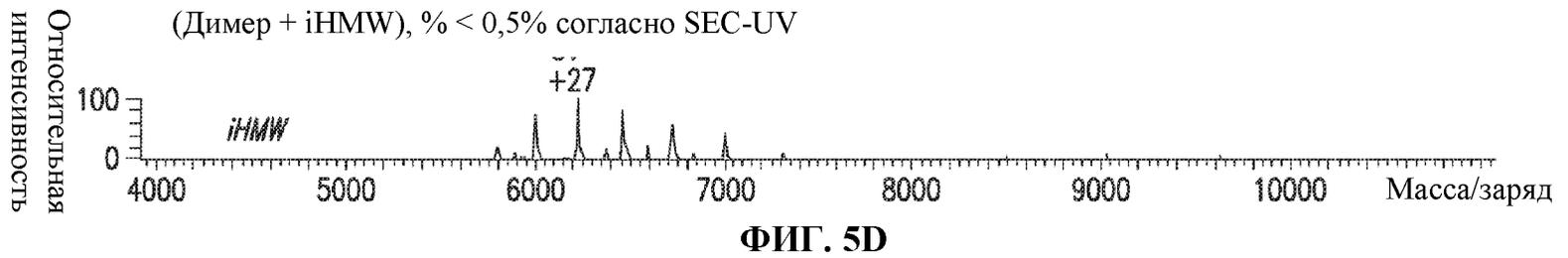
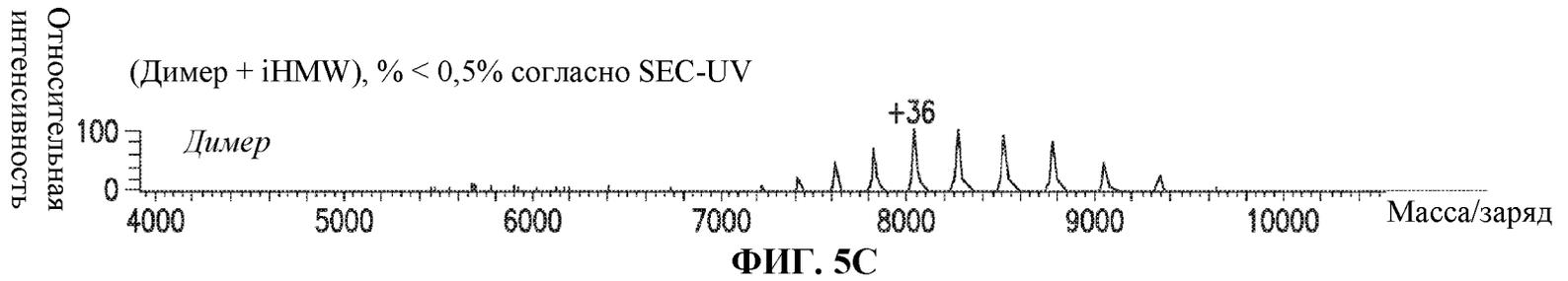


