

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА , ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (PCT)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности

Международное бюро

(43) Дата международной публикации
28 марта 2019 (28.03.2019)



W I P O I P C T



(1⁰) Но^ме^р международной публикации
WO 2019/059811 A 1

(51) Международная патентная классификация :
C12N 15/00 (2006.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(21) Номер международной заявки : PCT/RU20 18/000606

(22) Дата международной подачи :
14 сентября 2018 (14.09.2018)

(25) Язык подачи : Русский

(26) Язык публикации : Русский

(30) Данные о приоритете :
2017132524 19 сентября 2017 (19.09.2017) RU

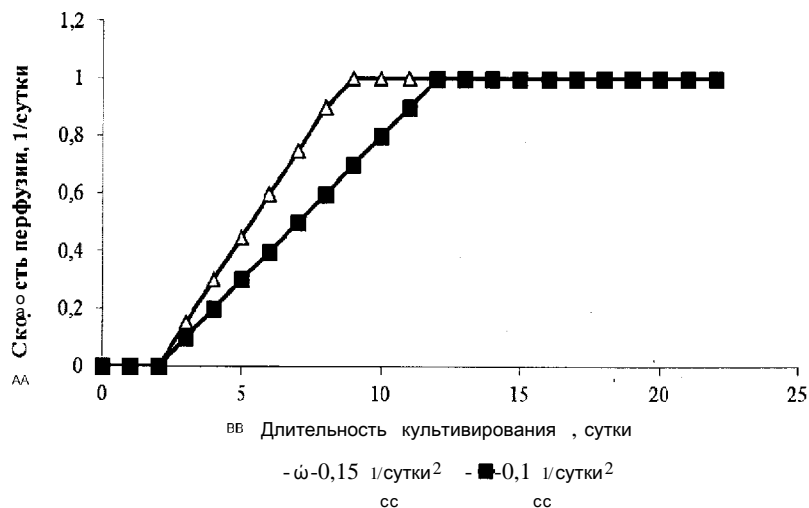
(71) Заявитель : ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕН -
НОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "МЕЖДУНАРОД -

НЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР "ГЕ-
НЕРИУМ " (LIMITED LIABILITY COMPANY
"INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGY CENTER
"GENERIUM") [RU/RU]; ул. Садовая -Триумфальная ,
4-10 Москва , 127006, Moscow (RU).

(72) Изобретатели : МОРОЗОВ , Антон Николаевич
(MOROZOV, Anton Nikolaevich); ул. Пришвина ,
9/2, кв. 226 Москва , 127549, Moscow (RU). ЗА-
ХАРОВ , Захар Викторович (ZAKHAROV, Zakhar
Viktorovich); ул. Кантемировская , 20, к. 1, кв. 49
Москва , 115409, Moscow (RU). ТЮПА , Дмитрий Ва-
лереьевич (TYUPA, Dmitry Valeryevich); ул. Гага-
рина , 10, кв. 190 Московская обл., г. Жуковский ,
140180, Moskovskaya obi, g. Zhukovsky (RU). КО-
ЧЕЛАБОВ , Роман Александрович (KOCHELABOV,
Roman Aleksandrovich); ул. Владимирская , 14 Пе-

(54) Title: METHOD OF PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES USING CONTINUOUS CULTURE OF CHO CELLS

(54) Название изобретения : СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК СНО



Фиг. 1

AA Perfusion rate, 1/day
BB Culture duration, day
CC 0.15 1/day²
CC 0.1 1/day²

(57) Abstract: The invention relates to pharmaceutical biotechnology and more particularly to methods of producing therapeutic antibodies. Proposed is a method of perfusion cell culture which allows production in industrial-scale volumes, in particular, of therapeutic antibodies with affinity towards complement component C5, and anti-IgE antibodies. Features for implementing the method include regulating the rate of flow of a culture medium in a reactor, which allows "ageing" of the cell culture to be slowed down, and regulating the discharge of cell suspension from the bioreactor, which allows the level of variation of critical glycans in the resulting antibodies to be reduced.

(57) Реферат : Изобретение относится к фармацевтической биотехнологии , более конкретно к способам получения терапевти -



WO 2019/059811 A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ
НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК СНО

- 5 Изобретение относится к фармацевтической биотехнологии . Предложен способ перфузионного культивирования клеток , позволяющий в промышленных объемах продуцировать антитела со сниженным уровнем варьирования критических гликанов , в частности , терапевтические антитела , аффинные к C5-компоненту комплемента , и анти-IgE антитела .
- 10 Термины и определения
- Фед-батч - культивирование микроорганизмов или культур клеток в периодическом режиме с подпиткой .
- Перфузия - разновидность непрерывного культивирования с частичным или полным отделением клеток от выходящего потока культуральной жидкости и
- 15 возвращением их в биореактор .
- Скорость перфузии - объем потока культуральной жидкости , может быть выражена в литрах в сутки (л/сутки , л*сутки⁻¹).
- Относительная скорость перфузии - количество объёмов реактора (N), сменяемых за сутки , Размерность определяется в относительных единицах как
- 20 N/сутки или N*сутки⁻¹
- Ускорение перфузии - изменение скорости перфузии за единицу времени , достигаемое путем увеличения скорости протока среды на начальном этапе перфузионного культивирования . Определяется как первая производная скорости перфузии , т.е. скорость перфузии , делённая на время , N/сутки², или N*сутки².
- 25 Удельная скорость перфузии (УСП) - отношение скорости протока питательной среды к концентрации клеток , измеряется в пиколитрах на клетку в сутки , пл/кл/сутки .
- Стационарная фаза перфузионного культивирования - фаза перфузионного процесса , в которой рост клеток в биореакторе скомпенсирован их отбором , так что
- 30 концентрация клеток в течение длительного времени поддерживается на определённом уровне с незначительными отклонениями .
- Блидинг - непрерывный или дискретный отбор суспензии клеток из биореактора в стационарной фазе перфузионного культивирования для

предотвращения перерастания культуры и недостатка питательных веществ, размерность определяется в относительных единицах - количество объемов реактора, отбираемых за сутки, $N \cdot \text{сутки}$."

Непрерывное культивирование клеток с применением перфузионных процессов - перспективный метод, используемый в промышленной биотехнологии при наработке в клетках различных белков, в том числе терапевтического назначения. В то же время короткий период применения перфузионных процессов в мире и, соответственно, недостаточная экспериментальная проверка особенностей способа, одновременно с появлением новых питательных сред, привели к появлению новой технической проблемы, обнаруженной авторами изобретения. Питательные среды более ранних поколений не оказывали большого влияния на процесс культивирования в широком диапазоне применяемых ускорений перфузии. Однако среды нового поколения, появившиеся относительно недавно, проявляют себя совсем по-другому. Различные ускорения перфузии вызывают различную реакцию культур клеток, довольно часто крайне негативную. Поэтому проблема оптимизации ускорения перфузии требует аккуратного обращения и тщательного исследования.

