

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092576 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.05

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.30

(54) АНТИТЕЛА С МОДУЛИРОВАННЫМИ ГЛИКАНОВЫМИ ПРОФИЛЯМИ

(31) 62/665,045

(32) 2018.05.01

(33) US

(86) PCT/US2019/029850

(87) WO 2019/213043 2019.11.07

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

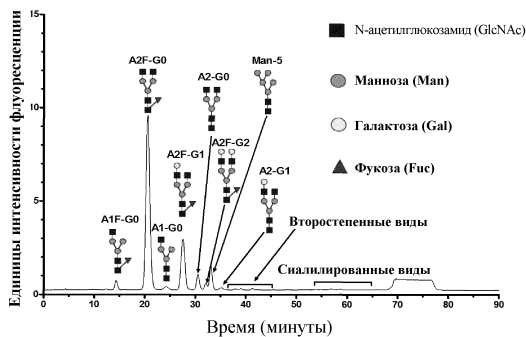
(72) Изобретатель:

Кроуэлл Кристофер Кеннион, У
Цзянь, Наджи Афина Дениз, Китчен
Нил Энтони, Гиллеспи Элисон
Джин, Петрован Симина Крина,
Бранденштейн Майкл Чарльз (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантно экспрессируемым молекулам деносумаба и способам модулирования гликановых профилей молекул деносумаба.



A1

202092576

202092576

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565512EA/026

АНТИТЕЛА С МОДУЛИРОВАННЫМИ ГЛИКАНОВЫМИ ПРОФИЛЯМИ РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии со статьей 35 USC. § 119 (e) по предварительной заявке США №: 62/665045, поданной 1 мая 2018 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[2] Настоящее изобретение относится к рекомбинантно экспрессируемым антителам и способам модулирования гликановых профилей таких антител.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[3] Структура и состав гликановых фрагментов гликопротеина могут влиять на безопасность и эффективность терапевтических белков, в том числе их иммуногенность, растворимость и период полувыведения. Белки, вырабатываемые в культурах клеток млекопитающих, могут содержать различные уровни гликоформ с высоким содержанием маннозы, например, манноза₅ (Man-5), манноза₆ (Man-6), манноза₇ (Man-7), манноза₈ (Man-8) и манноза₉ (Man-9). Антитела с высоким содержанием маннозы вызывают интерес из-за различий в терапевтических действиях и скоростях клиренса, проявляемых антителами, несущими гликаны Man-5 и гликаны Man-7, 8 или 9. Например, антитела с высоким содержанием маннозы, которые были получены при обработке кифунензином, показали более высокую активность в отношении ADCC и большую аффинность к FcγR3A (Zhou et al., (2008), *Biotechnol Bioeng* 99(3):652-665). Аналогичным образом Yu et al. сообщают, что гликоформы Man-5 и Man-8/9, по-видимому, обладают повышенной активностью в отношении ADCC, пониженной активностью в отношении CDC, повышенной аффинностью связывания с FcγR3A и пониженной аффинностью связывания с FcγR1A и ПВ. (Yu et al., *MAbs*. 2012 Jul 1; 4(4): 475-487. doi:10.4161/mabs.20737). Следовательно, композиция на основе антител с повышенным содержанием гликанов с высоким содержанием маннозы (например, Man-5) может обеспечить определенные терапевтические преимущества.

[4] С другой стороны, также сообщалось, что гликоформы Man-5 и Man-6 также демонстрируют более высокую скорость клиренса, чем комплексно-фукозилированная гликоформа (Yu et al., выше). Следовательно, высокие уровни гликанов Man-5 могут привести к уменьшению периода полувыведения и быстрому клиренсу антитела. Соответственно, существует необходимость подвергать контролю и модулировать высокое содержание маннозы в антителе для достижения необходимого баланса между PK-свойствами и терапевтической активностью (например, ADCC).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[5] Как раскрыто и проиллюстрировано в данном документе, был разработан способ модулирования уровня гликана с высоким содержанием маннозы на деносумабе. В частности, за счет уменьшения количества глюкозы и увеличения количества галактозы в

среде для культивирования во время фазы продуцирования повышали уровень гликана с высоким содержанием маннозы. Также в данном документе раскрыты и проиллюстрированы примеры полученного рекомбинантным путем деносумаба, содержащего различные гликановые профили.

[6] На основе предоставленного в данном документе раскрытия специалистам в данной области техники будут понятны или они будут способны определить посредством проведения только обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены приведенными ниже вариантами осуществления (E).

E1. Способ увеличения уровня высокого содержания маннозы, присутствующей на молекулах деносумаба, где указанные молекулы деносумаба рекомбинантно экспрессируются клеткой-хозяином млекопитающего, предусматривающий:

(a) инкубирование указанной клетки-хозяина млекопитающего в первой среде для культивирования во время фазы роста до тех пор, пока плотность клеток не будет составлять по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл, где указанная первая среда для культивирования содержит от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л глюкозы; и затем

(b) инкубирование клеток-хозяев из стадии (a) во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования для экспрессии указанных молекул деносумаба, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л глюкозы и от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л галактозы;

где от приблизительно 2% до приблизительно 14% молекул деносумаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

E2. Способ увеличения уровня высокого содержания маннозы, присутствующей на молекулах деносумаба, где указанные молекулы деносумаба рекомбинантно экспрессируются клеткой-хозяином млекопитающего, предусматривающий:

(a) инкубирование указанной клетки-хозяина млекопитающего в первой среде для культивирования во время фазы роста до тех пор, пока плотность клеток не будет составлять по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл, где указанная первая среда для культивирования содержит от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л глюкозы; и затем

(b) инкубирование клеток-хозяев из стадии (a) во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования для экспрессии указанных молекул деносумаба, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л глюкозы и от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л галактозы;

где процент молекул деносумаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, увеличен по сравнению с контролем.

Е3. Способ по Е2, где от приблизительно 2% до приблизительно 14% молекул деносумага содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

Е4. Способ по любому из Е1-Е3, где во время фазы роста концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

Е5. Способ по любому из Е1-Е3, где во время фазы роста концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 4 г/л до приблизительно 20 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

Е6. Способ по любому из Е1-Е5, где, во время фазы продуцирования, клетки-хозяева первоначально выдерживают в первой среде для культивирования в течение от приблизительно 3 до приблизительно 15 дней и затем переносят во вторую среду для культивирования посредством перфузии или болюсной подпитки.

Е7. Способ по любому из Е1-Е6, где, когда клетки-хозяева инкубируют во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования, концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л или от приблизительно 0 г/л до приблизительно 8 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

Е8. Способ по любому из Е1-Е7, где, когда клетки-хозяева инкубируют во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования, концентрацию галактозы поддерживают на уровне от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л или от приблизительно 7 г/л до приблизительно 15 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

Е9. Способ по любому из Е1-Е8, где, когда клетки-хозяева инкубируют во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования, концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л и концентрацию галактозы поддерживают на уровне от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

Е10. Способ по любому из Е1-Е9, где, когда клетки-хозяев инкубируют во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования, концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 0 г/л до приблизительно 8 г/л и концентрацию галактозы поддерживают на уровне от приблизительно 7 г/л до приблизительно 15 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

Е11. Способ по любому из Е1-Е10, предусматривающий:

(а) инкубирование указанной клетки-хозяина млекопитающего в первой среде для культивирования во время фазы роста и добавление в культуру одной или нескольких болюсных подпиток, где концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л во время фазы роста;

(б) обеспечение перехода клеток-хозяев из стадии (а) из фазы роста в фазу продуцирования и поддержание концентрации глюкозы на уровне от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л в течение от приблизительно 3 дней до приблизительно 15 дней;

и затем

(с) обеспечение перехода клеток-хозяев из стадии (b) во вторую среду для культивирования, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л глюкозы и от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л галактозы.

E12. Способ по E11, где на стадиях (a) и (b) концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

E13. Способ по E11 или E12, где на стадиях (a) и (b) концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 4 г/л до приблизительно 20 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

E14. Способ по любому из E11-E13, где на стадии (с) концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л или от приблизительно 0 г/л до приблизительно 8 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

E15. Способ по любому из E11-E14, где на стадии (с) концентрацию галактозы поддерживают на уровне от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л или от приблизительно 7 г/л до приблизительно 15 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

E16. Способ по любому из E11-E15, где на стадии (с) концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 0 г/л до приблизительно 8 г/л, а концентрацию галактозы поддерживают на уровне от приблизительно 7 г/л до приблизительно 15 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

E17. Способ по любому из E1-E16, где указанные первая и вторая среды для культивирования представляют собой среды для культивирования с определенным химическим составом.

E18. Способ по любому из E1-E17, где указанная первая среда для культивирования содержит от приблизительно 4 г/л до приблизительно 18 г/л глюкозы.

E19. Способ по любому из E1-E18, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 1 г/л до приблизительно 8 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 7 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 6 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 5 г/л глюкозы.

E20. Способ по любому из E1-E19, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 1 г/л до приблизительно 5 г/л глюкозы.

E21. Способ по любому из E1-E20, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 8 г/л до приблизительно 14 г/л, от приблизительно 9 г/л до приблизительно 13 г/л или от приблизительно 10 г/л до приблизительно 12 г/л галактозы.

E22. Способ по любому из E1-E21, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 10 г/л до приблизительно 12 г/л галактозы.

E23. Способ по любому из E1-E21, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 1 г/л до приблизительно 5/л глюкозы и от приблизительно 10 г/мл до приблизительно 12 г/мл галактозы.

E24. Способ по любому из E1-E23, где на стадии (а) указанная плотность клеток составляет по меньшей мере приблизительно 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 5×10^6 жизнеспособных клеток/мл или по меньшей мере приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

E25. Способ по любому из E1-E24, где от приблизительно 4% до приблизительно 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E25b. Способ по любому из E1-E24, где от приблизительно 4% до приблизительно 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E25c. Способ по любому из E1-E24, где от приблизительно 5% до приблизительно 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E25d. Способ по любому из E1-E24, где от приблизительно 5% до приблизительно 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298. E26. Способ по любому из E1-E25, где от приблизительно 2% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E27. Способ по любому из E1-E26, где от приблизительно 4% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E27b. Способ по любому из E1-E25, где от приблизительно 4% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E27c. Способ по любому из E1-E25, где от приблизительно 5% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E27d. Способ по любому из E1-E25, где от приблизительно 5% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E28. Способ по любому из E1-E27 при условии, что процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, не составляет от 6,5% до 7,5%.

E29. Способ по любому из E1-E27 при условии, что процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, не составляет от 6,5% до 8,5%.

E30. Способ по любому из E1-E27 при условии, что процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, не составляет от 7,5% до 8,5%.

E31. Способ по любому из E1-E30, где указанные клетки-хозяева переносят из первой среды для культивирования во вторую среду для культивирования посредством перфузии.

E32. Способ по любому из E1-E30, где указанные клетки-хозяева переносят из первой среды для культивирования во вторую среду для культивирования посредством

болюсной подпитки.

Е33. Способ увеличения уровня высокого содержания маннозы, присутствующей на молекулах деносуаба, где указанные молекулы деносуаба рекомбинантно экспрессируются клеткой-хозяином млекопитающего, предусматривающий:

(а) создание исходной культуры клеток, в которой плотность указанных клеток-хозяев млекопитающих составляет по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл; и затем

(b) инкубирование клеток-хозяев из стадии (а) в среде для культивирования во время фазы продуцирования для экспрессии указанных молекул деносуаба, где указанная среда для культивирования содержит от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л глюкозы и от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л галактозы;

где от приблизительно 2% до приблизительно 14% молекул деносуаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

Е34. Способ увеличения уровня высокого содержания маннозы, присутствующей на молекулах деносуаба, где указанные молекулы деносуаба рекомбинантно экспрессируются клеткой-хозяином млекопитающего, предусматривающий:

(а) создание исходной культуры клеток, в которой плотность указанных клеток-хозяев млекопитающих составляет по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл; и затем

(b) инкубирование клеток-хозяев из стадии (а) в среде для культивирования во время фазы продуцирования для экспрессии указанных молекул деносуаба, где указанная среда для культивирования содержит от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л глюкозы и от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л галактозы;

где процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, увеличен по сравнению с контролем.

Е35. Способ по Е34, где от приблизительно 2% до приблизительно 14% молекул деносуаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

Е36. Способ по любому из Е33-Е35, где на стадии (b) концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

Е37. Способ по любому из Е33-Е36, где на стадии (b) концентрацию галактозы поддерживают на уровне от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

Е38. Способ по любому из Е33-Е37, где указанная среда для культивирования представляет собой среду для культивирования с определенным химическим составом.

Е39. Способ по любому из Е33-Е38, где указанная среда для культивирования содержит от 1 г/л до приблизительно 8 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 7 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 6 г/л, от приблизительно 1 г/л до

приблизительно 5/л глюкозы.

E40. Способ по любому из E33-E39, где указанная среда для культивирования содержит от приблизительно 1 г/л до приблизительно 5/л глюкозы.

E41. Способ по любому из E33-E40, где указанная среда для культивирования содержит от приблизительно 8 г/л до приблизительно 14 г/л, от приблизительно 9 г/л до приблизительно 13 г/л или от приблизительно 10 г/л до приблизительно 12 г/л галактозы.

E42. Способ по любому из E33-E41, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 10 г/л до приблизительно 12 г/л галактозы.

E43. Способ по любому из E33-E42, где на стадии (а) указанная плотность клеток составляет по меньшей мере приблизительно 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 5×10^6 жизнеспособных клеток/мл или по меньшей мере приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

E44. Способ по любому из E33-E43, где от приблизительно 4% до приблизительно 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E44b. Способ по любому из E33-E43, где от приблизительно 4% до приблизительно 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E44c. Способ по любому из E33-E43, где от приблизительно 5% до приблизительно 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E44d. Способ по любому из E33-E43, где от приблизительно 5% до приблизительно 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E45. Способ по любому из E33-E44, где от приблизительно 2% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E46. Способ по любому из E33-E45, где от приблизительно 4% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E46b. Способ по любому из E33-E45, где от приблизительно 4% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E46c. Способ по любому из E33-E45, где от приблизительно 5% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E46d. Способ по любому из E33-E45, где от приблизительно 5% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E47. Способ по любому из E33-E46 при условии, что процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, не составляет от 6,5% до 7,5%.

E48. Способ по любому из E33-E46 при условии, что процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, не составляет от 6,5% до 8,5%.

E49. Способ по любому из E33-E46 при условии, что процент молекул деносуаба,

имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, не составляет от 7,5% до 8,5%.

E50. Способ по любому из E1-E49, где указанная культура при сборе обеспечивает получение по меньшей мере приблизительно 10 г/л деносумаба.

E51. Способ по E1 или E33, где процент молекул деносумаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, увеличен по сравнению с контролем.

E52. Способ по любому из E2-E32 и E34-E51, где указанный контроль представляет собой процент высокого содержания маннозы в сайте N-298 из эталонной партии, когда указанная эталонная партия продуцируется в среде для культивирования, которая содержит от приблизительно 5 г/л до приблизительно 15 г/л глюкозы и не содержит галактозу.

E53. Способ по любому из E2-E32 и E34-E52, где указанный контроль составляет приблизительно 1,5% или меньше молекул деносумаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E54. Способ по любому из E1-E53, где указанная клетка-хозяин млекопитающего представляет собой клетку CHO.

E55. Способ по E54, где указанная клетка CHO представляет собой клетку CS-9, CHO-K1, CHO-DG44 или CHO-S.

E56. Способ по E54, где указанная клетка CHO представляет собой клетку CS-9.

E57. Способ по E54, где указанная клетка CHO представляет собой клетку AM1/D.

E57b. Способ по E54, где указанная клетка CHO представляет собой клетку CHO DUX-B11.

E57c. Способ по E54, где указанная клетка CHO представляет собой клетку CHO с нокаутом GS.

E57d. Способ по E54, где указанная клетка CHO представляет собой клетку CHO-K1.

E58. Способ по любому из E54-E57, где указанную клетку CHO подвергли амплификации путем отбора с помощью метотрексата (MTX).

E59. Способ по любому из E1-E32 и E50-E57, где указанная первая среда для культивирования содержит метотрексат (MTX).

E60. Способ по любому из E33-E57, где указанные клетки-хозяева млекопитающих на стадии (а) подвергают амплификации путем отбора с помощью метотрексата (MTX).

E61. Способ по любому из E1-E60, где указанная клетка-хозяин млекопитающего содержит приблизительно 500 или больше копий последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей деносумаб.

E62. Способ по любому из E1-E61, где указанная клетка-хозяин млекопитающего содержит приблизительно 500 или больше копий последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO. 3.

E63. Способ по любому из E1-E62, где указанная клетка-хозяин млекопитающего содержит приблизительно 500 или больше копий последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO:4.

E64. Способ по любому из E1-E63, где от приблизительно 7% до приблизительно 10% молекул деносумаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E65. Способ по любому из E1-E64, где указанное высокое содержание маннозы относится к Man-5.

E66. Способ по любому из E1-E65, где от приблизительно 7% до приблизительно 10% молекул деносумаба содержат Man-5 в сайте N-298.

E67. Способ по любому из E1-E66, где от приблизительно 48% до приблизительно 70% молекул деносумаба содержат A2F-G0 в сайте N-298.

E68. Способ по любому из E1-E67, где от приблизительно 9% до приблизительно 26% молекул деносумаба содержат A2F-G1 в сайте N-298.

E69. Способ по любому из E1-E68, где от приблизительно 4% до приблизительно 8% молекул деносумаба содержат A2-G0 в сайте N-298.

E70. Способ по любому из E1-E69, где от приблизительно 0,3% до приблизительно 5% молекул деносумаба содержат A2F-G2 в сайте N-298.

E71. Способ по любому из E1-E70, где от приблизительно 0,5% до приблизительно 3% молекул деносумаба содержат A2-G1 в сайте N-298.

E72. Способ по любому из E1-E71, где от приблизительно 0,5% до приблизительно 3% молекул деносумаба содержат A1-G0 в сайте N-298.

E73. Способ по любому из E1-E72, где от приблизительно 1% до приблизительно 5% молекул деносумаба содержат A1F-G0 в сайте N-298.

E74. Композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где по меньшей мере 15% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина.

E75. Композиция по E74, в которой указанный остаток гликированного лизина содержит фрагмент глюкозы или фрагмент галактозы.

E76. Композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где по меньшей мере 5% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина, которые содержат фрагмент галактозы.

E77. Композиция E76, где от приблизительно 7% до приблизительно 20% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина, которые содержат фрагмент галактозы.

E78. Композиция по любому из E74-E77, где до 70% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина.

E79. Композиция по любому из E74-E78, где от приблизительно 20% до приблизительно 30% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина.

E80. Композиция по любому из E74-E79, где соотношение лизина, гликированного галактозой, и лизина, гликированного глюкозой, составляет от приблизительно 1:10 до приблизительно 10:1.