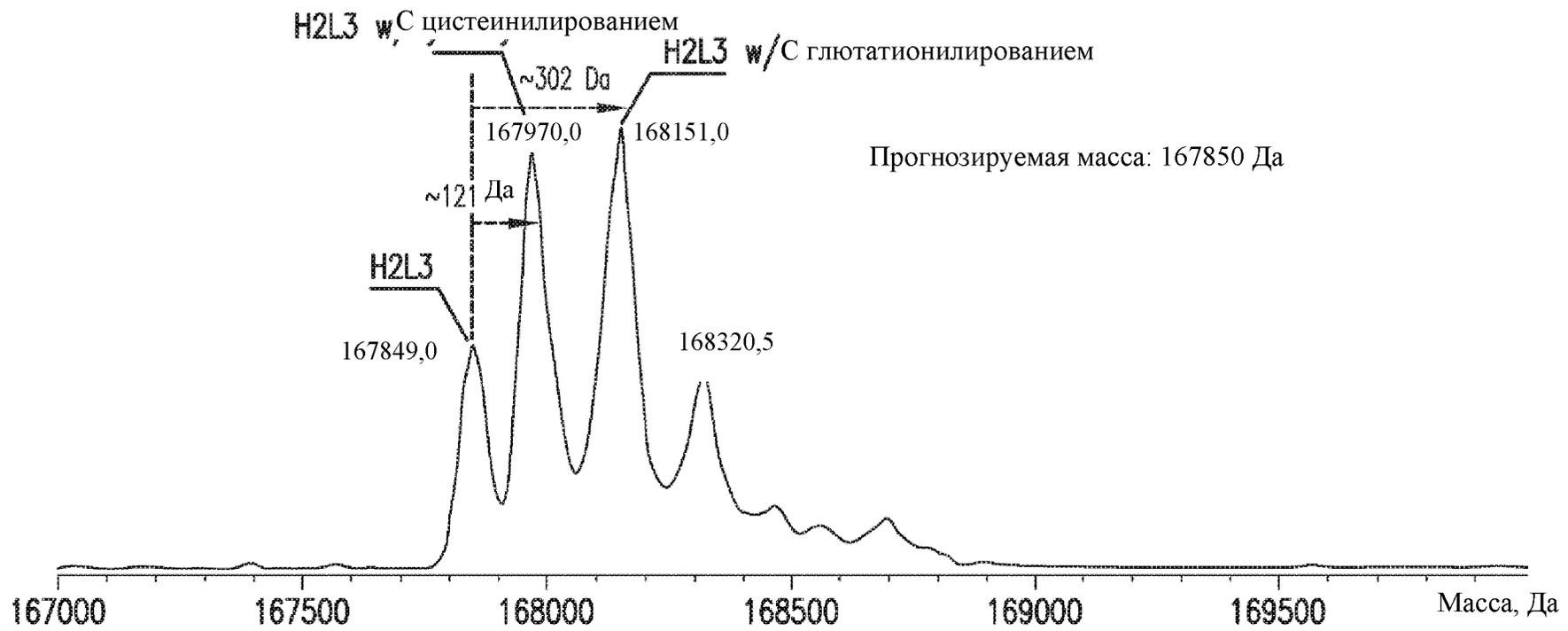
**ФИГ. 3А**



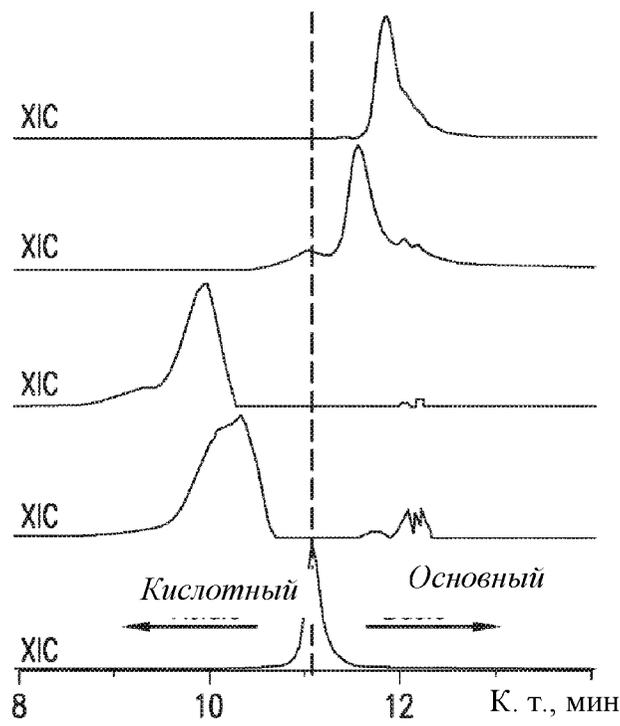
ФИГ. 4