В настоящее время известно много различных модификаций процесса, и до сих пор неизвестен процесс, который с одинаковой эффективностью позволял бы продуцировать любой необходимый белок в любой культуре клеток, то есть выбор конечных условий способа продукции белка каждый раз является нетривиальной задачей, требующей синтеза различных методов и экспериментальной проверки новых способов.

Описание чертежей.

Фиг. 1. Графики изменения скорости потока среды при различных ускорениях перфузии.

Фиг. 2. Кривые роста культуры клеток СНО, экспрессирующей антитело, имеющее аминокислотную последовательность экулизумаба, при различных ускорениях перфузии.

Фиг. 3. Динамика изменения жизнеспособности культуры клеток СНО, экспрессирующей антитело, имеющее аминокислотную последовательность экулизумаба, при различных ускорениях перфузии.

Фиг . 5. Влияние скорости блидинга на содержание гликана Map 5 в целевом белке (и - 0,1* сутки ¹, □ —0,15* сутки ¹).

Фиг . 6. Влияние скорости блидинга на содержание гликана G0 в целевом белке (и - 0,1* сутки ¹, □ - 0,15 *сутки ¹).

5 Фиг . 7. Влияние скорости блидинга на продуктивность процесса перфузионного культивирования (ш - 0,1* сутки ¹, □ —0,15* сутки ¹).

Фиг . 4. Динамика продуктивности культуры клеток CHO , экспрессирующей антитело , имеющее аминокислотную последовательность экулизумаба , при различных ускорениях перфузии (ш - 0,1*сутки ², □ - 0,15 *сутки ²).

10 Фиг . 8. Кривые роста культуры клеток CHO , экспрессирующей антитело , имеющее аминокислотную последовательность омализумаба , при различных ускорениях перфузии .

Фиг . 9. Динамика продуктивности культуры клеток CHO , экспрессирующей антитело , имеющее аминокислотную последовательность омализумаба , при
15 различных ускорениях перфузии .

Задачей авторов изобретения являлась разработка высокопродуктивного способа производства в культуре животных клеток некоторых видов терапевтических антител , направленных к C5-компоненту комплемента , а также анти-IgE антител . В частности , таким способом могут быть получены экулизумаб , омализумаб и их
20 биоаналоги , содержащие аминокислотные последовательности , соответственно ,
SEQ ID №1 для биоаналогов экулизумаба :

	10	20	30	40	50	60
25	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYI FS	NYWIQWVRQA	PGQGLEWMGE	ILPGSGSTEY
	70	80	90	100	110	120
	TENFKDRVIM	TRDTSTSTVY	MELSSLRSED	TAVYYCARYF	FGSS PNWYFD	VWGQGTILTV
30	130	140	150	160	170	180
	SSASTKGPSV	FPLAPCSRST	SESTAALGCL	VKDYFPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ
	190	200	210	220	230	240
	SSGLYSLSV	VTVPSSNFGT	QTYTCNVDHK	PSNTKVDKTV	ERKCCVECPE	CPAPPVAGPS
35	250	260	270	280	290	300
	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSQE	DPEVQFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQFNST
	310	320	330	340	350	360
40	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKGLP	SS I EKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSQEEMT
	370	380	390	400	410	420
	KNQVSLTCLV	KGFYPDIAV	EWESNGQPE	NYKTTTPVLD	SDGS FFLYSR	LTVDKSRWQE

	430	440	450	460	470	480
	GNVFSCSVMH	EALHNNHYTQK	SLSLSLGKDI	QMTQSPSSLS	ASVGDRVITIT	CGASENIYGA
5	490	500	510	520	530	540
	LNWYQQKPGK	APKLLI YGAT	NLADGVPSRF	SGSGSGTDFE	LTISLQPED	FATYYCQNL
	550	560	570	580	590	600
10	NTPLTFGQGT	KVEIKRTVAA	PSVFIFPPSD	EQLKSGTASV	VCLLNNFYPR	EAKVQWKVDN
	610	620	630	640	650	660
	ALQSGNSQES	VTEQDSKDST	YLSSTLTLS	KADYKHKVY	ACEVTHQGLS	SPVTKSFNRG
15	EC					
и SEQ ID № 2, для биоаналогов омализумаба :						
	10	20	30	40	50	60
	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY
20	70	80	90	100	110	120
	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHFAV	WGQGTLVTVS
	130	140	150	160	170	180
25	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV	KDYFPEPVTV	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS
	190	200	210	220	230	240
	SGLYSLSSV	TVPSSSLGTQ	TYICNVNHKP	SNTKVDKKVE	PKSCDKTHTC	PPCPAPELLG
30	250	260	270	280	290	300
	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY
	310	320	330	340	350	360
	NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP	QVYTLPPSRE
35	370	380	390	400	410	420
	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTTTP	VLDSGGSFFL	YSKLTVDKSR
	430	440	450	460	470	480
40	WQQGNVFSCS	VMHEALHNNHY	TQKSLSLSPG	KDIQLTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSV
	490	500	510	520	530	540
	DYDGSYMNW	YQQKPGKAPK	LLIYAASYLE	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT
	550	560	570	580	590	600
45	YYCQSHEDP	YTFGQGTKVE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL	KSGTASVCL	LNNFYPREAK
	610	620	630	640	650	660
	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDYSL	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	VTHQGLSSPV
50	TKSFNRGEC					

Из уровня техники известны следующие решения, раскрывающие перфузионное культивирование клеток для продукции в них терапевтических антител.

Документ CN104845880A раскрывает устройство и способ получения анти-IgE антител с помощью непрерывного перфузионного культивирования клеток CHO. Для стабилизации физиологического состояния культуры, и, как следствие, стабилизации всего процесса культивирования, используется контролируемый отбор суспензии

5 клеток из биореактора. Недостатком способа является относительно низкая продуктивность процесса, обусловленная высокой удельной скоростью роста клеток ($\mu=0,34 \text{ сут}^{-1}$), при которой их специфическая продуктивность далека от максимальной. Таким образом, при высоком расходе питательной среды, продуктивность процесса относительно низкая.