E81. Композиция по любому из E74-E80, где соотношение лизина, гликированного

галактозой, и лизина, гликированного глюкозой, составляет приблизительно 1:1.

E82. Композиция по любому из E74-E81, где от приблизительно 2% до приблизительно 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E83. Композиция по любому из E74-E82, где от 2% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E83b. Композиция по любому из E74-E82, где от приблизительно 4% до приблизительно 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E83c. Композиция по любому из E74-E82, где от 4% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E83d. Композиция по любому из E74-E82, где от приблизительно 5% до приблизительно 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E83e. Композиция по любому из E74-E82, где от 5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298. E84. Композиция по любому из E74-E83, где от приблизительно 4% до приблизительно 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E85. Композиция по любому из E74-E84, где от 4% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E85b. Композиция по любому из E74-E84, где от приблизительно 5% до приблизительно 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E85c. Композиция по любому из E74-E84, где от 5% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E86. Композиция по любому из E74-E85, где от приблизительно 2% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E87. Композиция по любому из E74-E86, где от приблизительно 4% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E87b. Композиция по любому из E74-E86, где от приблизительно 4% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E87c. Композиция по любому из E74-E86, где от приблизительно 5% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E87d. Композиция по любому из E74-E86, где от приблизительно 5% до приблизительно 6,5% или от 8,5% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E88. Композиция по любому из E74-E87 при условии, что процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, не составляет от 6,5% до 7,5%.

E89. Композиция по любому из E74-E88 при условии, что процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, не составляет от 6,5% до 8,5%.

E90. Композиция по любому из E74-E89 при условии, что процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, не составляет от 7,5% до 8,5%.

E91. Композиция по любому из E74-E90, где от приблизительно 7% до приблизительно 10% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

E92. Композиция по любому из E74-E91, где указанное высокое содержание маннозы относится к Man-5.

E93. Композиция по любому из E74-E92, где от приблизительно 7% до приблизительно 10% молекул деносуаба содержат Man-5 в сайте N-298.

E94. Композиция по любому из E74-E93, где от приблизительно 48% до приблизительно 70% молекул деносуаба содержат A2F-G0 в сайте N-298.

E95. Композиция по любому из E74-E94, где от приблизительно 9% до приблизительно 26% молекул деносуаба содержат A2F-G1 в сайте N-298.

E96. Композиция по любому из E74-E95, где от приблизительно 0,5% до приблизительно 3% молекул деносуаба содержат A1-G0 в сайте N-298.

E97. Композиция по любому из E74-E96, где от приблизительно 1% до приблизительно 5% молекул деносуаба содержат A1F-G0 в сайте N-298.

E98. Композиция по любому из E74-E97, где от приблизительно 4% до приблизительно 8% молекул деносуаба содержат A2-G0 в сайте N-298.

E99. Композиция по любому из E74-E98, где от приблизительно 0,5% до приблизительно 4% молекул деносуаба содержат A2-G1 в сайте N-298.

E100. Композиция по любому из E74-E99, где от приблизительно 0,3% до приблизительно 5% молекул деносуаба содержат A2F-G2 в сайте N-298.

E101. Композиция по любому из E74-E100, где указанный гликированный лизин выбран из группы, состоящей из: (i) тяжелой цепи K76, K98, K218, K249, K318, K327 и K335 (нумерация согласно SEQ ID NO:1); и (ii) легкой цепи K104, K108, K150, K184 и K191 (нумерация согласно SEQ ID NO:2).

E102. Композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, и где от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,8% молекул деносуаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

E103. Композиция по E102, где от 0,2% до 1,8% молекул деносуаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

E104. Композиция по E102 или E103, где от приблизительно 0,5% до

приблизительно 1% молекул деносуаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

E105. Композиция по любому из E102-E104, где от 0,5% до 1% молекул деносуаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

E106. Композиция по любому из E102-E105, где указанный гликан с высоким содержанием маннозы представляет собой Man-5.

E107. Композиция по любому из E102-E106, где от 0,2% до 1,8% молекул деносуаба содержат Man-5 в сайте N-298.

E108. Композиция по любому из E102-E107, где от приблизительно 0,5% до приблизительно 1% молекул деносуаба содержат Man-5 в сайте N-298.

E109. Композиция по любому из E102-E108, где от 0,5% до 1% молекул деносуаба содержат Man-5 в сайте N-298.

E110. Композиция по любому из E102-E109, где от приблизительно 30% до приблизительно 60% молекул деносуаба содержат A2F-G0 в сайте N-298.

E111. Композиция по любому из E102-E110, где от приблизительно 20% до приблизительно 50% молекул деносуаба содержат A2F-G1 в сайте N-298.

E112. Композиция по любому из E102-E111, где от приблизительно 0,1% до приблизительно 3% молекул деносуаба содержат A1-G0 в сайте N-298.

E113. Композиция по любому из E102-E112, где от приблизительно 0,1% до приблизительно 4% молекул деносуаба содержат A1F-G0 в сайте N-298.

E114. Композиция по любому из E102-E113, где от приблизительно 4% до приблизительно 10% молекул деносуаба содержат A2-G0 в сайте N-298.

E115. Композиция по любому из E102-E114, где от приблизительно 1% до приблизительно 7% молекул деносуаба содержат A2-G1 в сайте N-298.

E116. Композиция по любому из E102-E115, где от приблизительно 3% до приблизительно 10% молекул деносуаба содержат A2F-G2 в сайте N-298.

E117. Композиция по любому из E74-E116, где указанный деносуаб связывается с RANKL человека со значением аффинности связывания (K_D), составляющим приблизительно 25 пМ или меньше.

E118. Композиция по любому из E74-E117, где указанный деносуаб связывается с RANKL человека со значением аффинности связывания (K_D), составляющим от приблизительно 1 пМ до приблизительно 25 пМ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[7] На фиг. 1 представлен график, показывающий профили N-гликанов образцов из способа CP2.

[8] На фиг. 2 представлен график, показывающий профиль CE-HPLC образцов деносуаба из способа CP2 для анализа гликирования.

[9] На фиг. 3А представлен график, показывающий профили N-гликанов образцов из способов CP2 и CP3, а также эталонного стандарта. На фиг. 3В представлены таблицы, обобщающие профили N-гликанов образцов из способов CP2 и CP3.

[10] На фиг. 4А-4Е обобщены профили PK/PD деносумаба, полученного в способах CP2 и CP3. На фиг. 4А-4В показаны средние (\pm стандартное отклонение) профили зависимости концентрации деносумаба в сыворотке крови (нг/мл) от времени после подкожного введения 60 мг деносумаба в CP3 или CP2 здоровым добровольцам, представленные в линейной шкале (фиг. 4А) и полулогарифмической шкале (фиг.4В) соответственно. На фиг. 4С показано среднее (\pm стандартное отклонение) процентное изменение сывороточного с-телопептида (СТХ1) по сравнению с исходным уровнем после подкожного (SC) введения 60 мг деносумаба в CP3 или CP2 здоровым добровольцам. На фиг. 4D-4Е показано, что хотя уровень Man-5 деносумаба снижался со временем, виды с Gal оставались в основном постоянными. Динамики времени анализировали для 4 CP2-пациентов.

[11] На фиг. 5 показаны наложения гликановой карты (HP-AEX). Деносумаб, полученный с помощью CP2, и деносумаб, полученный с помощью CP4, показали аналогичные профили N-гликанов.

[12] На фиг. 6А показана нуклеотидная и аминокислотная последовательности тяжелой цепи деносумаба (SEQ ID NO:3). Нуклеотиды с 1 по 57 кодируют сигнальный пептид, который расщепляется во время синтеза белка с образованием зрелой тяжелой цепи. Название первой аминокислоты (E) зрелой тяжелой цепи выделено жирным шрифтом и увеличено. На фиг. 6В показана нуклеотидная и аминокислотная последовательности легкой цепи деносумаба (SEQ ID NO:4). Нуклеотиды с 1 по 60 кодируют сигнальный пептид, который расщепляется во время синтеза белка с образованием зрелой легкой цепи. Название первой аминокислоты (E) зрелой легкой цепи выделено жирным шрифтом и увеличено.

[13] На фиг. 7А-7С показан эффект концентрации глюкозы и галактозы на высокое содержание маннозы в деносумабе. На фиг. 7А показан полный анализ модели Man-5 на 17-й день с прогнозируемым профилем в центральных точках эксперимента. На фиг. 7В показан прогноз в отношении Man-5 на 17-й день с уровнем глюкозы, установленным на 2,5 г/л. На фиг. 7С показано изменение динамики времени для Man-5 с 11 по 17 дни.

[14] На фиг. 8А показан полный анализ модели Man-5 на 17-й день. На фиг. 8В показаны уровни Man-5 при оценивании посредством HPLC. На фиг. 8С показаны виды Man-5 и общие виды с высоким содержанием маннозы по сравнению с эталоном CP2.

[15] На фиг. 9А изображена диаграмма, показывающая 10-дневную схему периодического культивирования с подпиткой. На фиг. 9В показано, что культуры клеток сохраняли высокую жизнеспособность в течение 10-дневного периодического культивирования с подпиткой. Все образцы показали жизнеспособность $>80\%$ во всех испытанных условиях. Закрашенный круг, прямоугольник и ромб представляют контрольные условия, при которых глюкозу добавляли для поддержания уровня 10-12 г/л в биореакторе в дни подпитки без добавления галактозы. Незакрашенный кружок, прямоугольник и ромб представляют условие, при котором 10 г/л галактозы добавляли вместе с глюкозой для поддержания уровня 10-12 г/л в биореакторе в дни подпитки.

Заштрихованные столбики представляют условие, при котором 10 г/л галактозы добавляли в дни подпитки, в то время как уровень глюкозы в биореакторе может снизиться за счет потребления до уровня 1-5 г/л. На фиг. 9С показан уровень глюкозы в биореакторе в дни подпитки и сбора. Измерение уровня глюкозы проводили для определения количества подпиток глюкозой, необходимого для двух условий культивирования. В каждый из 3, 6 и 8 дней ~5-6 г/л глюкозы добавляли к контрольным культурам и культурам gal/gluc (черные и белые столбцы соответственно), в то время как к культуре только с gal глюкозу не добавляли (заштрихованные столбцы).

[16] На фиг. 10А-10С показан эффект модификации источника сахара на рост клеток, титр и удельную продуктивность. На фиг. 10А представлен линейный график, показывающий плотность жизнеспособных клеток (VCD) всех образцов. На фиг. 10В представлены столбчатые диаграммы, показывающие титр, а на фиг. 10С показана удельная продуктивность культур с 10-дневным периодическим культивированием с подпиткой. Черные столбики представляют контрольное условие, при котором глюкозу добавляли для поддержания уровня 10-12 г/л в биореакторе в дни подпитки. Белые столбики представляют условие, при котором 10 г/л галактозы добавляли вместе с глюкозой для поддержания уровня 10-12 г/л в биореакторе в дни подпитки. Заштрихованные столбики представляют условие, при котором 10 г/л галактозы добавляли в дни подпитки, в то время как уровень глюкозы в биореакторе снижался за счет потребления до уровня 1-5 г/л.

[17] На фиг. 11 показано, что уровень высокого содержания маннозы увеличивался при добавлении галактозы и сохранении низкого уровня глюкозы. Столбчатая диаграмма показывает зарегистрированный % площади Man-5 в каждом пуле в конце 10-дневного периодического культивирования с подпиткой. Черные столбики представляют контрольное условие, при котором глюкозу добавляли для поддержания уровня 10-12 г/л в биореакторе в дни подпитки. Белые столбики представляют условие, при котором 10 г/л галактозы добавляли вместе с глюкозой для поддержания уровня 10-12 г/л в биореакторе в дни подпитки. Заштрихованные столбики представляют условие, при котором 10 г/л галактозы добавляли в дни подпитки, в то время как уровень глюкозы в биореакторе снижался за счет потребления до уровня 1-5 г/л.

[18] На фиг. 12 показано, что добавление D-галактозы обеспечивало увеличение количества моно- и би-галактогликановых остатков, но не агалакто-остатков. Столбчатая диаграмма показывает зарегистрированный % площади гликанового остатка в каждом пуле в конце 10-дневного периодического культивирования с подпиткой. Черные столбики представляют контрольное условие, при котором глюкозу добавляли для поддержания уровня 10-12 г/л в биореакторе в дни подпитки. Белые столбики представляют условие, при котором 10 г/л галактозы добавляли вместе с глюкозой для поддержания уровня 10-12 г/л в биореакторе в дни подпитки. Заштрихованные столбики представляют условие, при котором 10 г/л галактозы добавляли в дни подпитки, в то время как уровень глюкозы в биореакторе снижался за счет потребления до уровня 1-5 г/л.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. ОБЗОР

[19] Деносумаб представляет собой моноклональное антитело IgG2 человека, характеризующееся аффинностью и специфичностью к RANKL человека (лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B). Деносумаб имеет примерную молекулярную массу 147 кДа и в настоящее время продуцируется в клетках млекопитающих (яичников китайского хомячка), полученных с помощью генной инженерии. В процессе продуцирования путем рекомбинации гликановые фрагменты присоединяются к деносумабу посредством посттрансляционной модификации, например, посредством процесса, опосредованного ферментом (гликозилирование), или процесса, отличного от опосредованного ферментом (гликирование). Поскольку гликаны играют важную роль в терапевтической эффективности и периоде полувыведения антитела *in vivo*, для соответствия требованиям регулирующих органов, необходимо охарактеризовать профиль гликоформ терапевтического гликопротеина.

[20] Как раскрыто и проиллюстрировано в данном документе, для модификации гликановых профилей деносумаба были разработаны различные способы культивирования. Деносумаб имеет два сайта N-гликозилирования, расположенных на 2-м константном домене каждой тяжелой цепи (остаток N-298). Кроме того, антитело также можно модифицировать путем гликирования (иногда также называемого "неферментативным гликозилированием"), когда сахарный фрагмент присоединяется к антителу через остаток лизина.

[21] В первом иллюстративном способе культивирования (именуемом в данном документе "CP2") использовали линию клеток CHO, полученную из AM-1/D. Клетки культивировали в модифицированной среде DMEM/F12 с двумя болюсными подпитками на 3-й и 9-й день до сбора культуры на 14-й день. Полученные ключевые гликоформы включали следующее: A2F-G0, приблизительно 55%-65%, A2F-G1, приблизительно 15%-25%, и Man-5, приблизительно 4%-9%.

[22] Во втором иллюстративном способе культивирования (называемом в данном документе "CP3") общие более высокие значения выхода продукта были достигнуты за счет использования немного другого процесса. Клеточную линию на основе клеток CS-9 CHO амплифицировали путем отбора с помощью метотрексата (MTX) во время фазы роста. Вследствие отбора с помощью MTX количество копий нуклеиновой кислоты, кодирующей деносумаб, было значительно увеличено по сравнению с клетками-хозяевами, используемыми в способе CP2. В целом, при отборе с помощью MTX оценивается, что клетка-хозяин содержит приблизительно 700-1000 копий рекомбинантной последовательности, с увеличением таким образом общего выхода образования рекомбинантного белка. Примечательно, что рекомбинантный деносумаб, полученный с помощью CP3, также характеризовался низким содержанием Man-5, менее 1%. Деносумаб, полученный с помощью способа CP3, показал больший период полувыведения из сыворотки крови и более медленный клиренс у пациентов.

[23] Третий иллюстративный способ культивирования упоминается в данном документе как "CP4". Аналогично CP3, клеточная линия, основанная на клетках CS-9 СНО, была амплифицирована путем отбора с помощью МТХ во время фазы роста, с увеличением таким образом общего выхода образования деносумаба. Кроме того, во время фазы продуцирования на 11 день производили замену среды посредством перфузии. Замена среды включала снижение концентрации глюкозы и добавление галактозы в качестве альтернативного источника углеводов. Деносумаб, полученный с помощью способа CP4, показал аналогичные уровни A2F-G0 (от приблизительно 55% до 65%), A2F-G1 (от приблизительно 10% до 19%) и Man-5 (от приблизительно 4% до 9%) по сравнению с деносумабом, полученным с помощью CP2; и более высокий уровень Man-5 по сравнению с деносумабом, полученным с помощью CP3. Повышенные уровни гликирования наблюдались в деносумабе, полученном с помощью способа CP4. Кроме того, поскольку галактоза использовалась в CP4 в качестве альтернативного источника углерода, деносумаб, полученный с помощью CP4, также включал новые виды, лизин, гликированный галактозой.

[24] Неожиданно, но даже несмотря на то, что деносумаб, полученный с помощью CP4, показал гораздо более высокий уровень гликирования по сравнению с деносумабом, полученным с помощью CP2, его связывание с лигандом RANKL, а также биологическая активность не были затронуты. Поскольку остаток лизина является заряженным и часто участвует в белок-белковых взаимодействиях, было неожиданно, что значительное увеличенное уровня гликирования не повлияло на биологическую активность. Другое неожиданное открытие состоит в том, что лизин, гликированный галактозой, не влиял на иммуногенность деносумаба. Галактоза естественным образом присутствует в сыворотке крови человека в количестве приблизительно 0,3 мг/дл. При таких низких уровнях галактозы в сыворотке крови маловероятно, что здоровые индивидуумы будут иметь циркулирующие белки с измеримыми уровнями гликирования галактозой, за исключением пациентов с галактоземией. Таким образом, клиническая безопасность гликирования галактозой ранее была неизвестна. Было обнаружено, что в случае деносумаба высокие уровни деносумаба, гликированного галактозой, не влияли на иммуногенность.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[25] "Деносумаб" (торговые названия Prolia® и Xgeva®) относится к моноклональному антителу человека, содержащему тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:1, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:2. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей деносумаба показаны в таблице 1. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие SEQ ID NO: 1 и 2, показаны на фиг. 6А-6В. Как проиллюстрировано в примерах, гликановые профили деносумаба могут варьироваться.

Таблица 1. Последовательности деносумаба

	Последовательность
Аминокислотная	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA

<p>последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO:1)</p>	<p>PGKGLEWVSG ITGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDP GTTVIMSWFD PWGQGTLVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>Аминокислотная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO:2)</p>	<p>EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR GRYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVFYCC QYGSSPRTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSLT TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC</p>

[26] Антитела представляют собой гликопротеины, и ожидается гетерогенность гликозилирования. Моноклональные антитела содержат единственный консенсусный сайт N-связанного гликозилирования в CH2 Fc-доме каждой HC, в то время как LC не имеет консенсусного сайта N-связанного гликозилирования. Гликаны Fc преимущественно состоят из 3 классов гликанов: (1) асиалилированных биантеннальных коровых фукозилированных структур, различающихся по содержанию терминальной галактозы (A2G_xF, где x=0, 1 или 2); (2) асиалилированных моноантеннальных коровых фукозилированных гибридных структур, различающихся содержанием галактозы (A1G_xMyF, где x=0 или 1 и y=3, 4 или 5); и (3) структур с высоким содержанием маннозы (M_x, где x=5, 6, 7 или 8). На основании наличия консенсусной последовательности, а

также ретроспективной характеристики моноклональных антител IgG2, полученных из культуры клеток млекопитающих, ожидается, что деносуаб будет содержать единственный сайт N-гликозилирования в положении N-298 на каждой тяжелой цепи.