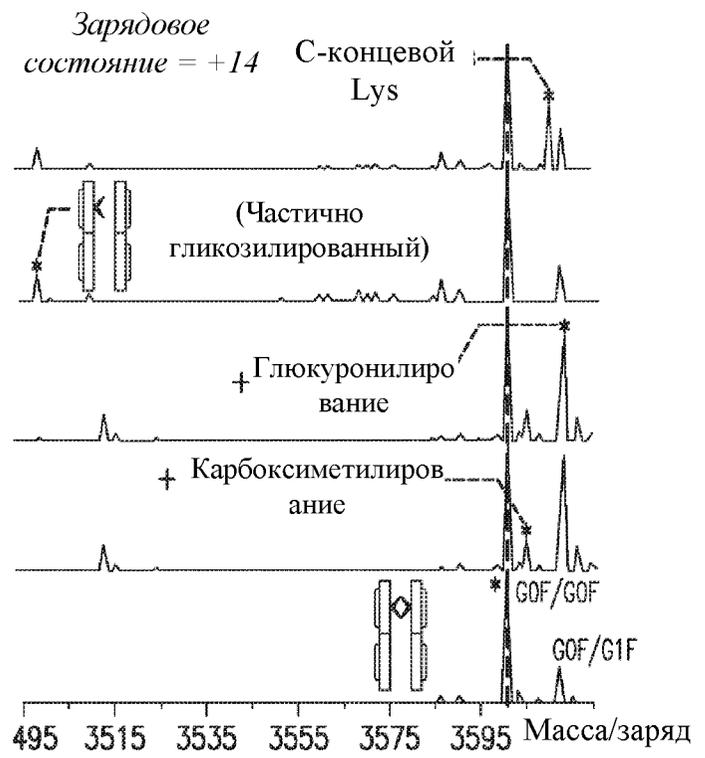




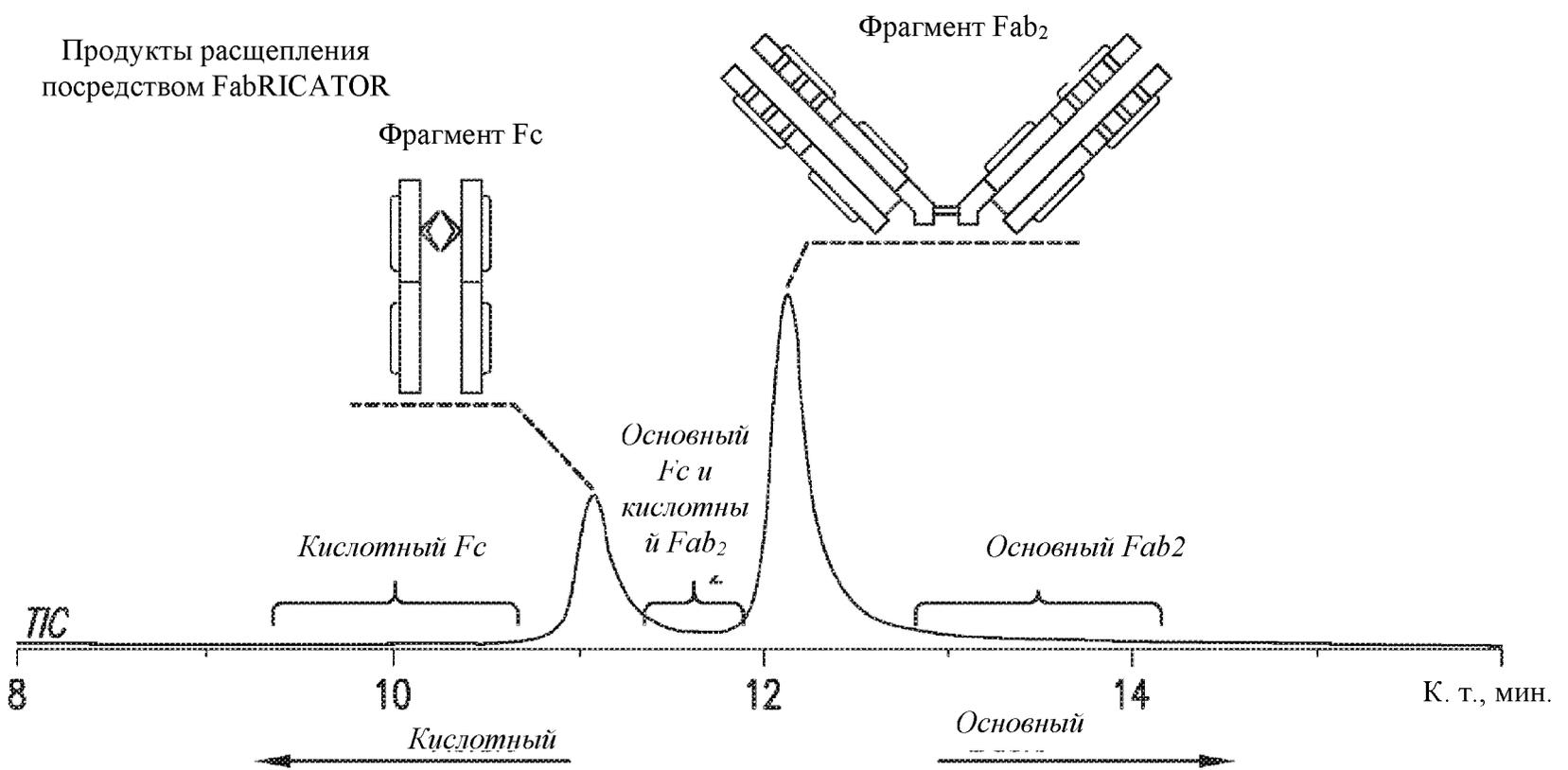
ФИГ. 6