10 Публикация «Оптимизация ускорения перфузии - ключевой этап разработки высокопроизводительного перфузионного культивирования клеток CHO. (Морозов А.Н. и др. Биотехнология, 2016: 60-67)» раскрывает способ оптимизации непрерывного культивирования клеток CHO, экспрессирующих моноклональные антитела нейтрализующего действия, к которым относятся, в частности, омализумаб,

15 экулизумаб и адалимумаб. В эксперименте показано, что медленное ускорение перфузии ($0,1 \cdot \text{сутки}^{-2}$) приводит к существенному подавлению пролиферации клеток, увеличению их объёма (гипертрофии клеток), увеличению специфической продуктивности и, одновременно, изменению профиля гликозилирования антитела таким образом, что может увеличиваться его антителозависимая

20 цитотоксичность (ADCC), а фармакокинетические свойства целевой молекулы могут изменяться в сторону снижения времени полувыведения. Эти изменения являются нежелательными и могут сделать процесс культивирования непригодным для промышленного использования.

Документ US20140255993A1 раскрывает режимы перфузионного

25 культивирования клеток CHO, при которых в определённый момент (перед или во время продукционной фазы) происходит арест клеточного цикла и подавление пролиферации клеток, влекущие за собой повышение специфической продуктивности клеток и увеличение тотального выхода целевого белка. Арест клеточного цикла достигается за счёт ограничения содержания в питательной среде аминокислоты

30 аспарагин (не более 5 ммоль/л).

К недостаткам способа можно отнести необходимость индивидуального подбора оптимальной концентрации аспарагина для каждой клеточной линии -

5 продуцента ; потенциальную нечувствительность некоторых клеточных линий к данному техническому решению снижение жизнеспособности культуры клеток , полученной таким способом , в ходе процесса культивирования , что может негативным образом сказываться на технологии и качестве продукта . Возможны проблемы с осветляющей фильтрацией вследствие большого количества клеточного 5 дебриса ; высокий уровень примесей белков клетки -хозяина и необходимость введения дополнительных этапов хроматографической очистки ; усиленный протеолиз целевого белка .

10 Различные варианты перфузионного культивирования раскрыты также в документах WO2004097006A1, WO2005095578A1, WO2009023562A2, US 2016/0281044 A 1, WO2014059035A1.

15 Наиболее близкими аналогами заявленного изобретения можно считать решение CN104845880A, раскрывающее получение анти -IgE антител в перфузионном режиме культивирования , способ получения моноклональных антител с помощью непрерывного культивирования в клетках CHO (линия immortalized клеток яичника китайского хомячка) с повышенной специфической продуктивностью при 20 существенном подавлении их пролиферации (Морозов А.Н., и др., Биотехнология , 2016: 60-67.), а также способ , раскрытый в US20140255993A1, где в ходе перфузии клетки CHO , экспрессирующие рекомбинантные белки , перестают пролиферировать вследствие низкой концентрации аспарагина в питательной среде , что влечёт за собой увеличение удельной продуктивности клеток и общего выхода продукта .

25 Недостатки способа , раскрытого в документе CN104845880A, связаны с более низкой концентрацией целевого белка в культуральной жидкости при культивировании клеток CHO в режиме перфузии по сравнению с периодическими (фед-батч) процессами . Как следствие , больше ресурсов требуется для приготовления , использования , хранения и утилизации питательных сред , особенно , при осуществлении длительного перфузионного процесса . Расходы на среды и подпитки существенно выше , чем для фед-батч процессов . Для решения этой проблемы необходимо увеличивать концентрацию целевого белка в культуральной жидкости . 30 Одним из способов это сделать является увеличение специфической продуктивности клеток CHO , которое достигается , в частности , подавлением клеточной

пролиферации и поддержанием культуры в таком состоянии в течение длительного времени при сохранении высокой жизнеспособности .

В предложенном решении подавление пролиферации и увеличение специфической продуктивности клеток достигается за счёт использования малых значений ускорения перфузии на этапе накопления биомассы . Стабильность 5 состояния клеток обеспечивается непрерывным отводом из биореактора суспензии клеток со скоростью от $0,1 \cdot \text{сутки}^{-1}$ до $0,15 \cdot \text{сутки}^{-1}$. В данном случае не требуется использования специальных дефицитных сред, не требуется мониторинг отдельных компонентов , таких как аминокислоты . Низкие скорости потока питательной среды с самого начала процесса культивирования обеспечивают низкую удельную скорость 10 роста и существенное подавление пролиферации клеток в продукционной фазе процесса (удельная скорость роста не превышает $0,15/\text{сутки}$). При этом достигается новый технический результат - повышение жизнеспособности клеток до 95% и выше на всём протяжении процесса культивирования , в противоположность примерам из патента Amgen (US20140255993A1).

В публикации Морозова и др. раскрыт сходный метод культивирования , однако применение данного метода приводит к существенному отклонению биологической активности экспрессируемого целевого белка от заданных за счет 15 изменения его гликозилирования . Данный недостаток устранен в предложенном техническом решении за счет внесения ряда изменений в процесс культивирования . В частности , изменена скорость отбора клеточной суспензии из биореактора , что привело к стабилизации профиля гликозилирования целевого белка . Отбор клеточной суспензии из биореактора - т.н. блидинг - позволяет предотвратить недостаток питательных веществ и увеличить стабильность ростовых и продукционных 20 характеристик культуры клеток .

Авторы изобретения нашли оптимальные режимы ускорения перфузии , позволяющие достигнуть максимальной продуктивности клеток . Ускорение перфузии регулируется за счет изменения скорости подачи свежей питательной среды в биореактор и скорости отбора отработанной среды из биореактора от минимального 30 до максимального в ходе начального этапа перфузионного культивирования . Ускорение перфузии играет важную роль в установлении эффективного , высокопродуктивного процесса перфузионного культивирования . Было установлено ,

что ускорение перфузии более $0,15 \cdot \text{сут}^{-2}$ приводит к интенсивному росту культуры, малому времени удвоения и быстрому достижению пиковых концентраций клеток. Специфическая продуктивность таких клеток находилась на среднем уровне (около $10 \text{ пкг} / \text{кл} / \text{сут}$). Жизнеспособность при ускорении выше $0,25 \cdot \text{сут}^{-2}$ после достижения пиковой концентрации снижалась до 80-85%.

Ускорение перфузии менее $0,12 \cdot \text{сут}^{-2}$ не вызывало падения жизнеспособности клеток, которая оставалась высокой в течение всего процесса (выше 95%). Кроме того, при данных режимах существенно снижалась скорость пролиферации и увеличивалась специфическая продуктивность клеток (до $20 \text{ пкг} / \text{кл} / \text{сут}$).

Варьирование ускорения перфузии для достижения эффективного, высокопродуктивного процесса культивирования ранее не было раскрыто в уровне техники.

Материалы и методы

В качестве модели для изучения использовались варианты клеточной линии CHO, экспрессирующие моноклональные антитела, являющиеся биоаналогами терапевтических антител - омализумаба, экулизумаба и адалимумаба.