[27] В литературе сайт N-гликозилирования как правило называют остатком N-297 согласно нумерации Kabat EU. Фактический номер остатка представляет собой остаток 298 SEQ ID NO:1. Разница связана с системой нумерации; оба относятся к одному и тому же остатку N.

[28] Углеводные фрагменты описаны в данном документе со ссылкой на широко используемую номенклатуру олигосахаридов. Обзор химии углеводов, в котором используется эта номенклатура, можно найти, например, в Hubbard and Ivatt, Ann. Rev. Biochem. 50:555-583 (1981). Эта номенклатура включает, например, Man, которая представляет маннозу; Gal, которая представляет галактозу; и Glc, которая представляет глюкозу. Широко известные виды гликанов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Иллюстративные структуры гликанов

Теоретическая масса ^a (Да)	Название и эмпирическая формула	Предлагаемая структура
1378,3	A1F-G0 C ₅₅ O ₃₅ N ₅ H ₈₇	
1581,5	A2F-G0 C ₆₃ O ₄₀ N ₆ H ₁₀₀	
1232,2	A1-G0 C ₄₉ O ₃₁ N ₅ H ₇₇	
1743,6	A2F-G1 C ₆₉ O ₄₅ N ₆ H ₁₁₀	
1435,3	A2-G0 C ₅₇ O ₃₆ N ₆ H ₉₀	
1394,3	A1-G1 C ₅₅ O ₃₆ N ₅ H ₈₇	
1905,8	A2F-G2 C ₇₅ O ₅₀ N ₆ H ₁₂₀	
1353,2	Man 5 C ₅₃ O ₃₆ N ₄ H ₈₄	
1597,5	A2-G1 C ₆₃ O ₄₁ N ₆ H ₁₀₀	
1556,4	Man 5-GlcNAc C ₆₁ O ₄₁ N ₅ H ₉₇	

1823,7	Man 7-Fuc $C_{65}O_{46}N_4H_{104}$	
1515,4	Man 6 $C_{59}O_{41}N_4H_{94}$	
1718,6	Man 6-GlcNAc $C_{67}O_{46}N_5H_{107}$	
1677,5	Man 7 $C_{65}O_{46}N_4H_{104}$	
1839,7	Man 8 $C_{71}O_{51}N_4H_{114}$	

а Теоретическая масса основана на эмпирической формуле и включает гликан и 2-АА.

б Квадрат представляет остаток GlcNAc, закрашенный кружок представляет остаток Man, незакрашенный кружок представляет остаток Gal, и треугольник представляет остаток Fuc.

[29] Гликан "с высоким содержанием маннозы" представляет собой гликановый фрагмент, содержащий 5-9 единиц маннозы, например гликан с высоким содержанием маннозы 5 (Man-5), гликан с высоким содержанием маннозы 6 (Man-6), гликан с высоким содержанием маннозы 7 (Man-7), гликан с высоким содержанием маннозы 8 (Man-8) и гликан с высоким содержанием маннозы 9 (Man-9).

[30] Высокое содержание маннозы в антителе можно оценить с помощью известных в данной области способов. Анализы как правило включают высвобождение гликанов из mAb либо путем ферментативной (PNGаза-F или Endo-H), либо химической обработки (например, гидразинолиза). Высвободившиеся гликаны затем очищают и затем анализируют без дальнейшей дериватизации или после мечения различными хромофорами/флуорофорами. Например, ферментативно или химически обработанный образец как правило анализируют посредством хроматографии, электрофореза или масс-спектрометрии для идентификации гликоформ mAb с высоким содержанием маннозы. В данном документе представлены примеры анализов образцов с высоким содержанием маннозы.

[31] Содержание гликанов в деносумабе как правило выражается в виде определенного процента (например, 2%-14% высокого содержания маннозы). Если не указано иное, процентное содержание гликана теоретически рассчитывается как число молекул деносумаба, содержащих такой гликан, от общего количества молекул деносумаба в образце. Например, 2% гликанов с высоким содержанием маннозы означает, что 2 молекулы деносумаба из 100 молекул деносумаба имеют высокое содержание маннозы. Этот теоретический расчет предполагает, что 100% аспарагина в сайте N-298 гликозилировано. На практике, однако, очень небольшой процент молекул антител может

быть агликозилирован или дегликозилирован (см., например, пример 3.1 ниже, приблизительно 0,3% или менее молекул антител могут быть агликозилированы или дегликозилированы в сайте N-298). Кроме того, подсчет видов гликанов на уровне отдельных молекул является нецелесообразным/невозможным. Следовательно, описанный в данном документе процент содержания гликанов как правило рассчитывают на основе относительного процента в соответствии с широко используемыми аналитическими способами. Например, как проиллюстрировано в примере 3.2, фермент используется для высвобождения всех N-гликанов из белка; затем гликаны разделяют посредством высокоэффективной анионообменной хроматографии (HPLC). Результатом HPLC являются различные пики, каждый из которых представляет вид гликана. Пик № 8 представляет Man-5. Таким образом процент Man-5 (8,4% в данном случае) рассчитывается на основе площади пика 8 от общих площадей всех пиков. Другим примером является пример 7.1, в котором для оценки процента N-гликанов используется жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий (HILIC). Следовательно, если не указано иное, процент гликана рассчитывается согласно относительному проценту таких конкретных видов гликанов от общего количества N-гликанов в сайте N-298 с использованием любого широко используемого аналитического способа (например, HPLC, CE-SDS, HILIC). Процент не следует понимать буквально как относящийся к содержанию гликана на уровне отдельных молекул.

[32] Способы образования рекомбинантного белка как правило делятся на две фазы. На первой фазе, обычно называемой "фазой роста", происходит размножение клеток. Во второй фазе, обычно называемой "фазой продуцирования", экспрессия рекомбинантного белка активируется в клетках-хозяевах, как правило, путем добавления индуктора (такого как IPTG) или путем изменения условий культивирования (например, изменения температуры).

[33] Следует отметить, что при использовании в этом описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не предполагает иное. Термины, обозначенные в единственном числе, а также термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

3. ВЫСОКОЕ СОДЕРЖАНИЕ МАННОЗЫ В ДЕНОСУМАБЕ, ПОЛУЧЕННОМ РЕКОМБИНАНТНЫМ ПУТЕМ

3.1 Способы увеличения высокого содержания маннозы у деносумаба

[34] Гликоформы с высоким содержанием маннозы все чаще признаются важными атрибутами качества терапевтических моноклональных антител. Как описано в данном документе, высокое содержание маннозы на полученном рекомбинантным путем деносумабе можно контролировать путем манипулирования концентрацией глюкозы и галактозы в среде для культивирования клеток.

[35] В настоящем изобретении предусмотрен способ увеличения высокого содержания маннозы на полученном рекомбинантным путем деносумабе, в частности,

Man-5, с помощью применения низких или ограниченных концентраций глюкозы в комбинации с альтернативным источником углерода, в частности, галактозой или сахарозой. Как описано в данном документе, культивирование клеток в среде для культивирования клеток, где уровень глюкозы ограничивают посредством снижения концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток, в комбинации с альтернативным источником углерода (например, галактозой), приводило к получению композиции деносумаба, имеющей повышенную концентрацию в отношении высокого содержания маннозы при поддержании роста, жизнеспособности и титра клеток на приемлемых уровнях.

[36] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ увеличения уровня высокого содержания маннозы, присутствующей на молекулах деносумаба, где указанные молекулы деносумаба рекомбинантно экспрессируются клеткой-хозяином млекопитающего, предусматривающий: (а) инкубирование указанной клетки-хозяина млекопитающего в первой среде для культивирования во время фазы роста до тех пор, пока плотность клеток не достигнет по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл, где указанная первая среда для культивирования содержит от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л глюкозы; и затем (b) инкубирование клеток-хозяев из стадии (а) во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования для экспрессии указанных молекул деносумаба, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л глюкозы и от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л галактозы; где от приблизительно 2% до приблизительно 14% молекул деносумаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

[37] В целом, при обсуждении концентраций источников сахара (таких как глюкоза, сахароза или галактоза), а также других питательных веществ, число (например, 20 г/л) как правило относится к концентрации, которая подается в биореактор. После того, как среда попадает внутрь биореактора, концентрация часто изменяется из-за клеточного метаболизма, потребления и разбавления. Фактическая концентрация внутри биореактора может значительно измениться с течением времени и не всегда может контролироваться, так как она сильно зависит от плотности клеток и скорости метаболизма. Таким образом, для простоты и единообразия числа как правило относятся к концентрациям, измеренным до подачи среды в биореактор, без учета потребления или разбавления внутри биореактора. С другой стороны, концентрации внутри биореактора как правило называют концентрацией "истощенной питательной среды" или концентрацией "внутри биореактора".

[38] Как правило, во время фазы роста концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии, чтобы гарантировать эффективное размножение клеток-хозяев. В определенных вариантах осуществления концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 2 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 3 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 20 г/л, от

приблизительно 2 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 3 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 2 г/л до приблизительно 18 г/л от приблизительно 3 г/л до приблизительно 18 г/л или от приблизительно 4 г/л до приблизительно 18 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

[39] В некоторых вариантах осуществления во время фазы роста концентрацию глюкозы в истощенной питательной среде поддерживают на уровне от приблизительно 1 г/л до приблизительно 10 г/л либо посредством болюсной подпитки, либо перфузии, чтобы гарантировать эффективное размножение клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления концентрацию глюкозы в истощенной питательной среде поддерживают на уровне от приблизительно 2 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 3 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 2 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 3 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 2 г/л до приблизительно 8 г/л, от приблизительно 3 г/л до приблизительно 8 г/л или от приблизительно 4 г/л до приблизительно 8 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

[40] В некоторых вариантах осуществления во время фазы роста концентрацию глюкозы в истощенной питательной среде поддерживают на уровне, обеспечивающем размножение клеток до по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл, где концентрацию глюкозы поддерживают посредством болюсной подпитки или перфузии, при этом концентрация глюкозы в болюсной питательной или перфузионной среде составляет от приблизительно 4 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 18 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 18 г/л, от приблизительно 6 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 6 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 6 г/л до приблизительно 18 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 19 г/л или от приблизительно 7 г/л до приблизительно 18 г/л. Время/частота подачи болюсной подпитки или скорость перфузии будут зависеть от скорости потребления/метаболических процессов культуры клеток и находятся в пределах знаний специалиста в данной области техники.

[41] В определенных вариантах осуществления плотность клеток достигает от приблизительно 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл до приблизительно 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл в ходе фазы роста, например, по меньшей мере приблизительно 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 3×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 4×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 5×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по

меньшей мере приблизительно 6×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 7×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 8×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 9×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 40×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 50×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 60×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 70×10^6 жизнеспособных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от приблизительно 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл до приблизительно 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от приблизительно 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл до приблизительно 15×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от приблизительно 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл до приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл или от приблизительно 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл до приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

[42] Когда клетки-хозяева переносят из фазы роста в фазу продуцирования, для увеличения уровня высокого содержания маннозы (например, Man-5), клетки можно подпитывать второй средой для культивирования, в которой концентрация глюкозы снижена (например, 0-8 г/л) в комбинации с альтернативным источником углерода, таким как галактоза или сахароза, предпочтительно галактоза.

[43] Переход на среду для культивирования с низким содержанием глюкозы не требуется в начале фазы продуцирования. Часто во время фазы продуцирования необходимо выдерживать клетки-хозяева в среде, содержащей достаточное количество глюкозы (например, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 20 г/л или больше), в течение 3-15 дней (например, 3-11 дней) перед переходом на среду с низким содержанием глюкозы. Это может помочь установить необходимые параметры культуры (такие как плотность жизнеспособных клеток или жизнеспособность клеток) и поддерживать эти параметры. Через 3-15 дней (например, 3-11 дней) в фазе продуцирования, когда необходимо увеличить высокое содержание маннозы на полученном рекомбинантным путем деносуабе, культуру клеток затем можно подпитывать средой для культивирования клеток, в которой концентрация глюкозы уменьшается, и предоставляется альтернативный источник углерода, что приводит к необходимому увеличению уровней высокого содержания маннозы.

[44] Факторы, определяющие степень, до которой необходимо будет снизить концентрацию глюкозы, включают то, какой альтернативный источник углерода используется и его количество, которое используется; способ образования культур клеток; тип и массу клеток, и потребление глюкозы. Чем больше масса клеток в биореакторе, тем больше потребление глюкозы культурой клеток и, следовательно, тем большее количество глюкозы, которое может быть введено в качестве подпитки при поддержании состояния с

низким уровнем глюкозы, что будет обеспечивать получение необходимого высокого содержания маннозы. Способ подпитки глюкозой культуры клеток также может влиять на количество глюкозы, необходимое для поддержания состояния с низким содержанием глюкозы, что будет обеспечивать получение необходимого высокого содержания маннозы. Например, в периодической культуре клеток с подпиткой глюкозу можно вводить в среду для культивирования клеток и дополнять посредством болюсных подпиток. В способе перфузионного культивирования клеток концентрация глюкозы будет зависеть от скорости подачи (г/л/день) перфузионной среды. Кроме того, количество глюкозы в среде для культивирования во время продуцирования можно измерить, например, путем анализа истощенной питательной среды в отношении перфузионных культур. Кроме того, количество глюкозы в среде для культивирования во время продуцирования можно измерить, например, путем анализа истощенной питательной среды в отношении перфузионных культур. Было замечено, что уровни Ман-5 увеличивались, когда количество глюкозы в истощенной питательной среде было равным или близким к 0 г/л. В этом случае в клетки подается ровно столько глюкозы, сколько необходимо для близкого к полному потреблению, чтобы гарантировать, что снижение уровня глюкозы не окажет существенного влияния на выход белка.

[45] Снижение концентрации глюкозы внутри биореактора может быть достигнуто, например, путем замены первой среды для культивирования второй средой для культивирования посредством перфузии. В качестве альтернативы, это может быть достигнуто путем ожидания, пока глюкоза в первой среде для культивирования будет потреблена клетками, а затем корректировки графика болюсной подпитки и/или концентрации для снижения концентрации глюкозы внутри биореактора.

[46] В некоторых вариантах осуществления количество глюкозы во второй среде для культивирования снижается до предельного количества, так что при подпитке перфузионной средой, например, количество глюкозы, измеренное в истощенной питательной среде, составляет 0 г/л или чуть больше. Скорость потребления глюкозы можно определить по скорости добавления глюкозы и/или массе культуры клеток. Глюкозу можно вводить в качестве подпитки в концентрации от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л.

[47] В определенных вариантах осуществления концентрацию глюкозы во второй среде для культивирования поддерживают на уровне от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 8 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 7 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 6 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 5 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 8 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 7 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 6 г/л или от приблизительно 0 г/л до приблизительно 5 г/л.

[48] В комбинации с пониженной концентрацией глюкозы вторая среда для

культивирования должна содержать альтернативный источник углерода, например, галактоз или сахарозу, или быть дополненной им. В определенных вариантах осуществления вторая среда для культивирования содержит галактозу в концентрации до 20 г/л. Например, концентрацию галактозы во второй среде для культивирования можно поддерживать на уровне от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 18 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 17 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 16 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 15 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 14 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 13 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 12 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 18 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 17 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 16 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 15 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 14 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 13 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 12 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 18 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 17 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 16 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 15 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 14 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 13 г/л или от приблизительно 10 г/л до приблизительно 12 г/л.

[49] В определенных вариантах осуществления для увеличения уровней высокого содержания маннозы в деносумабе через 3-15 дней после начала фазы продуцирования концентрацию глюкозы снижают, и в качестве альтернативного источника сахара используют галактозу. Например, концентрацию глюкозы можно понижать с применением болюсной питательной среды или перфузионной среды, содержащей (i) от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 8 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 7 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 6 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 5 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 8 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 7 г/л, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 6 г/л или от приблизительно 1 г/л до приблизительно 5 г/л глюкозы, и (ii) от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 18 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 17 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 16 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 15 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 14 г/л, от

приблизительно 5 г/л до приблизительно 13 г/л, от приблизительно 5 г/л до приблизительно 12 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 18 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 17 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 16 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 15 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 14 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 13 г/л, от приблизительно 7 г/л до приблизительно 12 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 20 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 19 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 18 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 17 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 16 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 15 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 14 г/л, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 13 г/л или от приблизительно 10 г/л до приблизительно 12 г/л галактозы.

[50] В иллюстративном варианте осуществления концентрацию глюкозы снижают с применением болюсной питательной среды или перфузионной среды, содержащей (i) от приблизительно 1 г/л до приблизительно 5 г/л глюкозы и (ii) от приблизительно 10 г/л до приблизительно 12 г/л галактозы. Время/частота подачи болюсной подпитки или скорость перфузии будут зависеть от скорости потребления/метаболических процессов культуры клеток и находятся в пределах знаний специалиста в данной области техники.

[51] Может быть необходимо согласовать общее содержание сахара в среде с низким содержанием глюкозы с содержанием глюкозы в исходной среде для роста. Например, если среда для роста содержит 15 г/л глюкозы, тогда, во время фазы продуцирования, если среда с низким содержанием глюкозы содержит только 3 г/л глюкозы, может быть предпочтительнее добавить в нее 12 г/л галактозы, так, чтобы общее содержание сахара составило 15 мг/л.

[52] В определенных вариантах осуществления, во время фазы продуцирования после перехода на среду с низким содержанием глюкозы концентрацию глюкозы в истощенной питательной среде можно поддерживать на уровне от приблизительно 0 до приблизительно 5 г/л, от приблизительно 0 г/л до приблизительно 4 г/л, или от приблизительно 0 г/л до приблизительно 3 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии; и концентрацию галактозы в истощенной питательной среде можно поддерживать на уровне от приблизительно 2 г/л до приблизительно 12,5 г/л, от приблизительно 3 г/л до приблизительно 12,5 г/л, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 12,5 г/л, от приблизительно 2 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 3 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 10 г/л, от приблизительно 2 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 3 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 9 г/л, от приблизительно 2 г/л до приблизительно 8 г/л, от приблизительно 3 г/л до приблизительно 8 г/л или от приблизительно 4 г/л до приблизительно 8 г/л посредством

болюсной подпитки или перфузии.

[53] В определенных вариантах осуществления в комбинации с пониженной концентрацией глюкозы среда для культивирования клеток содержит сахарозу в концентрации до приблизительно 48 г/л, например от приблизительно 16 г/л до приблизительно 24 г/л, или дополняется ей.