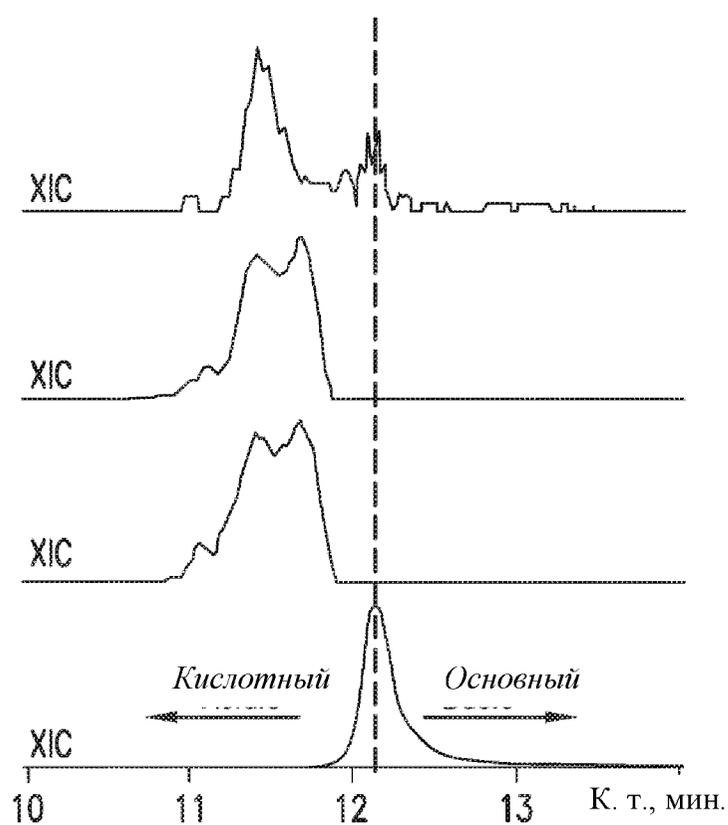
ФИГ. 7А



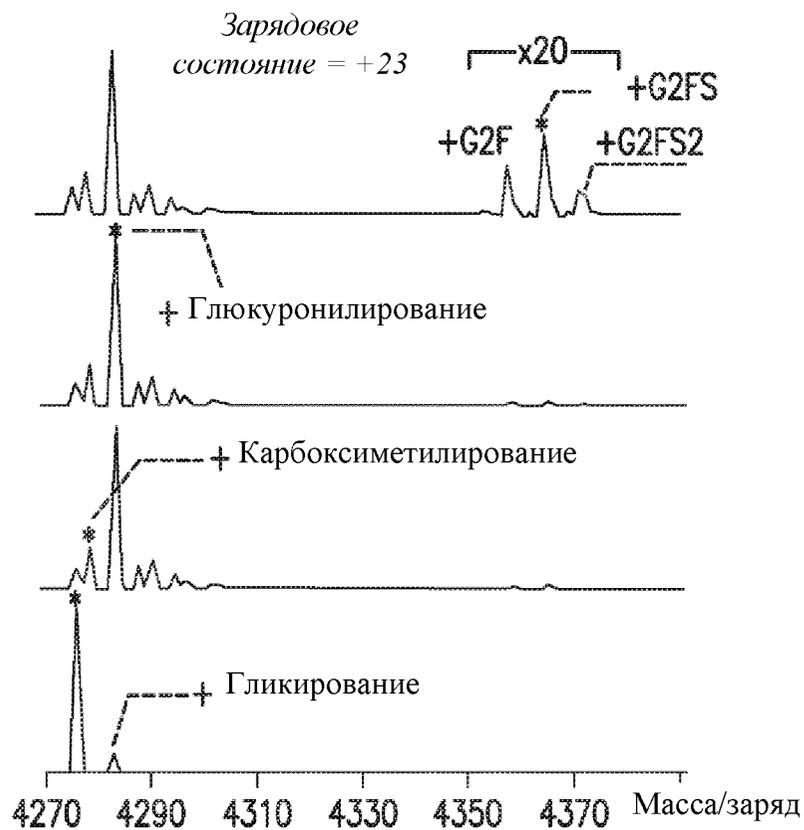
ФИГ. 7В



ФИГ. 8



ФИГ. 9А



ФИГ. 9В