Клетки выращивали в шейкере-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (Kuhner, Швейцария) в колбах Эрленмейера на коммерческой питательной среде BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific, США), содержащей 6 мМ L-глутамин (Applichem, Германия) при 37°C , $5\% \text{ CO}_2$, 90 об/мин . Полученный инокулят вносили в биореактор, содержащий питательную среду того же состава. Состав питательной среды для перфузии: $90\% \text{ BalanCD CHO Growth A}$, $10\% \text{ BalanCD CHO Feed 3}$ (Irvine Scientific), 6 мМ L-глутамин.

Перфузионное культивирование клеток осуществляли в одноразовых биореакторах волнового типа Sartorius Flexsafe 10L perfusion (Sartorius, Германия) со встроенной перфузионной мембраной. Рабочий объем суспензии составлял $3,0 \text{ л}$. Посевная концентрация клеток - $0,5 \pm 0,1 \text{ млн} / \text{мл}$.

Концентрацию растворенного кислорода в биореакторах поддерживали на уровне 50% от насыщения. Расход газовой смеси составлял $0,3 \text{ л/мин}$. Также осуществляли рН-статирование на уровне $6,9$ в течение всего процесса культивирования с помощью подачи CO_2 или 5% -го раствора гидроксида натрия. Частота качания платформы с биореактором находилась в диапазоне $22-28 \text{ кач/мин}$.

Угол наклона платформы составлял 6° . Температура культивирования в фазе роста - 37°C . При достижении скорости перфузии $0,5^*\text{сутки}^{-1}$ осуществляли снижение температуры до 34°C . Максимальная скорость перфузии составляла $1,0^*\text{сутки}^{-1}$. Перфузия начиналась с третьих суток культивирования.

5 Исследовали два разных режима ускорения перфузии : $0,1^*\text{сут}^{-2}$ и $0,15^*\text{сут}^{-2}$. Скорость блидинга составляла $0,1^*\text{сутки}^{-1}$ и $0,15^*\text{сутки}^{-1}$.

Определение концентрации антител в культуральной жидкости проводили путем выделения целевого белка на аффинном сорбенте MabSelect (GE Healthcare, Швеция) и измерения его количества на спектрофотометре BioPhotometer Plus (Eppendorf, Германия) при длине волны 280 нм с использованием расчетного коэффициента экстинкции .

Анализ профиля гликозилирования целевого белка проводили с использованием системы ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США) с детектором Multi λ Fluorescence Detector 2475 (Waters) на колонке TSKgel Amide-80 (Tosoh Corporation, Япония).

15 Авторы изобретения обнаружили , что культуры клеток , экспрессирующие аффинные к С5 компоненту комплемента моноклональные антитела или анти-IgE антитела при ускорении перфузии , равном $0,1^*\text{сут}^{-2}$, отводом из биореактора суспензии клеток со скоростью от $0,1^*\text{сутки}^{-1}$ до $0,15^*\text{сутки}^{-1}$, достигли в 1,5 - 2 раза более высокой специфической продуктивности , чем в контроле при $0,15^*\text{сут}^{-2}$, вкпе
20 с высокой жизнеспособностью (более 95%), а также показали способность к длительному нахождению в продукционной фазе перфузионного культивирования . Высокая специфическая продуктивность достигается за счёт подавления пролиферативной активности клеток . За счет изменения блидинга значительно снижено варьирование критических гликанов и экспрессируемый клетками целевой
25 белок обладает стабильным профилем гликозирования в течение всего процесса культивирования . Данный технический результат позволяет обеспечить высокую специфичность и биологическую активность получаемых антител , необходимую для включения их в состав терапевтических препаратов .

Приведенные примеры демонстрируют возможности применения способа для
30 продукции различных видов антител в различных режимах . Пользуясь раскрытыми в описании данными и закономерностями , найденными авторами , квалифицированный

специалист легко может применять данный способ для наработки различных видов терапевтических антител в культуре эукариотических клеток .

Пример 1

В качестве примера 1 приведены два режима ускорения перфузии - $0,1^* \text{сут}^{-2}$ и $0,15^* \text{сут}^{-2}$ для продуцента антитела , содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID №1 (последовательность экулизумаба), и аффинного к C5- компоненту комплемента .

Клетки CHO , экспрессирующие данное моноклональное антитело , выращивали в шейкере -инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (Kuhner, Швейцария) в колбах Эрленмейера на коммерческой питательной среде BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific, США), содержащей 6 мМ L-глутамин (Applichem, Германия) при 37°C , 5% CO_2 , 90 об/мин . Полученный инокулят вносили в биореактор , содержащий питательную среду того же состава . Состав питательной среды для перфузии : 90% BalanCD CHO Growth A, 10% BalanCD CHO Feed 3 (Irvine Scientific), 6мМ L-глутамин .

Перфузионное культивирование клеток осуществляли в одноразовых биореакторах волнового типа Sartorius Flexsafe RM 10L perfusion pro 1,2 my (Sartorius, Германия) со встроенной перфузионной мембраной . Рабочий объем суспензии составлял 3,0 л. Посевная концентрация клеток - $0,5 \pm 0,1$ млн /мл .

Концентрацию растворённого кислорода в биореакторах поддерживали на уровне 50% от насыщения . Расход газовой смеси составлял 0,3 л/мин . Также осуществляли рН-статирование на уровне 6,9 в течение всего процесса культивирования с помощью подачи CO_2 или 5%-го раствора гидроксида натрия . Частота качания платформы с биореактором находилась в диапазоне 22-28 кач /мин . Угол наклона платформы составлял 6° . Температура культивирования в фазе роста - 37°C . При достижении скорости перфузии $0,5^* \text{сутки}^{-1}$ осуществляли снижение температуры до 34°C . Максимальная скорость перфузии составляла $1,0^* \text{сутки}^{-1}$. Перфузия начиналась с третьих суток культивирования .

Использовано два режима ускорения перфузии : $0,1^* \text{сут}^{-2}$ и $0,15^* \text{сут}^{-2}$. Скорость блидинга составляла $0,1^* \text{сутки}^{-1}$ и $0,15^* \text{сутки}^{-1}$.

Из фиг. 2 и фиг. 4 видно , что меньшее значение ускорения замедляет пролиферацию клеток и увеличивает их продуктивность . Из фиг. 3 видно , что

замедление пролиферации сопровождается сохранением высокой жизнеспособности клеток .

Пример 2

В рамках следующего эксперимента были проведены два культивирования .
5 Условия эксперимента те же, что в примере 1, за исключением ускорения перфузии и скорости блидинга . В обоих вариантах ускорение перфузии имело одинаковое значение - $0,1 \cdot \text{сут}^{-2}$; скорость блидинга составляла в первом варианте $0,1 \cdot \text{сутки}^{-1}$, во втором - $0,15 \cdot \text{сутки}^{-1}$.