[54] Культуру клеток млекопитающих как правило выращивают в биореакторе, например в биореакторе объемом от 500 л до 20000 л. В определенных вариантах осуществления используются биореакторы объемом от 1000 л до 2000 л. В биореакторе инокулируют по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ и больше жизнеспособных клеток/мл в бессывороточной среде для культивирования. В определенных вариантах осуществления уровень инокуляции составляет приблизительно $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. После инокуляции в производственный биореактор клетки млекопитающих проходят экспоненциальную фазу роста. Фазу роста можно поддерживать с помощью способа периодического культивирования с подпиткой с болюсными подпитками бессывороточной среды, содержащей от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л глюкозы. Такие дополнительные болюсные подпитки как правило начинают вскоре после инокуляции клеток в биореактор, в то время, когда ожидается или определено, что культура клеток нуждается в подпитке. Например, подпитку можно начинать приблизительно на 3 или 4 день культивирования или на день или два раньше или позже. Культура может получать две, три или более болюсных подпитки во время фазы роста. Ни базальная среда для культивирования клеток, ни среда с болюсной подпиткой не содержат галактозу или сахарозу.

[55] Когда клетки входят в стационарную фазу или фазу продуцирования, или когда культура клеток достигла желаемой плотности жизнеспособных клеток и/или клеточного титра, периодическое культивирование с болюсными подпитками может быть прекращено и может быть начата перфузия. Перфузионная культура представляет собой культуру, в отношении которой в клеточную культуру вносят свежую перфузионную среду с подпиткой с одновременным удалением истощенной питательной среды. Перфузия может быть непрерывной, ступенчатой, прерывистой или представлять собой комбинацию любого или всех из перечисленного. Значения скорости перфузии могут составлять меньше рабочего объема для множества рабочих объемов в день. Предпочтительно клетки остаются в культуре и истощенная питательная среда, которую удаляют, по существу не содержит клеток или содержит значительно меньше клеток, чем культура. Перфузия может быть осуществлена с помощью ряда способов, включая центрифугирование, седиментацию или фильтрацию, см., например, Voisard et al., (2003), *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. Предпочтительным способом фильтрации является фильтрация с попеременным тангенциальным потоком. Попеременный тангенциальный поток поддерживается за счет перекачивания среды через модули половолоконных фильтров. См., например, патент США № 6544424. Модули из полового волокна могут представлять собой микрофильтры или ультрафильтры.

[56] Когда периодическая культура с подпиткой достигает предварительно определенной триггерной точки, например, необходимой жизнеспособности клеток, плотности клеток, процента объема осажденных клеток, титра, скорректированного титра объема осажденных клеток, возраста и т. п., можно осуществлять переход между периодическим культивированием с подпиткой и перфузией. Например, такой переход можно осуществлять приблизительно на 7-й день культивирования, но можно и на день или два раньше или позже. Состав перфузионной среды включает глюкозу в концентрации до 20 г/л или больше, но не содержит галактозу или сахарозу. В одном варианте осуществления перфузионная среда содержит от приблизительно 4 г/л до приблизительно 18 г/л глюкозы.

[57] Когда перфузионная культура достигает предварительно определенной триггерной точки, например, необходимой жизнеспособности клеток, плотности клеток, процента объема осажденных клеток, титра, скорректированного титра объема осажденных клеток, возраста и т. п., концентрация глюкозы в среде для культивирования клеток понижается. Например, такой переход может начаться на 11 день культивирования, но может произойти на день или два раньше или позже. В это время культуру клеток подвергают перфузии средой для культивирования клеток, содержащей более низкую концентрацию глюкозы.

[58] Состояние с низким содержанием глюкозы в культуре клеток можно поддерживать путем контроля концентрации глюкозы в культуре клеток, например путем измерения концентрации глюкозы в истощенной питательной среде и регулирования концентрации глюкозы в составе перфузионной среды для поддержания необходимого уровня.

[59] Клеточную культуру можно непрерывно поддерживать в состоянии с низким содержанием глюкозы с добавлением галактозы или сахарозы. Клеточную культуру можно поддерживать в состоянии с низким содержанием глюкозы с добавлением галактозы или сахарозы до сбора клеток. Культуру клеток можно восстановить до нормального уровня глюкозы без добавления галактозы или сахарозы, и весь процесс начнется заново.

[60] Клеточную культуру можно также поддерживать в системе перфузионного культивирования как для фазы роста, так и для фазы продуцирования. После инокулирования в производственный биореактор клетки млекопитающих проходят фазу экспоненциального роста, в ходе которой клеточную культуру подвергают перфузии посредством бессывороточной среды и/или химически определенной среды для культивирования клеток.

[61] Одним иллюстративным вариантом осуществления является способ СР4, как подробно описано ниже.

[62] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ увеличения уровня высокого содержания маннозы, присутствующей на молекулах деносумаба, где указанные молекулы деносумаба рекомбинантно экспрессируются клеткой-хозяином

млекопитающего, предусматривающий: (а) инкубирование указанной клетки-хозяина млекопитающего в первой среде для культивирования во время фазы роста до тех пор, пока плотность клеток не достигнет по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл, где указанная первая среда для культивирования содержит от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л глюкозы; и затем (б) инкубирование клеток-хозяев из стадии (а) во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования для экспрессии указанных молекул деносуаба, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л глюкозы и от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л галактозы. В результате описанного способа процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, увеличен по сравнению с контролем.

[63] Контроль может представлять собой предварительно определенный диапазон или порог, диапазон, общепринятый в данной области техники, или ретроспективные диапазоны, известные при получении деносуаба. В качестве альтернативы, контроль может представлять собой эталонную партию, в которой клетки-хозяева культивируют в среде для культивирования, где концентрацию глюкозы не снижают и где не добавляют альтернативный источник углерода. Например, клетки-хозяева можно культивировать в первой среде, содержащей от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л (например, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 18 г/л) глюкозы в течение всей фазы продуцирования, без переноса во вторую среду для культивирования, содержащую от приблизительно 0 г/л до приблизительно 10 г/л (например, от приблизительно 1 г/л до приблизительно 5 г/л) глюкозы и от приблизительно 5 г/л до приблизительно 20 г/л (например, от приблизительно 10 г/л до приблизительно 12 г/л) галактозы.

[64] В определенном варианте осуществления контроль представляет собой заранее определенный порог. Например, контроль может иметь уровень высокого содержания маннозы приблизительно 1,8% или меньше, приблизительно 1,7% или меньше, приблизительно 1,6% или меньше, приблизительно 1,5% или меньше, приблизительно 1,4% или меньше, приблизительно 1,3% или меньше, приблизительно 1,2% или меньше, приблизительно 1,1% или меньше, приблизительно 1,0% или меньше, приблизительно 0,9%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,7%, приблизительно 0,6%, приблизительно 0,5%, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,2% или приблизительно 0,1% или меньше.

[65] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен деносуаб, полученный рекомбинантным путем, где от приблизительно 2% до приблизительно 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298. Например от приблизительно 2% до приблизительно 14%, от приблизительно 3% до приблизительно 14%, от приблизительно 4% до приблизительно 14%, от приблизительно 5% до приблизительно 14%, от приблизительно 2% до приблизительно 13%, от приблизительно 2% до приблизительно 12%, от приблизительно 2% до приблизительно 11%, от приблизительно 3% до приблизительно 13%, от приблизительно 3% до приблизительно

12%, от приблизительно 3% до приблизительно 11%, от приблизительно 4% до приблизительно 13%, от приблизительно 4% до приблизительно 12%, от приблизительно 4% до приблизительно 11%, от приблизительно 2% до приблизительно 6,5%, от приблизительно 3% до приблизительно 6,5%, от приблизительно 4% до приблизительно 6,5%, от приблизительно 8,5% до приблизительно 14%, от приблизительно 8,5% до приблизительно 13%, от приблизительно 8,5% до приблизительно 12%, от приблизительно 8,5% до приблизительно 11%, приблизительно 2%, приблизительно 2,5%, приблизительно 3%, приблизительно 3,5%, приблизительно 4%, приблизительно 4,5%, приблизительно 5%, приблизительно 5,5%, приблизительно 6%, приблизительно 6,5%, приблизительно 7%, приблизительно 7,5%, приблизительно 8%, приблизительно 8,5%, приблизительно 9%, приблизительно 9,5%, приблизительно 10%, приблизительно 10,5%, приблизительно 11%, приблизительно 11,5%, приблизительно 12%, приблизительно 12,5%, приблизительно 13%, приблизительно 13,5% или приблизительно 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

[66] В определенном варианте осуществления процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, составляет от приблизительно 5% до приблизительно 14%. В определенном варианте осуществления процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, составляет от приблизительно 5% до приблизительно 12%. В определенном варианте осуществления процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, составляет от приблизительно 5% до приблизительно 11%.

[67] В определенном варианте осуществления процент молекул деносуаба, имеющих высокое содержание маннозы в сайте N-298, является отличным от диапазона от 6,5% до 7,5%, от 6,5% до 8,5% или от 7,5% до 8,5%.

[68] Как описано выше, уровень высокого содержания маннозы, выраженный в данном документе в процентах, не следует воспринимать буквально как относящийся к подсчету высокого содержания маннозы на уровне отдельных молекул. Вместо этого процент отражает относительный процент видов с высоким содержанием маннозы на основе общего содержания N-гликанов в композиции на основе антител с использованием любого из широко используемых аналитических способов. Например (см., например, пример 3.2, пример 7.1) процент может быть рассчитан на основе площадей хроматографических пиков.

[69] Приведенные в данном документе диапазоны уровней высокого содержания маннозы в деносуабе в значительной степени основаны на оценке РК/PD (по сути аналогичной РК по сравнению с коммерчески доступными Prolia® и Xgeva®). Самый широкий диапазон (например, 2%-14%) не следует рассматривать как определяющий критерий для оценки биоподобия FDA. Для оценки биоподобия FDA рекомендует поэтапный подход для получения совокупности доказательств для демонстрации биоподобия между предлагаемым биоподобным продуктом и инновационным (эталонным) биологическим продуктом. Пошаговый подход начинается с аналитических

исследований для функциональных и структурных характеристик на различных этапах производственного процесса предлагаемого биоподобного продукта. Аналитическая оценка сходства включает определение критических качественных атрибутов (CQA), которые имеют отношение к клиническим исходам. Следовательно, с целью демонстрации биоподобия может потребоваться другой или более узкий диапазон высокого содержания маннозы. Для биоподобия также может быть необходимым, чтобы биоподобный продукт соответствовал другим атрибутам (например, другим типам гликанов).

3.2 Деносумаб с пониженным уровнем высокого содержания маннозы

[70] В данном документе также предусмотрен деносумаб с пониженным уровнем высокого содержания маннозы. В одном иллюстративном варианте осуществления (см. способ СРЗ, подробно описанный ниже) менее 1% полученного рекомбинантным путем деносумаба имеет Man-5 в сайте N-298.

[71] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, и где от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,8% молекул деносумаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298. В определенных вариантах осуществления приблизительно 0,2%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,5%, приблизительно 0,6%, приблизительно 0,7%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,9%, приблизительно 1,0%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,8%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,8%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,7%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,6%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,5%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,4%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,3%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,2%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,1%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,0%, от приблизительно 0,3% до приблизительно 1,8%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 1,8%, от приблизительно 0,3% до приблизительно 1,5%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 1,5%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,5%, от приблизительно 0,3% до приблизительно 1,2%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 1,2%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,2%, от приблизительно 0,3% до приблизительно 1,0%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 1,0% или от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,0% молекул деносумаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

[72] На эффективность терапевтических антител влияет скорость клиренса из сыворотки, т. е. период полувыведения антител из сыворотки крови. Период полувыведения антител IgG из сыворотки крови регулируется рядом рецепторов, в том

числе рецепторами маннозы, которые связывают как патогены с высоким содержанием маннозы, так и эндогенные белки. В целом, IgG, содержащие гликаны с высоким содержанием маннозы, у человека выводятся быстрее, чем другие формы гликанов (Goetze et al. *Glycobiology* vol. 21. № 7 pp. 949-959, 2011). Следовательно, уменьшение количества гликоформ с высоким содержанием маннозы улучшает период полувыведения композиции на основе антител, что является необходимым признаком качества.

[73] В частности, Goetze отметил, что разница в периоде полувыведения между моноклональным антителом (Mab1) и M5-содержащей популяцией Mab1 увеличивается с уменьшением дозы (таблица VII), указывая на то, что M5-содержащие IgG выводятся относительно быстрее при более низких внутривенных дозах. Авторы предположили, что рецептор маннозы способствует более быстрому клиренсу популяции M5 IgG и более медленный относительный клиренс при более высоких дозах может отражать насыщение этого рецептора. Хотя период полувыведения сывороточного IgG как правило опосредуется FcRn и период полувыведения терапевтических IgG может дополнительно модулироваться клиренсом на основе мишеней, рецептор маннозы, по-видимому, способствует более быстрому клиренсу неприродных (с высоким содержанием маннозы) вариантов гликанов терапевтических IgG. Это согласуется с ролью, которую рецептор маннозы играет в клиренсе экзогенных патогенов, а также нежелательных эндогенных молекул, и подтверждается более ранними исследованиями, демонстрирующими более быстрый клиренс M5-содержащего IgG1 у мышей.

[74] В клиническом исследовании здоровым добровольцам вводили деносумаб, полученный с помощью CP2, или деносумаб, полученный с помощью CP3. Анализ PK/PD показал, что деносумаб, полученный с помощью CP3, имеет в среднем на 10% дольший период полувыведения по сравнению с деносумабом, полученным с помощью CP2. Следовательно, деносумаб, полученный с помощью CP3, имеет потенциальную пользу в виде пролонгированного терапевтического эффекта из-за его благоприятных профилей PK/PD. Этот положительный эффект, вероятно, приведет к менее частому дозированию и повышению соблюдения пациентом режима лечения.

3.3 Аналитические способы оценки высокого содержания маннозы

[75] Для анализа структур с высоким содержанием маннозы на полученном рекомбинантным путем деносумабе можно использовать различные способы. Такие способы можно применять для измерения одного или нескольких из следующего: присутствие и/или высокое содержание маннозы в препарате гликана или гликопротеина (например, относительно общей массы гликана); относительные соотношения структур с высоким содержанием маннозы (например, относительные соотношения видов с высоким содержанием маннозы по отношению друг к другу (например, относительные содержания или соотношения Man-5, Man-6, Man-7, Man-8 и/или Man-9 и их изомеров), относительные соотношения структур с высоким содержанием маннозы к гибридным структурам, относительные соотношения структур с высоким содержанием маннозы к комплексным структурам, относительные соотношения структур с высоким содержанием

маннозы к фукозилированным структурам); наличие или содержание модифицированных структур с высоким содержанием маннозы (например, присутствие или содержание фукозилированных структур с высоким содержанием маннозы).

[76] Высокое содержание маннозы можно измерить с помощью одного или нескольких способов, хорошо известных в данной области техники, например, как описано в Wuhler et al. (*Journal of Chromatography B* Vol. 825: 124-133, 2005) и Dell et al. (*Science* Vol. 291: 2351-2356), и тех, что описаны в данном документе, в том числе, например, аналитический способ N-гликанового картирования гликопротеинов. Вкратце, N-гликаны удаляют ферментативно из рекомбинантных гликопротеинов, таких как рекомбинантное моноклональное антитело, и подвергают мечению флуоресцентной меткой (2-аминобензамидом) на восстанавливающем конце. Флуоресцентные N-гликаны разделяют посредством анионообменной хроматографии с высоким pH (HPAEC) и обнаруживают посредством флуоресцентного детектирования. Разделение нейтральных N-гликанов как правило основано на возрастающей сложности структур N-гликанов. Разделение заряженных N-гликанов основано на количестве и типе сиаловой кислоты, сульфата или других присутствующих модификаций, из которых может быть получено зарядовое число. Такие гликановые профили тестируемых образцов визуально сравнивают с соответствующим стандартом.

[77] Высокое содержание маннозы также можно измерить с использованием способа, описанного в WO 2007/087384, который представляет собой высокопроизводительный способ обнаружения и/или количественного определения высокого содержания маннозы в гликопротеине. Вкратце, гликопротеин расщепляется эндогликозидазой с последующим восстановлением расщепленных гликопротеинов с использованием восстанавливающего средства (если требуется) и разделением расщепленных гликопротеинов посредством денатурирующего электрофореза. Соотношение гликанов с высоким содержанием маннозы/гибридного типа определяют путем вычитания фракции негликозилированной тяжелой цепи (пиковая фракция без обработки эндогликозидазой) из фракции дегликозилированной тяжелой цепи (пик после расщепления эндогликозидазой). Фракцию негликозилированной тяжелой цепи или фракцию пика без обработки эндогликозидазой получают, подвергая тот же образец или композицию тем же условиям расщепления, за исключением того, что в ней нет эндогликозидазы. Эту стадию можно проводить одновременно со стадией расщепления эндогликозидазой или отдельно от нее.

[78] Можно применять любые эндогликозидазы, которые избирательно расщепляют гликаны с высоким содержанием маннозы и гибридные гликаны между GlcNAc1 и GlcNAc2 на ядре гликана (или образуют короткие гликаны на белке), оставляя интактными сложные N-связанные гликаны. Конкретные условия осуществления расщепления эндогликозидазой, в том числе концентрация фермента, температура инкубации и время расщепления, зависят от типа используемой эндогликозидазы. Примеры эндогликозидаз, относящихся к данному изобретению, включают без

ограничения эндогликозидазу Н и эндогликозидазу F1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения образец, содержащий гликопротеины, обрабатывают эндогликозидазой Н при 37°C в течение приблизительно 2 часов, восстанавливают β -меркаптоэтанолом и подвергают анализу CE-SDS.

[79] Примеры способов отделения дегликозилированных гликопротеинов, например, дегликозилированного антитела, от гликозилированных гликопротеинов, например, гликозилированного антитела, включают без ограничения следующие два способа.

[80] 1) CE-SDS в восстанавливающих условиях. Гликозилированный гликопротеин, например антитело, денатурируют с помощью SDS и восстанавливающего средства, и его тяжелую цепь (HC) при участии гликана отделяют от расщепленной HC (дегликозилированной HC) посредством капиллярного электрофореза-SDS (CE-SDS). Из УФ-сигнала получают электрофореграмму. Площади под пиками пропорциональны относительным количествам. Следовательно, высокое содержание маннозы/гибридный тип определяют из фракции, элюируемой в более раннем дегликозилированном положении HC. Поскольку GlcNAc-HC мигрирует совместно с дегликозилированной HC, % дегликозилированной HC из нерасщепленного образца вычитается из пика примеси, расположенного перед главным пиком, расщепленного образца для получения значения % высокого содержания маннозы. Для разделения требуется 15-30 минут в зависимости от конфигурации.

[81] 2) Микрожидкостный CE-SDS. Гликопротеин денатурируют как в 1), но разделяют с использованием устройства "лаборатория на чипе", например, LC90 от Caliper. Тот же принцип используется в анализе и разделении, хотя для обнаружения белка используется флуоресцентный краситель. Время разделения сокращается приблизительно до 30 секунд на анализ, и образцы можно отбирать с микротитрационного планшета.

[82] В примере 7.1 применяют жидкостную хроматографию гидрофильных взаимодействий (HILIC). Вкратце, виды гликанов можно проанализировать на основе следующих стадий: (i) высвобождения N-гликанов (например, с помощью фермента, например, PNGазы F), (ii) мечения (например, 2-аминобензойной кислотой или 2-аминобензамидом), (iii) удаления свободной метки (например, посредством гель-фильтрации или твердофазной экстракции); (iv) разделения видов гликанов посредством HILIC; и (v) обнаружения (например, посредством флуоресцентной спектрометрии). Дополнительные сведения о HILIC предоставлены Melmer et. al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, September 2010, Volume 398, Issue 2, pp 905-914.

[83] Другой широко используемый способ представляет собой жидкостную хроматографию-тандемную масс-спектрометрию (LC-MS). После высвобождения N-гликанов, мечения и удаления свободной метки образцы можно анализировать с помощью способов, сочетающих возможности физического разделения жидкостной хроматографии (или HPLC) с возможностями анализа масс масс-спектрометрии (MS). См., например,

Wang et. al., *Biotech Method*, 17 January 2018, doi.org/10.1002/biot.201700185.

[84] Дополнительные подходящие способы включают без ограничения MALDI-TOF-анализ в режиме фиксации положительных ионов, MALDI-TOF-анализ в режиме фиксации отрицательных ионов, HPLC, слабую анионообменную хроматографию (WAX), нормально-фазовую хроматографию (NP-HPLC), хроматографию на Bio-Gel P-4, анионообменную хроматографию и одномерную ЯМР-спектроскопию и их комбинации. См., например, Pace et al., *Biotechnol.Prog.*, 2016, Vol.32, No.5 pages 1181-1192; Shah, B. et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2014) 25: 999; Mattu et al., *JBC* 273: 2260-2272 (1998); Field et al., *Biochem J* 299(Pt 1): 261-275 (1994); Yoo et al., *MAbs* 2(3): 320-334 (2010) Wuhrer M. et al., *Journal of Chromatography B*, 2005, Vol.825, Issue 2, pages 124-133; Ruhaak L.R., *Anal Bioanal Chem*, 2010, Vol. 397:3457-3481; Kuroguchi et al., *PLOS One* 10(7): e0132848; doi:10.1371/journal.pone.0132848; Thomann et al., *PLOS One* 10(8): e0134949. Doi:10.1371/journal.pone.0134949; Pace et al., *Biotechnol. Prog.* 32(5): 1181-1192 (2016); and Geoffrey, R. G. et. al. *Analytical Biochemistry* 1996, Vol. 240, pages 210-226.

[85] При оценке высокого содержания маннозы для сравнения можно использовать контроль, как описано выше.

4. ГЛИКИРОВАНИЕ ПОЛУЧЕННОГО РЕКОМБИНАНТНЫМ ПУТЕМ ДЕНОСУМАБА

[86] Гликирование (иногда называемое неферментативным гликозилированием) является результатом ковалентного связывания молекулы сахара, такой как глюкоза или фруктоза, с молекулой белка или липида без контролирующего действия фермента. Гликирование происходит на положительно заряженных первичных аминах, как правило расположенных на поверхности белковых молекул. Никакой конкретной последовательности, которая сигнализирует о потенциальном сайте гликирования, не идентифицировано. Однако было обнаружено, что основные остатки (аргинины и другие лизины) коррелируют с возникновением гликирования в некоторых белках с известной структурой. Гликирование отличается от N-гликозилирования в сайте N-298.

[87] Для терапевтических mAb потенциальные эффекты гликирования, например, блокирование биологически функционального сайта или дальнейшее разрушение, вызывающее агрегацию, делают гликирование потенциально критическим атрибутом качества (CQA). Влияние гликирования на активность антител варьировалось от отсутствия эффекта (Quan et al., *Anal Biochem* 2008; 373(2):179-91; Miller et al., *J Pharm Sci* 2011; 100(7):2543-50) до потери активности (Kennedy et al., *Clin Exp Immunol* 1994; 98(2):245-51; Dolhofer et al., *Biol Chem Hoppe Seyler* 1985; 366(4):361-6).

[88] Поскольку остаток лизина является заряженным и часто участвует в белок-белковых взаимодействиях, было неожиданно, что значительно увеличенное гликирование не повлияло на биологическую активность деносумаба, полученного с помощью CP4. Таким образом, в одном аспекте в данном документе предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где по меньшей мере 15% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина. Как показано в примерах, деносумаб, полученный с помощью CP4,

демонстрирует более высокий уровень гликирования по сравнению с деносумабом, полученным с помощью CP2. Неожиданно, но, несмотря на более высокий уровень гликирования, связывание деносумаба с его лигандом и биологическая активность не подвергаются влиянию. Фактически в одном эксперименте с принудительным гликированием до 70% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина, в то время как его биологическая активность сохраняется. Таким образом в определенных вариантах осуществления приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, от приблизительно 15% до приблизительно 70%, от приблизительно 15% до приблизительно 65%, от приблизительно 15% до приблизительно 60%, от приблизительно 15% до приблизительно 55%, от приблизительно 15% до приблизительно 50%, от приблизительно 15% до приблизительно 45%, от приблизительно 15% до приблизительно 40%, от приблизительно 15% до приблизительно 35%, от приблизительно 15% до приблизительно 30%, от приблизительно 20% до приблизительно 70%, от приблизительно 20% до приблизительно 65%, от приблизительно 20% до приблизительно 60%, от приблизительно 20% до приблизительно 55%, от приблизительно 20% до приблизительно 50%, от приблизительно 20% до приблизительно 45%, от приблизительно 20% до приблизительно 40%, от приблизительно 20% до приблизительно 35%, от приблизительно 20% до приблизительно 30%, или приблизительно 24% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина.

[89] Другое неожиданное открытие состоит в том, что лизин, гликированный галактозой, не влияет на биологическую активность или иммуногенность деносумаба. Галактоза естественным образом присутствует в сыворотке крови человека в количестве приблизительно 0,3 мг/дл. При таких низких уровнях галактозы в сыворотке крови маловероятно, что здоровые индивидуумы будут иметь циркулирующие белки с измеримыми уровнями гликирования галактозой, за исключением пациентов с галактоземией. Таким образом, клиническая безопасность гликирования галактозой была неизвестна. Было обнаружено, что в случае деносумаба высокие уровни деносумаба, гликированного галактозой, не влияли на иммуногенность. Таким образом, в другом аспекте в данном документе предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где по меньшей мере 5% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина, которые содержат фрагмент галактозы. Например приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, от приблизительно 5%

до приблизительно 35%, от приблизительно 5% до приблизительно 30%, от приблизительно 5% до приблизительно 25%, от приблизительно 5% до приблизительно 20%, от приблизительно 5% до приблизительно 15%, от приблизительно 10% до приблизительно 35%, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 10% до приблизительно 25%, от приблизительно 10% до приблизительно 20% или от приблизительно 10% до приблизительно 15% молекул деносумаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина, которые содержат фрагмент галактозы.

[90] Аналогично описанным выше уровням гликанов в сайте N-298, уровень гликирования, выраженный в данном документе в процентах, не следует воспринимать буквально как относящийся к подсчету молекул с гликированными лизинами на уровне отдельных молекул. Вместо этого процент отражает относительный процент гликированных видов лизина на основе общего содержания лизина в композиции на основе антител с использованием любого из широко используемых аналитических способов. См., например, пример 7.2, где процентное содержание гликозилированного лизина при K-98 рассчитано на основании пиков CE-HPLC.

[91] В определенных вариантах осуществления соотношение лизина, гликированного галактозой, к лизину, гликированному глюкозой, составляет от приблизительно 1:10 до приблизительно 10:1, например приблизительно 1:10, приблизительно 1:9, приблизительно 1:8, приблизительно 1:7, приблизительно 1:6, приблизительно 1:5, приблизительно 1:4, приблизительно 1:3, приблизительно 1:2, приблизительно 1:1, приблизительно 2:1, приблизительно 3:1, приблизительно 4:1, приблизительно 5:1, приблизительно 6:1, приблизительно 7:1, приблизительно 8:1, приблизительно 9:1, приблизительно 10:1, от приблизительно 7:1 до приблизительно 1:7, от приблизительно 6:1 до приблизительно 1:6, от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, от приблизительно 4:1 до приблизительно 1:4, от приблизительно 3:1 до приблизительно 1:3 или от приблизительно 2:1 до приблизительно 1:2.

[92] В определенных вариантах осуществления гликированный лизин выбран из группы, состоящей из: (i) тяжелой цепи K76, K98, K218, K249, K318, K327 и K335; и (ii) легкой цепи K104, K108, K150, K184 и K191.

[93] В определенных вариантах осуществления молекулы деносумаба по настоящему изобретению связываются с высокой аффинностью с RANKL человека, но не с RANKL мыши. Аффинность связывания антитела может быть выражена как значение K_D , которое относится к скорости диссоциации в отношении конкретного взаимодействия антиген-антитело. K_D представляет собой соотношение скорости разрушения комплекса, также называемой "скоростью диссоциации (k_{off})", к скорости образования комплекса или "скорости ассоциации (k_{on})". Таким образом, K_D равна k_{off}/k_{on} (диссоциация/ассоциация) и выражается как молярная концентрация (M), и чем меньше K_D , тем сильнее аффинность связывания. Значения K_D для антител можно определить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Если не указано иное, "аффинность связывания" относится к моновалентным взаимодействиям (внутренняя активность;

например, связывание антитела с антигеном посредством моновалентного взаимодействия).

[94] Значение K_D может быть определено непосредственно посредством хорошо известных способов и может быть вычислено даже для сложных смесей такими способами, как, например, изложенные в Casesi et al. (1984, Byte 9:340-362). Например, K_D можно установить с применением анализа связывания нитроцеллюлозного фильтра с двумя фильтрами, такого как описанный Wong & Lohman (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5428-5432). Другие стандартные анализы для оценки связывающей способности лигандов, таких как антитела, по отношению к целевым антигенам, известны в данной области техники, в том числе, например, ELISA, вестерн-блоттинг, RIA и анализ проточной цитометрии, и другие анализы, проиллюстрированные в другом месте в данном документе.

[95] Одним иллюстративным способом измерения значения аффинности связывания (K_D) является поверхностный плазмонный резонанс (SPR), обычно с использованием биосенсорной системы, например, системы BIACORE®. SPR относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биоспецифические взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIACORE®. Кинетический анализ BIACore включает анализ связывания и диссоциации антигена с чипа с иммобилизованной молекулой (например, молекулой, содержащей антигенсвязывающий домен) на их поверхности; или диссоциации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из чипа с иммобилизованным антигеном.

[96] В некоторых вариантах осуществления значение аффинности связывания (K_D) измеряют с использованием анализа кинетического исключения на основе раствора (KinExA™). В конкретном варианте осуществления измерение KinExA проводят с использованием прибора KinExA™ 3200 (Sapidyne). Анализ кинетического исключения (KinExA™) представляет собой платформу для иммуноанализа общего назначения (по сути проточный спектрофлуориметр), которая способна измерять константы равновесной диссоциации и константы скорости ассоциации и диссоциации для взаимодействий антиген/антитело. Поскольку KinExA™ выполняется после достижения равновесия, он представляет собой предпочтительную методику для измерения K_D высокоаффинных взаимодействий, где скорость диссоциации в отношении взаимодействия может быть очень низкой. Методологию KinExA™ можно в целом осуществлять как описано в Drake et al (2004) Analytical Biochemistry 328, 35-43.

[97] Другой способ определения K_D антитела представляет собой биослойную интерферометрию, как правило с использованием технологии OCTET® (система Octet QKe, ForteBio).

[98] Аффинность связывания с деносумабом как правило составляет менее 100 пМ. В некоторых вариантах осуществления деносумаб связывается с RANKL человека с аффинностью приблизительно 100 пМ или меньше, приблизительно 75 пМ или меньше,

приблизительно 50 пМ или меньше, приблизительно 25 пМ или меньше, приблизительно 20 пМ или меньше, приблизительно 10 пМ или меньше, приблизительно 5 пМ или меньше, от приблизительно 0,1 пМ до приблизительно 50 пМ, от приблизительно 0,5 пМ до приблизительно 50 пМ, от приблизительно 1 пМ до приблизительно 50 пМ, от приблизительно 0,1 пМ до приблизительно 25 пМ, от приблизительно 0,5 пМ до приблизительно 25 пМ или от приблизительно 1 пМ до приблизительно 25 пМ. В определенном варианте осуществления аффинность связывания измеряется согласно способу, описанному в Kostenuik et al., *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 24, 182-195 (2009), посредством анализа равновесного связывания раствора с использованием системы KinExA 3000 (Sapidyne Instruments). Вкратце, гранулы Reacti-Gel 63 предварительно покрывали 20 мг/мл RANKL человека при 4°C в течение ночи, блокировали 1 мг/мл BSA в течение 2 часов и трижды промывали PBS. Деносумаб (50 пМ) инкубировали с различными концентрациями растворимого RANKL человека (0-5 нМ) при комнатной температуре в течение > 6 ч, чтобы обеспечить равновесное связывание, прежде чем пропускать через гранулы, покрытые RANKL. Связывание свободного деносумаба с гранулами количественно определяли с помощью флуоресцентно меченного (цианиновый краситель Cy5) антитела козы к антителу человека.

[99] Для оценки уровня гликирования можно использовать ряд анализов. Одним иллюстративным способом является аффинная хроматография с участием бороната. Аффинная хроматография с участием бороната (ВАС) представляет собой методику выделения и обогащения цис-диолевых соединений. Боронатные функциональные группы на неподвижной фазе будут образовывать тетраэдрический анион в условиях щелочного pH, который может взаимодействовать с массивами цис-1,2-диолов, обнаруженными на молекулах сахара (Quan et al., *Anal Biochem* 2008; 373 (2):179-91) и разделять гликированные и негликированные виды. Для элюирования гликированных частиц взаимодействия нарушают понижением pH или добавлением конкурирующего источника гидроксильных групп, например, сорбита. ВАС использовали для анализа углеводов и интактных белков.

[100] Для анализа гликирования антител ВАС является стандартным способом идентификации, количественного определения и выделения гликированных антител, поскольку он требует минимальной подготовки образца и выполняется при естественных рабочих условиях. Оптимизация концентрации защитного средства, pH и буферного солевого состава обеспечивает количественное определение уровня гликирования нерасфасованного лекарственного вещества.

[101] Другие способы оценки уровня гликирования представляют собой способы на основании заряда. Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF) или динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование (icIEF) представляют собой способы разделения на основании заряда, с помощью которых можно обнаруживать гликирование вследствие потери положительного заряда на сайтах гликирования. Имеется

сдвиг в кислую область для полностью гликированных, удерживающих боронат фракций, по сравнению с негликированными, не удерживающих боронат фракциями. Известно, что icIEF обеспечивает разделение видов с разницей 0,05 pI и может отделять гликированные антитела, которые теоретически имеют разницу единиц 0,09 pI из-за блокированного остатка лизина. Это разделение по разнице зарядов также наблюдается в смешанных гликированных и негликированных боронатных фракциях.

[102] Посредством ионообменной хроматографии (ИЕС) также можно также разделять гликированные и негликированные белки, которые имеют разницу поверхностных зарядов. Анализ гликированных боронатных фракций показывает отчетливый кислотный сдвиг к основному пику в условиях линейного градиента. Соответственно, кислотные варианты, фракционированные в процессе ИЕС, также демонстрируют небольшое обогащение в отношении гликирования.

[103] Quan и др. (см. выше) сообщили о сдвиге в кислую область для полностью гликированного антитела, удерживающего боронат, по сравнению с исходным нефракционированным антителом. Величина сдвига была эквивалентна ~0,5 мМ хлорида натрия в линейном градиенте. Пики ИЕС для фракции, удерживающей боронат, также были заметно распространенными, тогда как пики ИЕС для фракции без удержания бороната (негликированной) были более резкими, чем для нефракционированного исходного материала. Тем не менее, ИЕС иногда может не иметь достаточного разрешения для разделения видов гликирования в исходном материале, что представляет собой комбинированный эффект заряда от нескольких сайтов низкоуровневого гликирования по всей молекуле. Для сравнения, молекулы с отсутствующим, одним или двумя остатками лизина на карбоксильных концах полностью отделены друг от друга, по-видимому, из-за единственного и уникального позиционного взаимодействия со смолой.

[104] Другой способ оценки уровня гликирования представляет собой жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию. Нисходящая масс-спектрометрия интактных антител или расщепленных ферментом фрагментов mAb-фрагментов также может быть использована для определения уровня гликирования либо посредством матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) (см., например, Kislinger et al., *Ann NY Acad Sci* 2005; 1043:249-59), либо ионизации с электрораспылением (ESI) (см., например, Miller et al., *J Pharm Sci* 2011; 100(7):2543-50). Поскольку каждый сайт гликирования демонстрирует сдвиг массы на +162 Да, нисходящий подход можно использовать для быстрой оценки уровня гликирования в антителе. Сообщалось, что после дегликозилирования и удаления С-концевого лизина количественное определение гликирования посредством масс-спектрометрии может иметь предел обнаружения 1,0% и предел количественного определения 3,0%, и существует корреляция между результатами ВАС и масс-спектрометрии.

[105] Чтобы определить расположение сайта гликирования, как правило используется подход восходящего пептидного картирования. Поскольку трипсин ингибируется посредством гликирования остатков лизина, пропущенное триптическое

расщепление с добавлением массы +162 Да указывает на гликированный лизин. Триптическое пептидное картирование собранной фракции, удерживаемой в процессе ВАС, или принудительно гликированного образца выявляет участки чувствительности к гликированию по всему антителу.

[106] Альтернативный способ фрагментации в масс-спектрометрии представляет собой диссоциацию с переносом электрона (ETD). Исследования по сравнению способов фрагментации показывают, что ETD обеспечивает полную фрагментацию последовательности без какой-либо нейтральной потери.

[107] Одним из способов повышения чувствительности и снижения нейтральной потери гликированного пептида является применение восстановления боргидридом натрия или цианоборгидридом натрия с последующим расщеплением трипсином и анализом пептидной карты посредством MS/MS-детектирования (см., например, Brady et al., Anal Chem 2007; 79(24):9403-13). В этом подходе связь между углеводом и пептидом стабилизируется за счет восстановленного фрагмента гликированного сахара, что приводит к более качественным спектрам MS/MS.

[108] Жидкостная хроматография-тандемная масс-спектрометрия (LC-MS/MS) также является широко используемым способом для изучения уровня гликирования белков.