На фиг . 5 и фиг . 6 приведены данные по динамике изменения доли пиков Map 5
10 и GO в профиле гликозилирования целевого белка в зависимости от применяемой скорости блидинга . Можно заметить , что при скорости блидинга $0,15 \cdot \text{сут}^{-1}$ доля пиков Map 5 и GO меняется в ходе процесса культивирования не более чем в 2 раза . В то же время при скорости блидинга $0,1 \cdot \text{сут}^{-1}$ наблюдается негативная динамика в профиле гликозилирования антитела : доля гликана GO выросла по ходу
15 культивирования более чем в 6 раз , Map 5 - более чем в 5 раз .

На фиг . 7 приведены данные по продуктивности двух процессов
культивирования , из которых видно , что при увеличении скорости блидинга с $0,1 \cdot \text{сут}^{-1}$ до $0,15 \cdot \text{сут}^{-1}$ не происходит существенного падения выхода целевого белка .

Пример 3

20 В рамках следующего эксперимента были проведены два культивирования .
Условия эксперимента те же, что в примере 1, за исключением используемой линии клеток . В данном примере использовалась линия клеток CHO , экспрессирующая моноклональное антитело к IgE, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID№2 (последовательность омализумаба) .

25 На фиг . 8 можно видеть , что при ускорении перфузии $0,1 \cdot \text{сут}^{-2}$ на 10-12-ые
сутки происходит значительное подавление пролиферации клеток , и удельная скорость их роста падает до значений , сопоставимых со скоростью блидинга (около $0,1 \cdot \text{сут}^{-1}$ - $0,15 \cdot \text{сут}^{-1}$). При ускорении перфузии $0,15 \cdot \text{сут}^{-2}$ пролиферация клеток более интенсивная , а максимальная их концентрация достигает значения $67 \text{ млн} / \text{мл}$, что в
30 1,5 раза превосходит максимальную концентрацию в процессе с ускорением перфузии $0,1 \cdot \text{сут}^{-2}$ ($43 \text{ млн} / \text{мл}$). Специфическая продуктивность клеток в процессе с ускорением перфузии $0,1 \cdot \text{сут}^{-2}$ в продукционной фазе в 2,2 раза превышает

специфическую продуктивность, наблюдаемую в процессе с ускорением перфузии $0,15^* \text{сут}^{-2}$ (фиг. 9).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 5 I. Способ непрерывного культивирования эукариотических клеток , отличающийся тем, что ускорение перфузии находится в диапазоне от $0,1^*$ сутки⁻² до $0,12^*$ сутки⁻², и отвод суспензии клеток из биореактора осуществляют со скоростью от $0,1^*$ сутки⁻¹ до $0,15^*$ сутки⁻¹.
2. Способ по п. 1, где ускорение перфузии происходит со скоростью $0,1^*$ сутки⁻².
3. Способ по п. 1, где отвод суспензии клеток из биореактора осуществляют со скоростью $0,15^*$ сутки⁻¹.
- 10 4. Способ по п. 1, где клетки представляют собой линию клеток яичника китайского хомячка CHO .
5. Способ по п. 1, где посевная концентрация клеток составляет $0,5 \pm 0,1$ млн/мл.
6. Способ по п. 1, где линия клеток является продуцентом антител .
- 15 7. Способ по любому из пп. 1-6, где линия клеток продуцирует антитело , содержащее последовательность аминокислот , которая представляет собой последовательность SEQ ID №1 .
8. Способ по любому из пп. 1-6, где линия клеток продуцирует антитело , содержащее последовательность аминокислот , которая представляет собой
- 20 последовательность SEQ ID N°2 .
9. Способ по любому из пп. 1-6, где линия клеток продуцирует экулизумаб .
10. Способ по любому из пп. 1-6, где линия клеток продуцирует омализумаб .
- II. Способ по любому из пп. 1-6, где линия клеток продуцирует антитело , специфичное к C5 компоненту комплемента .
- 25 12. Способ по любому из пп. 1-6, где линия клеток продуцирует антитело , специфичное к IgE.
13. Применение способа по п.1 для продукции терапевтических антител в эукариотических клетках .
14. Применение по п. 13, где эукариотические клетки представляют собой
- 30 линию клеток яичника китайского хомячка CHO .
15. Применение по п.13, где терапевтическим антителом является экулизумаб .
16. Применение по п.13, где терапевтическим антителом является омализумаб .

17. Применение по п.13, где терапевтическое антитело специфично к С5 компоненту комплемента .

18. Применение по п.13, где терапевтическое антитело специфично к IgE.

19. Применение по п.13, где терапевтическое антитело содержит последовательность аминокислот , которая представляет собой последовательность SEQ ID №1.

20. Применение по п.13, где терапевтическое антитело содержит последовательность аминокислот , которая представляет собой последовательность SEQ ID J&Z.

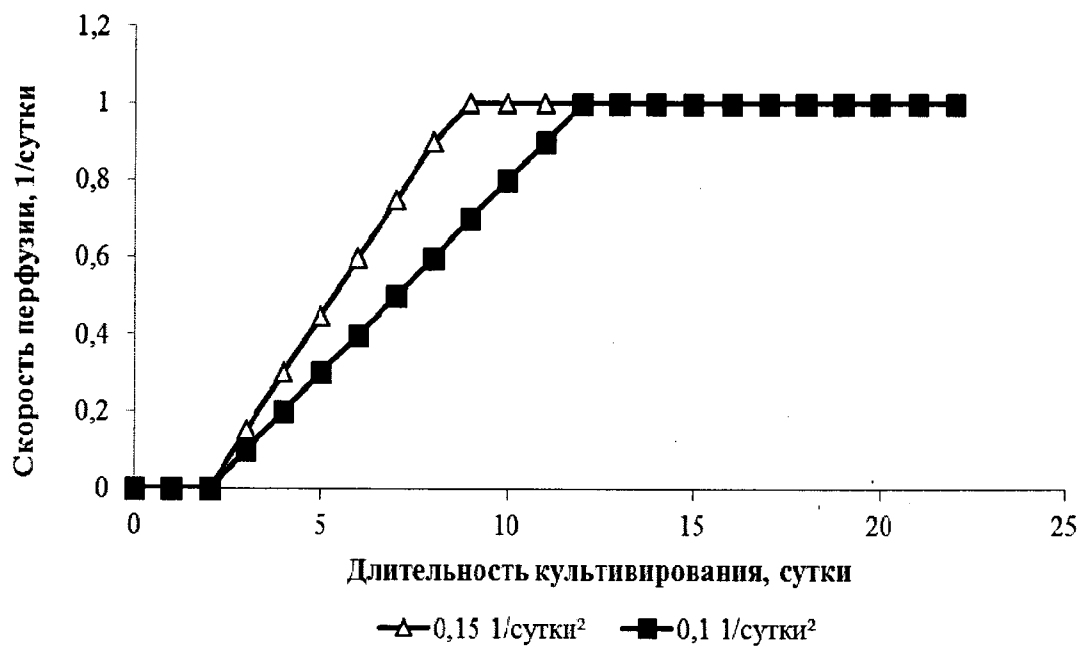
21. Применение по п.13, где достигается специфическая продуктивность клеток до 20 пкг /кл/сут .