[109] Также можно использовать колориметрический анализ. Кетоамин, образующийся при гликировании антител, можно количественно определять с помощью анализа восстановления нитросинего тетразолия (NBT). NBT восстанавливается кетоаминовой формой гликозилированного белка, что приводит к изменению оптической плотности при 525 нм. Этот способ использовался для измерения полилизина и гликированного альбумина.

[110] Кроме того, для изучения гликированных антител применяли формат твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), использующий связывание между образцом и первичным антителом, конъюгированным с биотином, которое нацелено на определенный вид конечного продукта гликирования.

5. ДРУГИЕ ВИДЫ ГЛИКАНОВ

[111] Широко известные виды гликанов представлены в таблице 2. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где от приблизительно 48% до приблизительно 70% молекул деносумаба содержат A2F-G0. Например, от приблизительно 48% до приблизительно 55%, от приблизительно 50% до приблизительно 65%, от приблизительно 50% до приблизительно 60% или от приблизительно 55% до приблизительно 65% молекул деносумаба содержат A2F-G0.

[112] В другом из аспектов в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где от приблизительно 30% до приблизительно 60% (например, от приблизительно 30% до приблизительно 55%, от приблизительно 30% до приблизительно 50%, от приблизительно

30% до приблизительно 45%, от приблизительно 35% до приблизительно 55%, от приблизительно 35% до приблизительно 50%, от приблизительно 35% до приблизительно 45%) молекул деносуаба содержат A2F-G0 в сайте N-298.

[113] В одном из аспектов в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где от приблизительно 9% до приблизительно 26% (например, от приблизительно 10% до приблизительно 26%, от приблизительно 11% до приблизительно 26%, от приблизительно 12% до приблизительно 26%, от приблизительно 13% до приблизительно 26%, от приблизительно 10% до приблизительно 20%, от приблизительно 15% до приблизительно 25%) молекул деносуаба содержат A2F-G1.

[114] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где от приблизительно 20% до приблизительно 50% молекул деносуаба содержат A2F-G1 в сайте N-298. Например, от приблизительно 25% до приблизительно 45%, от приблизительно 25% до приблизительно 40%, от приблизительно 30% до приблизительно 45% или от приблизительно 30% до приблизительно 40% молекул деносуаба содержат A2F-G1.

[115] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где указанные от приблизительно 0,1% до приблизительно 3% молекул деносуаба содержат A1-G0 в сайте N-298. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где указанные от приблизительно 0,5% до приблизительно 3% молекул деносуаба содержат A1-G0 в сайте N-298.

[116] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где от приблизительно 0,1% до приблизительно 4% молекул деносуаба содержат A1F-G0 в сайте N-298. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где от приблизительно 1% до приблизительно 5% молекул деносуаба содержат A1F-G0 в сайте N-298.

[117] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где от приблизительно 4% до приблизительно 10% молекул деносуаба содержат A2-G0 в сайте N-298. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где от приблизительно 4% до приблизительно 8% молекул деносуаба содержат A2-G0 в сайте N-298.

[118] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где от

приблизительно 1% до приблизительно 7% молекул деносумаба содержат A2-G1 в сайте N-298. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где от приблизительно 0,5% до приблизительно 4% молекул деносумаба содержат A2-G1 в сайте N-298.

[119] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где от приблизительно 3% до приблизительно 10% молекул деносумаба содержат A2F-G2 в сайте N-298. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где от приблизительно 0,3% до приблизительно 5% молекул деносумаба содержат A2F-G2 в сайте N-298.

[120] В одном из аспектов в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где приблизительно 5% или менее, приблизительно 4% или менее, приблизительно 3% или менее, приблизительно 2% или менее, от приблизительно 0,1% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 4%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 3%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 2,5%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 2% молекул деносумаба содержат сиалилированный N-гликан в сайте N-298. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где от приблизительно 0,3% до приблизительно 1% молекул деносумаба содержат сиалилированный N-гликан в сайте N-298. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где от приблизительно 0,3% до приблизительно 2% молекул деносумаба содержат сиалилированный N-гликан в сайте N-298. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносумаба, где от приблизительно 1% до приблизительно 3% молекул деносумаба содержат сиалилированный N-гликан в сайте N-298.

[121] Как описано выше, уровни различных видов гликанов, которые в данном документе выражены в процентах, не следует воспринимать буквально как относящиеся к подсчету содержания N-гликанов на уровне отдельных молекул. Процент отражает относительный процент видов гликанов на основании общего содержания N-гликанов в композиции на основе антител с использованием любого из широко используемых аналитических способов. Например (см., например, пример 3.2 и пример 7.1) процент может быть рассчитан на основе площадей хроматографических пиков.

[122] Хотя молекулы деносумаба, полученные с помощью проиллюстрированных способов, показали различное содержание гликанов вышеописанных видов, отличных от имеющих высокое содержание маннозы, на биологическую активность и профили PK/PD деносумаба не влияют вариации этих видов гликанов. Следовательно, профили гликанов

потенциально могут допускать значимые вариации. В определенных вариантах осуществления может быть необходимым наличие от приблизительно 48% до приблизительно 70% A2F-G0 и от приблизительно 13% до приблизительно 26% A2F-G1; или от приблизительно 48% до приблизительно 70% A2F-G0 и от приблизительно 10% до приблизительно 20% A2F-G1.

[123] Кроме того, самые широкие диапазоны (например, от приблизительно 48% до приблизительно 70% молекул деносуаба содержат A2F-G0) не следует принимать в качестве определяющих критериев для оценки биоподобия, поскольку оценка биоподобия основана на совокупности доказательств. Например, присутствие или отсутствие сахарного остатка (например, фукозы, сиаловой кислоты, концевой β -галактозы) на Fc-гликане влияет на конформацию Fc, таким образом потенциально влияя на Fc-опосредованные эффекторные функции. Известно, что гликан G0 взаимодействует со связывающим маннозу белком для (i) активации комплемента и (ii) облегчения клиренса из сыворотки крови (см., например, Dong, et al., *J. Immunol.*, 163 (1999), pp. 5427-5434; Malhotra, et al. *Nat. Med.*, 1 (1995), pp. 237-243). Количество гликоформы G2, как известно, увеличено у беременных женщин и в пуповине (Kibe, et al. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 21 (1996), pp. 57-63). Известно, что десиаилирование внутривенного иммуноглобулина (IVIg) нейтрализует противовоспалительные свойства у мышей линии KN (Yang et al., *Anal. Biochem.*, 448 (2014), pp. 82-91). Известно, что потеря ядра $\alpha(1,6)$ фукозы на IgG приводит к усилению антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической активности (ADCC) (см., например, Ferrara, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108 (2011), pp. 12669-12674; Shields, et al. *J. Biol. Chem.*, 277 (2002), pp. 26733-26740. Наконец, концевой моносахарид N-связанных сложных гликанов в некоторых случаях занят сиаловой кислотой. Присутствие такой сиаловой кислоты влияет на абсорбцию, период полувыведения из сыворотки крови и клиренс из сыворотки, а также на физические, химические и иммуногенные свойства соответствующего гликопротеина (см., например, Bork et al., *J Pharm Sci.* 2009 Oct;98(10):3499-508. doi: 10.1002/jps.21684). Следовательно, с целью демонстрации биоподобия могут потребоваться другие или более узкие диапазоны содержания гликанов.

6. ЛИНИИ КЛЕТОК

[124] Клеточные линии (также называемые "клетками-хозяевами"), используемые в настоящем изобретении, созданы с помощью генной инженерии для экспрессии деносуаба. Клеточные линии как правило получают из линии, происходящей от первичной культуры, которую можно поддерживать в культуре в течение неограниченного времени. Генетическая инженерия клеточной линии предусматривает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток рекомбинантной полинуклеотидной молекулой и/или иное изменение (например, путем гомологичной рекомбинации и активации гена или слияния рекомбинантной клетки с нерекомбинантной клеткой) для экспрессии у клетки-хозяина необходимого рекомбинантного полипептида. Способы и векторы для применения в клетках, и/или клеточных линиях, полученных с

помощью генной инженерии, для экспрессии представляющего интерес полипептида хорошо известны специалистам в данной области техники; например, различные способы показаны в *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, and quarterly updates); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69.

[125] Клеточные линии животных получают из клеток, предшественники которых были получены от многоклеточного животного. Одним типом линии клеток животных является линия клеток млекопитающих. Широкое разнообразие клеточных линий млекопитающих, подходящих для роста в культуре, доступно в Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния, США) и у коммерческих поставщиков. Примеры клеточных линий, широко используемых в промышленности, включают VERO, ВНК, HeLa, CV1 (в том числе Cos), MDCK, 293, 3T3, линии клеток миеломы (например, NSO, NS1), PC12, клетки WI38 и клетки яичника китайского хомячка (CHO).

[126] В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин млекопитающего представляет собой клетку грызуна. Примеры клеточных линий грызунов включают, например, клетки почки детеныша хомячка (ВНК) (например, ВНК21, ВНК ТК), клетки Сертоли мыши (ТМ4), клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A), клетки опухоли молочной железы мыши (ММТ), клетки гепатомы крысы (НТС), клетки миеломы мыши (NSO), клетки гибридомы мыши (Sp2/0), клетки тимомы мыши (EL4), клетки яичника китайского хомячка (CHO) и производные клеток CHO, клетки мышиногo эмбриона (NIH/3T3, 3T3 Li), клетки миокарда крысы (H9c2), миобласт мыши (C2C12) и клетки почки мыши (miMCD-3).

[127] В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин млекопитающего представляет собой клетку CHO. Используемый в данном документе термин "клетка CHO" также включает производные от CHO, где в клетку CHO были введены дополнительные генетические модификации. Клетки CHO широко используются для получения сложных рекомбинантных белков, например цитокинов, факторов свертывания крови и антител (Brasel et al. (1996), *Blood* 88:2004-2012; Kaufman et al. (1988), *J. Biol Chem* 263:6352-6362; McKinnon et al. (1991), *J. Mol Endocrinol* 6:231-239; Wood et al. (1990), *J. Immunol.* 145:3011-3016).

[128] Подходящие клетки CHO включают, например, линии DUXB11 и DG44. Эти две клеточные линии являются дефицитными по дигидрофолатредуктазной активности (DHFR) и, следовательно, зависят от экзогенного источника предшественников нуклеотидов для роста. Дефицит DHFR представляет собой легко изменяемый фенотип, подходящий для отбора для интеграции в геном и стабильной экспрессии экзогенной ДНК. Геномная интеграция достигается путем трансфекции клеток кассетами экспрессии гена, представляющего интерес, и гена DHFR. После трансфекции клетки помещают в селективную среду, в которой отсутствуют предшественники нуклеотидов. Кроме того, такие клетки легко подвергаются манипулированию в виде адгезивных или

суспензионных культур, и они обладают относительно хорошей генетической стабильностью. Клетки CHO и рекомбинантно экспрессируемые в них белки были всесторонне охарактеризованы и одобрены для применения в клиническом коммерческом производстве регулирующими органами.

[129] Экспрессия рекомбинантного белка в DHFR-дефицитных линиях клеток может быть дополнительно усилена добавлением метотрексата (MTX) к культурам, так что можно отобрать высокое число копий введенного вектора экспрессии. Метотрексат представляет собой конкурентный ингибитор фермента DHFR. Применение этого дополнительного давления отбора вместе с отсутствием предшественников нуклеотидов позволяет осуществлять отбор и выделение второстепенной популяции клеток, которые подверглись спонтанной амплификации интегрированного вектора экспрессии, содержащего селективируемый маркер DHFR и, в большинстве случаев, ген, представляющий интерес. Наличие множества копий генов помогает достичь высокого уровня экспрессии экзогенных белков. В качестве альтернативы, отбор с помощью MTX можно осуществлять независимо от дефицита DHFR (т. е. применять MTX для отбора клетки-хозяина, которая изначально является DHFR-компетентной).

[130] Другой подходящей линией клеток CHO является линия клеток CHO-K1 дикого типа (например, ATCC # CCL-61) и ее производные CHO-K1 SV. Одним из широко используемых способов отбора клеточных линий CHO-K1 является отбор с помощью глутаминсинтетазы (GS). В отсутствие экзогенного источника глутамина выживание клеток зависит от фермента GS, вырабатывающего глутамин. В случае линий клеток-хозяев, например, клеток NS/0, происходящих от мышинной миеломы, и клеток CHO, которые характеризуются относительно низкой эндогенной ферментативной активностью GS, способ обеспечивает простую схему отбора при применении селективируемого маркера GS в векторе экспрессии и в среде для отбора без глутамина. Подобно системе DHFR/MTX, к среде может быть добавлен конкурентный ингибитор GS метионинсульфоксимин (MSX) для создания дополнительного давления и отбора клеток CHO, которые управляют высокими уровнями экспрессии с интегрированного вектора.

[131] Клетки CHO-K1 или любые другие широко используемые клетки CHO также могут быть отобраны на основе MTX, с дефицитом DHFR или без него. В общем, когда используется DHFR-дефицитная линия клеток, число копий экзогенных последовательностей обычно намного выше, иногда более нескольких сотен копий.

[132] Другие штаммы клеток CHO, подходящие для описанного в данном документе изобретения, включают, например, клетки CHO-ICAM-1 и клетки CHO-hlFN γ . Эти генетически модифицированные клетки обеспечивают стабильную вставку рекомбинантной ДНК в конкретный ген или область экспрессии клеток, амплификацию вставленной ДНК и отбор клеток, демонстрирующих высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка.

[133] Дополнительные примеры клеточных линий CHO, обычно используемых в производственно-контрольной лаборатории, включают клетки CS-9 и AM-1/D (описанные

в патенте США № 6210924). И CS-9, и AM1/D получены из DUX B11 путем адаптации к бессывороточной среде и субклонирования. Другие иллюстративные линии клеток CHO включают EM9 (ATCC CRL-1861), UV20 (ATCC CRL-1862), CHO dfhr- (ECACC 94060607), RR CHO KI (ECACC 92052129), hCBE11 (ATCC PTA-3357), E77.4 (ATCC PTA-3765), hLT-B: R-hG1 CHO #14 (ATCC CRL-1 1965), MOR-CHO- MORAb-003-RCB (ATCC PTA-7552), клон AQ.C2 11B (ATCC PTA-3274), клон AQ.C2 11B (ATCC PTA-3274), hsAQC2 в CHO-DG44 (ATCC PTA- 3356), xrs5 (ATCC CRL-2348), Led [исходное название Pro- 5WgaRI3C] (ATCC CRL-1735), Pro-5 (ATCC CRL-1781), ACY1-E (ATCC 65421), ACY1-E (ATCC 65420), pgsE-606 (ATCC CRL-2246), CHO-CD36 (ATCC CRL-2092), pgsC-605 (ATCC CRL-2245), MC2/3 (ATCC CRL-2143), CHO-ICAM-1 (ATCC CRL-2093) и pgsB- 618 (ATCC CRL-2241). Линии клеток можно отбирать посредством определения того, какие из них имеют высокие уровни экспрессии рекомбинантного деносумаба.

[134] Как проиллюстрировано в данном документе, в способах CP3 и CP4 клетки CHO амплифицировали с применением отбора с помощью MTX во время фазы роста. Подсчитано, что в целом при отборе с помощью MTX клетка-хозяин содержит около 700-1000 копий рекомбинантной последовательности, с увеличением таким образом общего выхода образования рекомбинантного белка. Следовательно, в определенных вариантах осуществления клетки-хозяева млекопитающих по настоящему изобретению были амплифицированы путем отбора с помощью метотрексата (MTX). В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин млекопитающего содержит приблизительно 500 или более копий последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей деносумаб, например, приблизительно 500 копий или больше, приблизительно 600 копий или больше или приблизительно 700 копий или больше.

[135] В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин млекопитающего по настоящему изобретению содержит приблизительно 500 или более копий последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO. 3, и/или приблизительно 500 или более копий последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO:4.

[136] В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин млекопитающего по настоящему изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO:1, и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO:2. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин млекопитающего по настоящему изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, где указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:1, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:2. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин млекопитающего по настоящему изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO. 3, и/или последовательность нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO:4.

[137] В определенных вариантах осуществления линия клеток CHO представляет собой линию клеток, которая обеспечивает низкие содержания маннозы в сайте

N-298 при культивировании в среде, обеспечивающей достаточное количество глюкозы. К таким клеткам-хозяевам относятся те клетки СНО, которые при культивировании в среде для культивирования, содержащей от 1 г/л до 20 г/л глюкозы (например, от 4 г/л до 20 г/л глюкозы), продуцируют композиции деносуаба, где высокое содержание маннозы в сайте N-298 составляет приблизительно 1,8% или меньше. Например, когда клетки-хозяева культивируют в среде, содержащей от приблизительно 1 г/л до приблизительно 20 г/л (например, от приблизительно 4 г/л до приблизительно 18 г/л) глюкозы в течение всей фазы продуцирования (без перехода к среде с низким содержанием глюкозы), уровень высокого содержания маннозы в сайте N-298 составляет приблизительно 1,8% или меньше, приблизительно 1,7% или меньше, приблизительно 1,6% или меньше, приблизительно 1,5% или меньше, приблизительно 1,4% или меньше, приблизительно 1,3% или меньше, приблизительно 1,2% или меньше, приблизительно 1,1% или меньше, приблизительно 1,0% или меньше, приблизительно 0,9%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,7%, приблизительно 0,6%, приблизительно 0,5%, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,2% или приблизительно 0,1% или меньше. Поскольку такие клетки СНО не обеспечивают необходимого высокого содержания маннозы в сайте N-298 при культивировании в стандартной богатой глюкозой среде, существует особое преимущество применения описанных в данном документе способов для повышения уровня высокого содержания маннозы в молекулах деносуаба, продуцируемых такими клетками-хозяевами СНО.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СР2 И СР3

[138] Способ размножения в культуре СР2 начинали с размораживания флакона из рабочего банка клеток 70S. Содержимое размороженного флакона переносили в среду для роста культуры клеток СР2 во встряхиваемых колбах. Культуры пассировали в более крупных встряхиваемых колбах для до тех пор, пока клеточная масса не становилась доступной для объединения для инокуляции 20-литрового биореактора. Затем культуру помещали в биореактор объемом 60 л, а через три дня после размножения помещали в биореактор объемом 300 л. Через три-четыре дня пребывания в биореакторе объемом 300 л проводили инокуляцию культуры в производственном биореакторе на 2000 л.

[139] Способ размножения в культуре СР3 начинали с размораживания флакона с WCB клеточной линии 25B12. Содержимое размороженного флакона переносили в среду для роста культуры клеток СР3, содержащую метотрексат (МТХ), во встряхиваемых колбах. Культуры пассировали в более крупных колбах для встряхивания до тех пор, пока клеточная масса не становилась доступной для объединения для инокуляции 10-литрового культурального пакета биореактора. Через три дня в культуральном пакете биореактора объемом 10 л клеточную массу инокулировали в биореактор объемом 50 л, на этой стадии МТХ удаляли из питательной среды. За этим каждые три дня проводили последующее размножение в биореакторе объемом 100 л, затем объемом 500 л. Через три дня пребывания в биореакторе объемом 500 л проводили инокуляцию производственного

биореактора объемом 2000 л.