15

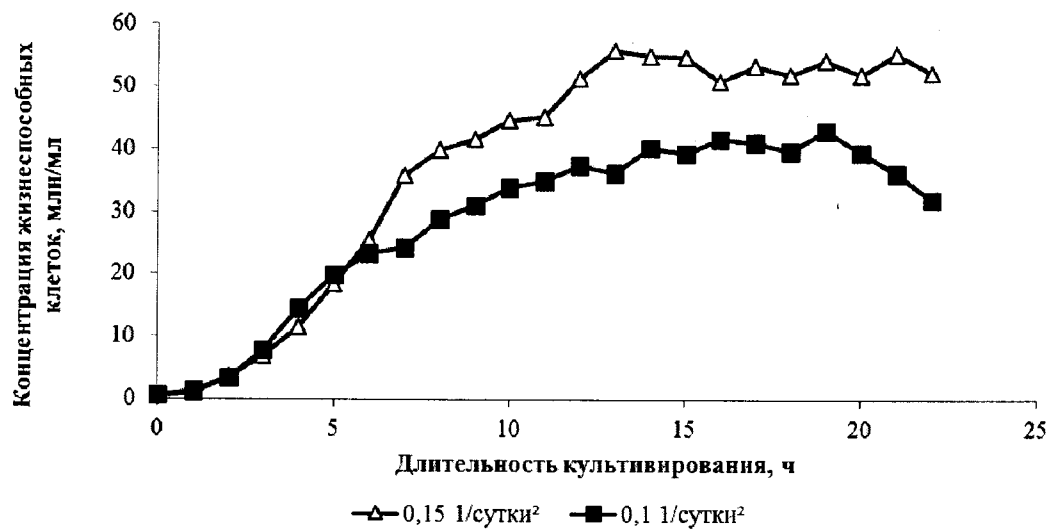
20

25

1/9

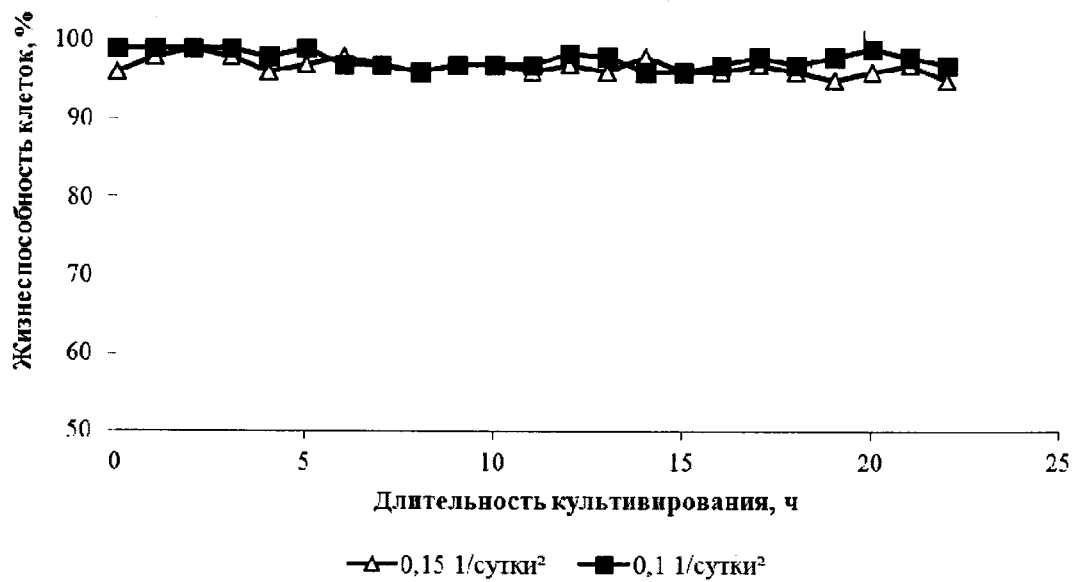


Фиг. 1

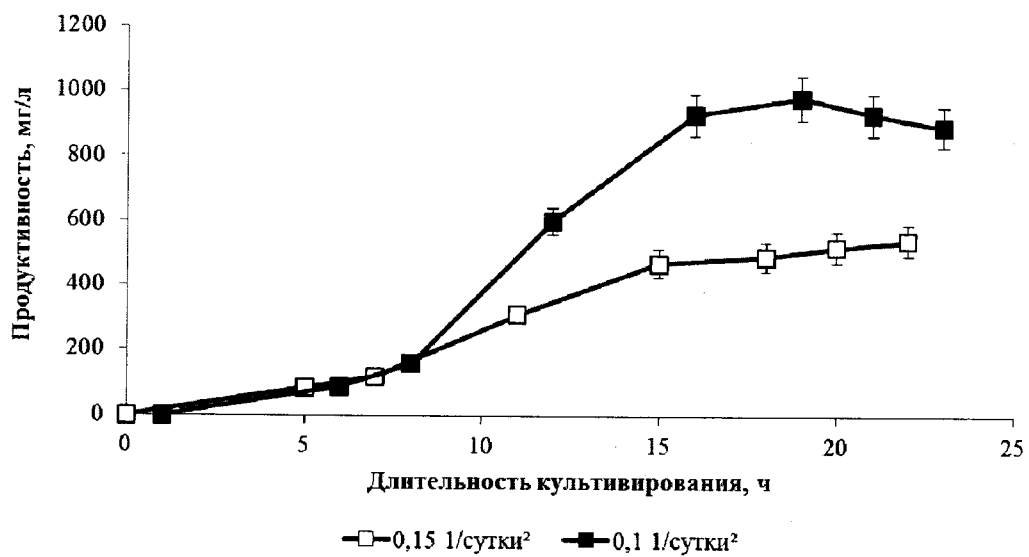


Фиг. 2

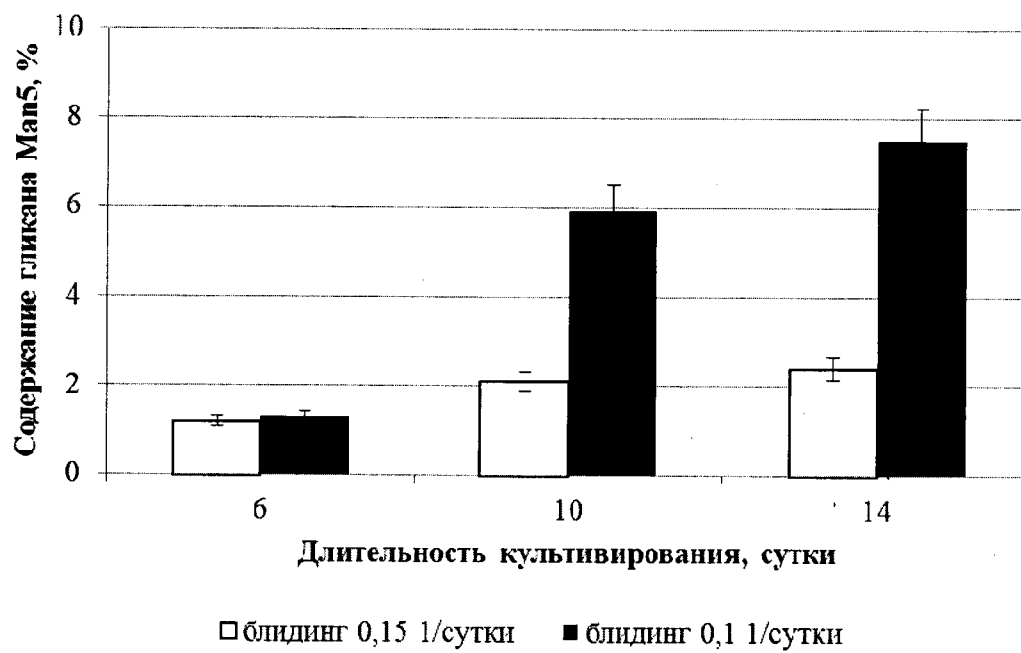
3/9



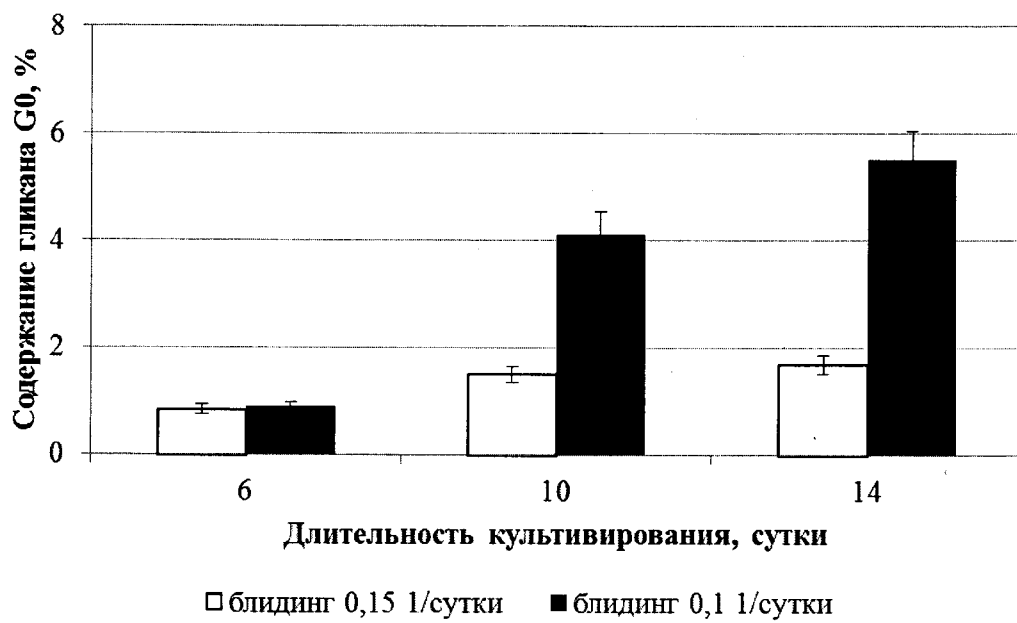
Фиг. 3



Фиг. 4

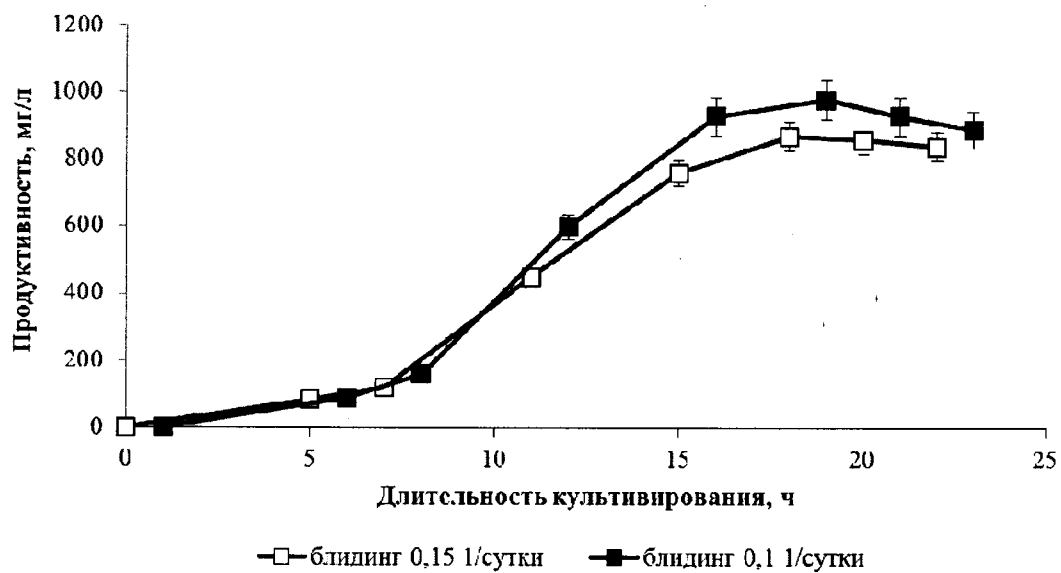


Фиг. 5

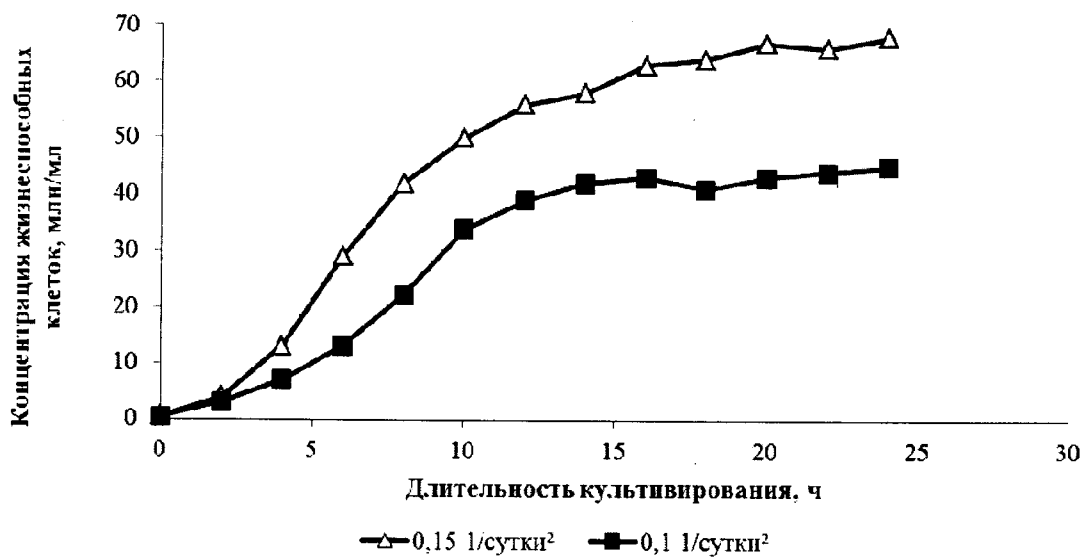


Фиг. 6

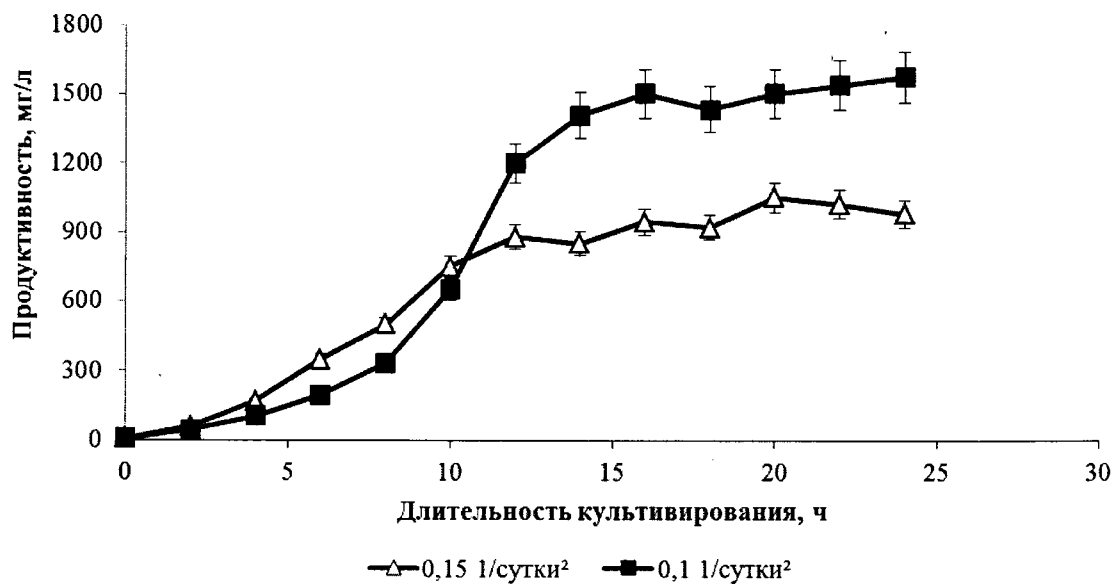
7/9



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2018/000606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
	<i>E12IS 15/00</i> (2006.01) <i>C07K 16/42</i> (2006.01)	<i>C12P 21/08</i> (2006.01) <i>C12N 5/02</i> (2006.01) <i>C07K 16/18</i> (2006.01)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N,C07K,C12P,C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
PatSearch (RUPTO internal), Espacenet, PAJ, USPTO		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOROZOV A.N. et al. Optimizatsia uskorenia perfuzii - kliuchevoi etap razrabotki vysokoproizvoditelnogo perfuzionnogo kultivirovania kletok SNO. Biotekhnologia. 2016; 32(4):60-67; p. 60-62	1-6, 13,14,21
Y		7-12, 15-20
Y	WO 2015/105609 A1 (AMGEN INC) 16.07.2015; p. 30,31	7-12, 15-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 November 2018 (28.11.2018)		10 January 2019 (10.01.2019)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p style="text-align: center;"><i>C12N 15/00 (2006.01)</i> <i>C07K 16/42 (2006.01)</i> <i>C12P 21/08 (2006.01)</i> <i>C12N 5/02 (2006.01)</i> <i>C07K 16/18 (2006.01)</i></p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>														
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">C12N,C07K,C12P,C12N</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">PatSearch (RUPTO internal), Espacenet, PAJ, USPTO</p>														
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Категория *</th> <th style="width: 70%;">Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th style="width: 20%;">Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>МОРОЗОВ А.Н. и др. Оптимизация ускорения перфузии - ключевой этап разработки высокопроизводительного перфузионного культивирования клеток СНО. Биотехнология. 2016; 32(4):60-67; с. 60-62</td> <td style="text-align: center;">1-6, 13,14,21</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td></td> <td style="text-align: center;">7-12, 15-20</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>WO 2015/105609 A 1 (AMGEN INC) 16.07.2015; с. 30,3 1</td> <td style="text-align: center;">7-12, 15-20</td> </tr> </tbody> </table>			Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	X	МОРОЗОВ А.Н. и др. Оптимизация ускорения перфузии - ключевой этап разработки высокопроизводительного перфузионного культивирования клеток СНО. Биотехнология. 2016; 32(4):60-67; с. 60-62	1-6, 13,14,21	Y		7-12, 15-20	Y	WO 2015/105609 A 1 (AMGEN INC) 16.07.2015; с. 30,3 1	7-12, 15-20
Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №												
X	МОРОЗОВ А.Н. и др. Оптимизация ускорения перфузии - ключевой этап разработки высокопроизводительного перфузионного культивирования клеток СНО. Биотехнология. 2016; 32(4):60-67; с. 60-62	1-6, 13,14,21												
Y		7-12, 15-20												
Y	WO 2015/105609 A 1 (AMGEN INC) 16.07.2015; с. 30,3 1	7-12, 15-20												
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах -аналогах указаны в приложении</p>														
<p>* Особые категории ссылочных документов :</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>"&" документ, являющийся патенте м-аналогом</p> </td> </tr> </table>			<p>"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>	<p>"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>"&" документ, являющийся патенте м-аналогом</p>										
<p>"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>	<p>"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>"&" документ, являющийся патенте м-аналогом</p>													
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">28 ноября 2018 (28.11.2018)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">10 января 2019 (10.01.2019)</p>												
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП -3, Россия, 125993 Факс : (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>		<p>Уполномоченное лицо :</p> <p style="text-align: center;">Горшков -Кантакузен В.А.</p> <p>Телефон № (8 499) 240-25-91</p>												