[140] Блок-схема способа, отображающая сравнение способов размножения и получения клеточных культур CP2 и CP3, представлена в таблице 3. В обоих способах использовали три стадии получения инокулята в биореакторе, прежде чем получить достаточное количество биомассы для инокуляции производственного биореактора. Во время работы инокуляционных биореакторов pH, температуру, давление, перемешивание и количество растворенного кислорода контролировали на заданных значениях, специфичных для каждого способа. Способ CP2 включал перенос полного объема между инокуляционными биореакторами, в то время как способ CP3 нацеливали на начальную плотность жизнеспособных клеток (VCD). Это было связано с эксплуатационными предпочтениями.

[141] Изменение клеточной линии с CP2 на CP3 приводило к более высоким выходам. Клеточная линия из CP3 (25B12) берет начало от родительской клетки CS-9 СНО.

[142] Другим изменением стало введение в способ размножения культуры культурального пакета для отдельных операций. Это технология одноразового биореактора, которую ввели для уменьшения числа встряхиваемых колб, необходимых для инокуляции биореактора N-3.

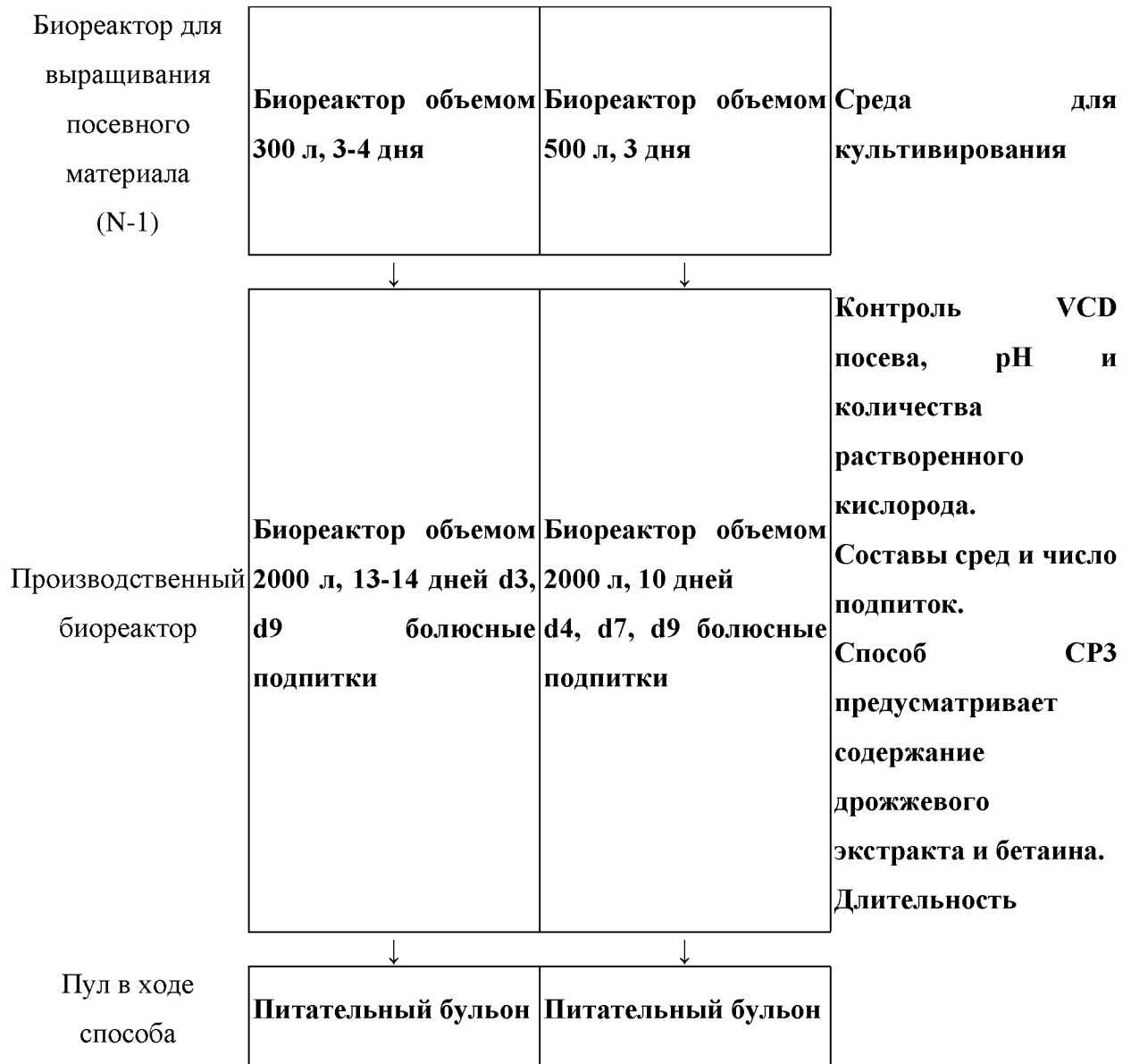
[143] Оба способа в производственном биореакторе выполняли в производственном сосуде объемом 2000 л при одной и той же заданной температуре. В ходе работы производственного биореактора температуру, начальную VCD, pH и количество растворенного кислорода контролировали на заданных значениях, специфичных для каждого способа, которые были оптимизированы для различных клеточных линий.

[144] В обоих способах инокуляцию проводили путем разбавления культуры предыдущего биореактора для выращивания посевного материала (N-1) в периодической среде производственного биореактора. Способ CP2 включал перенос полного объема с инокуляционного биореактора в производственный биореактор с максимальной начальной VCD 10×10^5 клеток/мл. Способ CP3 нацеливали на начальную VCD 5×10^5 клеток/мл. Это отличие было связано с эксплуатационными предпочтениями.

[145] Способ производства CP2 основывался на модифицированной среде DMEM/F12, и выполняли две болюсных подпитки на 3-й и 9-й день до сбора культуры на 14-й день. Питательная среда CP2 была основана на АСО 4.4 и содержала гидролизат сои. Способ производства CP3 основывался на среде IMX 7.0, и выполняли три болюсных подпитки на 4-й, 7-й и 9-й день до сбора культуры на 10-й день. Питательная среда CP3 была основана на средах AFM004 и AFM020 и содержала дрожжевой экстракт (Yeastolate). Все среды из обоих способов были основаны на среде DMEM/F12 и были оптимизированы для разных клеточных линий.

Таблица 3. Блок-схема фаз размножения (роста) клеточной культуры и продуцирования для способов CP2 и CP3 в отношении деносуμβα

<u>Стадии способа</u>	Способ СР2 (2000 л)	Способ СР3 (2000 л)	<u>Отличия</u>
Размораживание клеток	Размороженный флакон WCB Клеточная линия 70S	Размороженный флакон WCB Клеточная линия 25B12	Различные клеточные линии. СР2: 70S (род. AM1-D. Не содержит MTX) СР3: 25B12 (род. CS-9. Содержит 2 мкМ MTX)
Размножение культуры	Встряхиваемые колбы, 12-13 дней	Встряхиваемые колбы, 18-21 дней	Среда для культивирования. СР3 содержит MTX
Биореактор для выращивания посевого материала (N-4)		10 л культуральный пакет биореактора, 3 дня	Стадия в СР2 при отсутствии культурального пакета. Среда СР3 содержит MTX
Биореактор для выращивания посевого материала (N-3)	Биореактор объемом 20 л, 3 дня	Биореактор объемом 50 л, 3 дня	Среда для культивирования
Биореактор для выращивания посевого	Биореактор объемом 60 л, 3 дня	Биореактор объемом 100 л, 3 дня	Среда для культивирования



Пример 2. Сравнение способов сбора и очистки CP2 и CP3

[146] После завершения фазы продуцирования содержимое биореактора охлаждали и собирали. В способе CP2 осуществляли охлаждение до $18 \pm 3^\circ\text{C}$ и в способе CP3 осуществляли охлаждение до $10-15^\circ\text{C}$. Осветление во время сбора включало центрифугирование в тарельчатом сепараторе, глубинную фильтрацию (стадия 1) и мембранную фильтрацию (стадия 2).

[147] Центрифугирование в тарельчатом сепараторе завершало первичное отделение продуцирующих клеток и клеточного дебриса от среды для культивирования. За центрифугированием следовала стадия 1, (глубинная) фильтрация, посредством которой обеспечивали дополнительное очищение собранного центрифугата таким образом, что стадия 2, (мембранная) фильтрация, и последующие операции очистки могли быть выполнены без значительного загрязнения. После фильтрования на стадии 1, с помощью мембранного фильтра на стадии 2 обеспечивали сбор пула фильтрата с высокой степенью прозрачности и снижением бионагрузки.

[148] Блок-схема способа, отображающая сравнение способов очистки CP2 и CP3,

показана в таблице 4. Оба способа предусматривали один и тот же базовый тип отдельных операций, но рабочие параметры для каждой отдельной операции и порядок этих конечных операций были оптимизированы для каждого способа. Это было связано с различиями в клеточных линиях в восходящих параметрах производительности.

[149] Первой отдельной операцией в обоих способах была стадия аффинной хроматографии с белком А, выполняемая на осветленном сборе. Стадия хроматографии с белком А представляла собой стадию первичной очистки с применением специфического высокоаффинного взаимодействия между иммобилизованным лигандом белка А и Fc-областью деносумаба для захвата деносумаба. Второй отдельной операцией в обоих способах была стадия инактивации вирусов при низком рН, которую разработали для инактивации оболочечных вирусов.

[150] Затем в способе СР2 применяли 2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту (MES) и трис-растворы для нейтрализации пула продукта до рН 6,5 перед двустадийной фильтрацией. В способе СР3 применяли раствор тринатрийцитрата для нейтрализации пула продукта до рН 5,2 перед двустадийной фильтрацией. На этой стадии способ СР2 может предусматривать выдерживание при температуре 2-8°C для длительного хранения, пока не потребуется дальнейшая обработка. Способ СР3 может предусматривать выдерживание в течение 5 дней при комнатной температуре.

[151] Вторая стадия хроматографии и третья отдельная операция в обоих способах представляли собой катионообменные процессы (СЕХ). Условия эксплуатации для каждого способа были одинаковыми. Следующие две отдельные операции для способов представляли собой стадии вирусной фильтрации и хроматографии гидрофобных взаимодействий (НІС). Последняя отдельная операция для обоих способов представляла собой ультрафильтрацию и диафильтрацию (UF/DF) для замены очищенного деносумаба на буфер состава. Для СР2 конечная концентрация лекарственного вещества составляла 70 мг/мл. Для СР3 конечная концентрация лекарственного вещества составляла 120 мг/мл.

[152] Как показано в таблице 4, с применением способа СР3 наблюдали улучшение выхода образования деносумаба.

Таблица 4. Блок-схема очистки для способов получения деносумаба СР2 и СР3

<u>Стадии способа</u>	Способ СР2 (2000 л)	Способ СР3 (2000 л)
Аффинная хроматография с белком А	Отбор МАb	Отбор МАb SuRe
	↓	↓

Вирусная инактивация	Выдерживание при низком рН (рН 3,6 ± 0,1, 60-120 минут) Нейтрализация	Выдерживание при низком рН (рН 3,6 ± 0,1, 60-360 минут) Нейтрализация
Осветление	Осветление посредством глубинной фильтрации и фильтрации при 0,2 мкм	Осветление посредством глубинной фильтрации и фильтрации при 0,2 мкм
Долгосрочное промежуточное хранение	Промежуточное хранение продукта при 2-8°C	
Катионообменная хроматография	Fractogel SO₃⁻	Fractogel EMD SO₃⁻
Вирусная фильтрация	Вирусная фильтрация при 20 нм	
Хроматография гидрофобных взаимодействий	Phenyl Sepharose Fast Flow с высокой степенью замещения	Toyopearl Butyl-650M
Вирусная фильтрация		Вирусная фильтрация при 20 нм
Концентрирование и замена буфера	UF/DF до 70 мг/мл (Регенерированная целлюлоза 30 кДа)	UF/DF до 120 мг/мл (Регенерированная целлюлоза 30 кДа)
Конечная фильтрация лекарственного вещества	Фильтрация при 0,2 мкм	Фильтрация при 0,2 мкм
Хранение лекарственного вещества	Концентрация 70 мг/мл Поликарбонатные контейнеры 10 л (-30°C)	Концентрация 120 мг/мл Поликарбонатные контейнеры 10 л (-30°C)

ПРИМЕР 3. КАРТИРОВАНИЕ ГЛИКАНОВ ДЕНОСУМАБА, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ СПОСОБА CP2

[153] Гликозилирование деносумаба включает олигосахаридные структуры, занимающие единственный N-связанный сайт у аспарагина 298 на тяжелых цепях.

3.1 Занятость гликанов

[154] Занятость сайта N-гликозилирования в Asn-298 определяли по карте пептидов Lys-C деносумаба после инкубации с PNGазой-F. Масс-спектрометрический анализ продемонстрировал отсутствие ионов, соответствующих гликозилированному пептиду, после обработки PNGазой-F, подтверждая полное удаление N-гликанов. Пептиды, с отсутствием гликозилирования по Asn-298, были разделены как агликозилированные пептиды; пептиды с гликанами в Asn-298, которые были удалены с помощью PNGазой-F, были разделены как дегликозилированные пептиды. Идентификация и количественное определение агликозилированных и дегликозилированных пептидов на карте были установлены путем реконструкции хроматограмм извлеченных ионов (EIC) зарядовых состояний от +2 до +5 для обоих пептидов. Для реконструкции EIC применяли только моноизотопные пики для каждого состояния заряда 2 пептидов.

[155] Процентную занятость сайта N-гликозилирования определяли по абсолютным площадям пиков следов EIC для агликозилированных и дегликозилированных пептидов. Процент занятости рассчитывали с применением следующего уравнения:

$$\% \text{ занятости} = 100\% - \left[\frac{\text{Площадь}_{\text{агликозилированных пептидов}}}{\text{Площадь}_{\text{агликозилированных}} + \text{Площадь}_{\text{дегликозилированных}}} \times 100\% \right]$$

В расчетах предполагалось, что эффективность ионизации агликозилированных и дегликозилированных видов эквивалентна; на практике, учитывая, что агликозилированный пептид содержит остаток Asn, тогда как дегликозилированный пептид содержит отрицательно заряженный остаток Asp в положении 298, эффективность ионизации агликозилированных видов, вероятно, немного выше, чем дегликозилированных видов. Соответственно, доля агликозилированного пептида, вероятно, была завышена. Занятость сайта гликозилирования в Asn-298 составляла приблизительно 99,7%. Уровень агликозилированной формы в Asn-298 определяли как приблизительно 0,3% по карте пептидов Lys-C в сочетании с масс-спектрометрией.

[156] На основании массовых данных исследований пептидного картирования по всей последовательности, нет никаких доказательств каких-либо обнаруживаемых уровней дополнительного N-связанного гликозилирования или O-связанного гликозилирования.

3.2 Анализ масс N-связанных гликанов и O-связанных гликанов

[157] N-связанные гликаны были охарактеризованы посредством картирования олигосахаридов, масс-спектрометрии и экзогликозидазного секвенирования.

Картирование олигосахаридов включало высвобождение N-гликанов из белка посредством гидролиза с применением эндогликозидазы PNGазы-F. Затем восстанавливающие концы высвобожденных гликанов метили посредством восстановительного аминирования флуоресцентной меткой (2-аминобензамид, 2-AB), и меченые гликаны разделяли посредством высокоэффективной анионообменной хроматографии (HPLC) с флуоресцентным детектированием.

[158] Каждый вид гликанов в полупрепаративном профиле HPLC собирали для масс-спектрометрического анализа. Каждый пик повторно вводили в аналитическую колонку для проверки чистоты фракций (более 90% для большинства фракций). Очищенные фракции затем анализировали посредством времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией с использованием матрицы (MALDI-TOF MS) для выяснения структур гликанов на основе наблюдаемых масс.

[159] Присвоенная структура гликана для каждой фракции (см. фиг. 1) и теоретическая масса, основанная на эмпирической формуле, по сравнению с наблюдаемой массой, показаны в таблице 5. Все наблюдаемые массы находились в пределах 1000 ppm от теоретических масс, что находится в пределах экспериментальной точности. Точные структуры второстепенных видов (пики 1, 15, 16, 17 и 18) не были идентифицированы из-за их низкой распространенности и недостаточных ионизационных свойств в условиях анализа.

Таблица 5. Массы для предлагаемых структур гликанов

Пик ^a	Наблюдаемая масса ^b (Да)	Теоретическая масса ^c (Да)	Название и эмпирическая формула	Относительный % общего числа гликанов
2	1379,1	1378,3	A1F-G0 $C_{55}O_{35}N_5H_{87}$	2,3%
3	1581,6	1581,5	A2F-G0 $C_{63}O_{40}N_6H_{100}$	58,6%
4	1233,3	1232,2	A1-G0 $C_{49}O_{31}N_5H_{77}$	2,4%
5	1743,3	1743,6	A2F-G1 $C_{69}O_{45}N_6H_{110}$	17,8%
6a	1436,0	1435,3	A2-G0 $C_{57}O_{36}N_6H_{90}$	5,1%
6b	1395,0	1394,3	A1-G1 $C_{55}O_{36}N_5H_{87}$	(Сумма пиков 6a и 6b)
7	1904,9	1905,8	A2F-G2 $C_{75}O_{50}N_6H_{120}$	1,8%

8	1354,1	1353,2	Man 5 $C_{53}O_{36}N_4H_{84}$	8,4%
9a	1597,7	1597,5	A2-G1 $C_{63}O_{41}N_6H_{100}$	1,2% (Сумма пиков 9a - 9c)
9b	1556,8	1556,4	Man 5-GlcNAc $C_{61}O_{41}N_5H_{97}$	
9c	1822,2	1823,7	Man 7-Fuc $C_{65}O_{46}N_4H_{104}$	
10	1515,8	1515,4	Man 6 $C_{59}O_{41}N_4H_{94}$	
11	1556,7	1556,4	Man 5-GlcNAc $C_{61}O_{41}N_5H_{97}$	1,6% (Сумма пиков 10-14)
12	1719,3	1718,6	Man 6-GlcNAc $C_{67}O_{46}N_5H_{107}$	
13	1677,4	1677,5	Man 7 $C_{65}O_{46}N_4H_{104}$	
14	1839,4	1839,7	Man 8 $C_{71}O_{51}N_4H_{114}$	

^a Пики 1, 15, 16, 17 и 18 не были идентифицированы с помощью масс-спектрометрического анализа.

^b Наблюдаемая масса предполагает исключение аддукта Na^+ (22,99 Да) из наблюдаемых массы/заряда.

^c Теоретическая масса основана на эмпирической формуле и включает гликан и метку 2-AB (масса нетто 118,14 Да).

[160] Основными видами, присутствующими в профиле N-гликанов, были биантенарные структуры с различными степенями терминального галактозилирования (~85%), как и ожидалось для антител, полученных из СНО. Следующими по распространенности видами были виды с высоким содержанием маннозы (~10%), причем большую часть этой подгруппы составляла манноза 5 (8,1%). Моноантенарные структуры также обнаруживались в профиле N-гликана (пики 2 и 4, 3,7%). Соотношение фукозилированных и нефукозилированных биантенарных форм составляло приблизительно 9:1.

[161] Структуры преобладающих N-связанных олигосахаридов (пики 2-9 в таблице 5) дополнительно подтверждались ферментативным высвобождением с применением экзогликозидаз; α -(2-3, 6, 8, 9)сиалидазы, β -(1-4)-галактозидазы, β -(1-2, 3, 4, 6)-глюкозаминидазы и α -(1-2, 3, 4, 6)-фукозидазы.

[162] Профили гликанов в контрольном образце и образце обрабатывали α -(2-3, 6,

8, 9)-сиалидазой для расщепления сиаловой кислоты. Ни один из восьми преобладающих видов не подвергся обработке сиалидазой, что свидетельствует о том, что указанные преобладающие виды не являются сиалированными гликанами. Также анализировали профиль расщепления посредством комбинации α -сиалидазы и β -(1-4) галактозидазы, которые специфически расщепляют β -(1-4)-концевые остатки галактозы. Три пика (A2F-G1, A2F-G2, A2-G1), перечисленные в таблице 5, имели предполагаемые структуры, содержащие концевой(ые) остаток(ки) галактозы. После обработки β -(1-4) галактозидазой такие пики отсутствовали, подтверждая присутствие концевых β -(1-4)-связанных остатков галактозы в этих 3 пиках.

[163] Профиль расщепления β -(1-2, 3, 4, 6)-глюкозаминидазой, ферментом, специфичным для расщепления концевых остатков GlcNAc, в дополнение к комбинации α -сиалидазы и β -галактозидазы, описанной ранее, также проанализировали. После последовательного расщепления сиалидазой и галактозидазой наблюдали четыре доминирующих вида гликанов, перечисленных в таблице 5, с предполагаемыми структурами, содержащими концевой GlcNAc: A1F-G0, A2G-G0, A1-G0 и A2-G0. После обработки β -(1-2, 3, 4, 6)-глюкозаминидазой эти пики отсутствовали, подтверждая присутствие концевого GlcNAc в указанных четырех пиках.

[164] После расщепления смесью α -сиалидазы, β -галактозидазы и β -глюкозаминидазы в профиле оставалось 3 пика. Пик элюирования через 10 минут собирали и анализировали посредством MALDI-TOF MS. Наблюдаемая масса составляла 1198,7 Да, что согласуется с ожидаемой массой 2-AB меченой фукозилированной маннозы 3 (1198,1 Да), фукозилированной структуры маннозы-3, полученной в результате удаления галактозы и N-ацетилгалактозамина из фукозилированных биантенарных структур посредством ферментативной обработки, как описано выше.

[165] Профиль расщепления α -(1-2, 3, 4, 6)-фукозидазой, ферментом, специфичным для расщепления остатков фукозы, связанных с триманнозидовым ядром, в дополнение к смеси α -сиалидазы, β -галактозидазы и β -глюкозаминидазы, описанной ранее, также подвергали анализу. После расщепления α -(1-2, 3, 4, 6)-фукозидазой пик, элюируемый через 10 минут, больше не присутствовал в профиле, и наблюдалось значительное увеличение интенсивности пика, элюируемого через 16 минут. Этот результат подтвердил, что пик, элюируемый через 10 минут, представлял фукозилированную маннозу 3, и пик, элюируемый через 16 минут, представлял нефукозилированную маннозу 3.

[166] В дополнение к обработке экзогликозидазой, описанной выше, гликановый пул подвергали расщеплению α -(1-3, 4, 6)-галактозидазой для идентификации любых потенциально иммуногенных концевых остатков α -(1-3)-галактозы в гликановом фрагменте деносуаба. После расщепления α -галактозидазой гликановый профиль НРАЕС деносуаба сравнивали с контрольным образцом. Чтобы учесть любые незначительные изменения в профиле, выполняли трехкратные инъекции контрольного и расщепленного образца. Наложение хроматограмм трехкратных инъекций не показало

изменений в профиле гликанов, что указывает на отсутствие обнаруживаемых количеств концевых остатков α -(1-3)-галактозы.

[167] На основании исследований обработки экзогликозидазой, описанных выше, была подтверждена идентификация 8 преобладающих N-связанных олигосахаридов посредством HPAEC/MALDI-TOF MS (таблица 5).

[168] Для характеристики первичной структуры деносумаба были проведены комплексные масс-спектрометрические исследования последовательности. Результаты подтвердили отсутствие доказательств какого-либо O-связанного гликозилирования в деносумабе.

3.3 Гликирование

[169] Неферментативное гликирование наблюдали в тяжелой цепи, смежной с варибельной областью в Lys-98. Модификации были специфическими для тяжелой цепи. Гликирование способствует гетерогенности заряда, поскольку вызывает потерю положительного заряда (Lys), что приводит к образованию кислотного варианта и увеличению массы на 162 Да.

[170] Гетерогенность заряда деносумаба оценивали посредством CE-HPLC. Профиль деносумаба CE-HPLC содержал 4 отдельных пика: Пик 1 примеси, расположенный перед главным пиком (PP-1), главный пик (MP), основной пик 1 (B-1) и основной пик 2 (B-2) (фиг. 2A). Очищенные пики были охарактеризованы с помощью различных аналитических методик, в том числе методик, основанных на ортогональном заряде, и методик первичной структуры для выяснения природы и расположения модификаций заряда. PP-1 содержал гликированную тяжелую цепь в Lys-98. Очищенный PP-1 анализировали посредством картирования пептидов Lys-C. Массу пептида, соответствующую модификации гликирования в Lys-98, наблюдали в пике элюирования при времени удерживания 87 минут.

[171] Для дальнейшего подтверждения идентичности пика как модификации гликирования подготавливали образец с принудительным гликированием и подвергали картированию пептида Lys-C. Принудительное гликирование осуществляли путем смешивания деносумаба с забуференным раствором глюкозы и инкубации в течение ночи при 37°C. Также параллельно готовили контрольный образец, в котором глюкоза не включалась в препарат. Повышенный уровень пептида, элюируемого через 87 минут, обнаруживали в очищенном образце PP-1, а также в образце с принудительным гликированием, что дополнительно подтверждает присутствие гликированного варианта в очищенном образце PP-1.

[172] Предполагаемый пик гликированного пептида и пик нативного пептида были охарактеризованы с помощью MS-анализа с электрораспылением *in-situ* во время элюирования пептидной карты. Измеренная моноизотопная масса пептида, элюируемого через 88 минут, составила 5572,48 Да, по данным увеличения иона 3+. Измеренная моноизотопная масса иона 3+ гликированного пептида, элюируемого на 87,02 минуте, составляла 5734,54 Да (5572,48+162,06 Да), что соответствует ожидаемому добавлению

+162 массы для гликирования. Размерный профиль PP-1 исследовали посредством SE-HPLC и rCE-SDS. Посредством SE-HPLC было определено, что PP-1 содержит нативный мономер. По снижению CE-SDS выявили присутствие видов с молекулярной массой, немного большей, чем у тяжелой цепи в области после тяжелой цепи.

[173] Деносумаб, полученный с помощью способа CP2, характеризуется приблизительно 10% гликирования (анализ по дегликозилированной интактной массе), модификацией, предположительно из-за глюкозы, присутствующей в культуральной жидкости для продуцирования.

[174] Чтобы исследовать биологическое влияние вариантов заряда в PP-1, эту фракцию анализировали на эффективность с применением анализов связывания рецептор-лиганд HTRF, репортерного гена и активности TRAP (таблица 6). В анализ был включен образец с принудительным гликированием. И PP-1, и вынужденно гликированное лекарственное вещество проявляли полную активность.

Таблица 6. Результаты анализа активности PP-1 и образца с принудительным гликированием

Пик	HTRF		Репортерный ген		TRAP	
	%	%	%	%	%	%
	относительной активности	CV	относительной активности	CV	относительной активности	CV
PP-1	*93	7	98	12	97	2
Принудительно гликированный	*94	4	91	6	99	4

Примечание: 3 определения для HTRF, 5 определений для других анализов

ПРИМЕР 3. СРАВНЕНИЕ N-ГЛИКАНОВЫХ ПРОФИЛЕЙ ДЕНОСУМАБА, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ СПОСОБОВ CP2 И CP3

[175] Гликаны удаляли посредством обработки N-гликаназой с последующим мечением флуоресцентным соединением 2-аминобензамидом. Виды гликанов разделяли с применением анионообменной хроматографии с высоким pH и количественно определяли посредством флуоресцентного детектирования (возбуждение $\lambda=330$ нм и излучение $\lambda=420$ нм). Затем количественно определяли пики гликанов. Наложения профиля N-гликана для всех тестовых образцов, а также эталонного стандарта представлены на фиг. 3А. Относительные распределения N-гликанов в деносумабе из партий CP3 и CP2 показаны на фиг. 3В.

[176] Как показано в профилях карт гликанов на фиг. 3А, партии CP3 и CP2 содержали восемь названных видов гликанов и две названные группы. Таким образом, общие профили карты гликанов показывают сходные паттерны гликанов, присутствующих как в партиях CP3, так и в CP2. В профиле партий CP3 новых гликоформ не наблюдалось. Однако были различия в распределении гликанов между партиями CP3 и CP2. В частности, партии CP3 были более галактозилированы с соответствующим

увеличением степени сиалилирования. Кроме того, партии CP3 содержали меньше Man-5 и моноантенарных структур (фиг. 3B). В таблице 7 приведены ретроспективные данные карты гликанов.

[177] Следует обратить внимание на то, что "предпочтительные" диапазоны, представленные в таблице 7 (последняя колонка) для CP2 и CP3, считаются клиническими диапазонами (которые обычно основаны на воздействии на пациента во время клинических испытаний). Клинические диапазоны обычно шире и менее строгие, чем коммерческие диапазоны (которые получены из коммерческих партий). Кроме того, эти предпочтительные диапазоны не следует рассматривать как определяющие критерии для оценки биоподобия. Для обеспечения биоподобия могут потребоваться отличающиеся или более узкие диапазоны различных содержаний гликанов.

Таблица 7. Ретроспективные данные карты гликанов

Параметр	Исходные партии	CP2 -1	CP2 -2	CP3	Предпочтительные
A2F-G0	48,9-51,2	54,9-64,7	56,6-58,6	40,7-42,6	48-70%
A2F-G1	27,8-29,5	14,5-19,2	18,8-20,6	35,6-35,8	13-26%
A2-G0	5,0-6,7	5,0-5,8	4,5-5,8	6,8-7,1	
A2F-G2	4,2-4,5	1,2-2,0	1,6-2,2	7,1-7,5	
С высоким содержанием маннозы (Man 5)	2,4-4,0	6,6-10,6	8,0-9,3	0,7	2-14%
A2-G1	2,0-2,2	0,7-0,9	0,9-1,4	3,6-4,0	
% сиалилирования	1,3-1,8	0,9-1,4	0,9-1,3	2,0-2,1	

[178] В деносумабе, полученном с использованием способа CP3, не было обнаружено новых углеводных видов по сравнению со способом CP2, но распределение видов немного отличалось. Исследования, проведенные с использованием деносумаба, показали, что различия в гликозилировании не влияют на связывание деносумаба с лигандом RANK. Дегликозилированный деносумаб также обладает полной эффективностью во всех 3 биологических анализах.

ПРИМЕР 4. ИССЛЕДОВАНИЯ РК/PD ДЕНОСУМАБА, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ СПОСОБА CP3

4.1 Схема исследования

[179] Проводили открытое рандомизированное исследование с однократной дозой в параллельных группах на здоровых добровольцах. Субъекты были рандомизированы (соотношение распределения 1:1) для получения либо однократной подкожной дозы 60 мг деносумаба, полученного с применением способа CP3 (лечение А), либо однократной подкожной дозы 60 мг деносумаба, полученного с применением способа CP2 (лечение В). Образцы крови собирали для анализа РК и PD в определенные моменты времени от

периода перед введением деносумаба до конца исследования. Субъекты завершили исследование на 113 день после выполнения всех процедур исследования.

[180] Всего в исследовании приняли участие 115 человек. Всего 112 субъектов (97%) завершили исследование. Трое субъектов (3%) не завершили исследование. 57 субъектов получали деносумаб, полученный с помощью CP3 (55 завершили исследование), и 58 субъектов получали деносумаб, полученный с помощью CP2 (57 завершили исследование).

[181] Концентрации деносумаба в сыворотке крови измеряли с применением утвержденного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Нижний предел количественного определения (LLOQ) анализа составлял 20 нг/мл. Вкратце, рекомбинантный активатор человеческого рецептора лиганда NF-κB (RANKL) наносили на полистирольные 96-луночные планшеты и использовали в качестве реагента для захвата. Стандартные образцы (STD) и контроли качества (QC) готовили путем добавления деносумаба в 100% сыворотку крови человека. Стандартные образцы, контроли качества, исследуемые образцы и холостой образец загружали в лунки после предварительной обработки 1:10 аналитическим разбавителем (1X PBS с 1% BSA, 1 M NaCl, 0,5% Tween 20). Деносумаб в образцах STD, QC и исследуемых образцах подвергался захвату иммобилизованным рекомбинантным RANKL человека. После стадии отмывки добавляли биотинилированное кроличье антитело для обнаружения деносумаба. После еще одной стадии отмывки для связывания с комплексом добавляли стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. После последней стадии отмывки в планшет добавляли субстрат тетраметилбензидин (TMB), субстрат пероксидазы. Проявление цвета останавливали, и интенсивность цвета (оптическая плотность, OD) измеряли при 450 нм по отношению к 650 нм. Преобразование единиц OD для образцов контролей качества и исследуемых образцов в концентрацию было достигнуто посредством сравнения со стандартной кривой в том же прогоне, опосредованного компьютерным программным обеспечением, которое подвергали регрессии в соответствии с логистической регрессионной моделью с автооценкой с весовым коэффициентом 1/Y с использованием пакета обработки данных Watson LIMS версии 7.0.0.01.

[182] Концентрации сывороточного C-телопептида (CTX1) измеряли посредством утвержденного Serum CrossLaps® ELISA. LLOQ составлял 0,049 нг/мл. Вкратце, Serum CrossLap® ELISA основан на 2 высокоспецифичных моноклональных антителах против аминокислотной последовательности ЕКАНД-β-GGR, где остаток аспарагиновой кислоты (D) β-изомеризован. Для получения конкретного сигнала в Serum CrossLaps® ELISA, 2 цепи ЕКАНД-β-GGR должны быть перекрестно сшиты. Стандартные образцы (STD), образцы контроля качества (QC), контрольные образцы (SC), холостые и исследуемые образцы добавляли в микротитрационный планшет, покрытый стрептавидином, с последующим добавлением смеси биотинилированного антитела и антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP). CTX1, присутствующий в STD, QC, SC

или образце, может образовывать комплекс с биотинилированным антителом и антителом, конъюгированным с HRP. Этот комплекс связывается с микротитрационным планшетом, покрытым стрептавидином, с помощью биотинилированного антитела. После инкубации при комнатной температуре планшет промывали. В планшет добавляли раствор тетраметилбензидина (ТМБ). Проявление цвета останавливали, и интенсивность цвета (оптическая плотность, OD) измеряли при 450 нм с 650 нм в качестве эталона. Преобразование единиц оптической плотности в значения концентрации было достигнуто посредством сравнения, опосредованного компьютерным программным обеспечением, со стандартной кривой, проанализированной на том же планшете, и подвергнутой регрессии в соответствии с 4-параметрической логистической (автоматическая оценка) регрессионной моделью с весовым коэффициентом $1/Y^2$ с использованием пакета обработки данных Watson версии 7.0.0.01.

4.2 Фармакокинетические анализы

[183] Данные зависимости концентрации деносумаба в сыворотке крови от времени анализировали некомпартментными способами с использованием WinNonlin Enterprise v 5.1.1 в составе PKC v3.1a, build 200610240912 (Pharsight Corporation, Маунтин-Вью, Калифорния, США). Фигуры были созданы с помощью SigmaPlot v10 build 10.0.1.2 (SPSS Science, Чикаго, Иллинойс). В анализе использовали номинальные значения времени отбора образцов, если отклонение фактического значения времени не было равно 10% или больше, и в этом случае использовали фактическое значение времени. Значения концентрации деносумаба в сыворотке крови ниже нижнего предела количественного определения (LLOQ) 20 нг/мл устанавливали как равные нулю в некомпартментном анализе и для расчета сводной статистики. Суммарную статистику рассчитывали с применением неокругленных значений.

[184] Максимальную наблюдаемую концентрацию деносумаба в сыворотке крови (C_{max}) после дозирования определяли путем анализа данных. Соответствующее время C_{max} (t_{max}) также регистрировали. Площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до 16 недель (AUC_{0-16 недель}) рассчитывали с помощью линейно-логарифмического способа трапеций, который применяет линейное правило трапеций до C_{max} , и затем логарифмическое правило трапеций для оставшейся части кривой.

[185] Профили зависимости средней концентрации деносумаба в сыворотке крови от времени для деносумаба, полученного с помощью CP3 и CP2, показаны в линейной шкале и полулогарифмической шкале на фиг. 4А-4В соответственно. Оценка профилей по линейной шкале (фиг. 4А) показывает, что отбор образцов до 16 недель (112 дней) захватил большую часть воздействия для обоих видов лечения. Представлены результаты в отношении деносумаба, полученного с помощью способа CP3. По сравнению с деносумабом, полученным с помощью способа CP2, деносумаб, полученный с помощью способа CP3, имел больше gal-видов, меньше видов с высоким содержанием маннозы.

[186] Как показано на фиг. 4А и 4В, деносумаб, полученный с помощью способа CP3, демонстрировал более длительный период полувыведения из сыворотки крови у

пациентов (в среднем на 10% более длительный период полувыведения), что свидетельствует о более медленной скорости клиренса. Средний период полувыведения деносуаба, полученного с помощью CP2, составляет приблизительно 25,8 (6,5) дней (медиана=25,0); и средний период полувыведения деносуаба, полученного с помощью CP3, составляет приблизительно 28,3 (6,5) дня (медиана=27,4). Среднее геометрическое значение AUC_{0-16} недель и C_{max} для CP3 было больше значений для CP2 приблизительно на 16% и 14%, соответственно (таблицы 8.1 и 8.2).

[187] Как показано на фиг. 4D и 4E, увеличенный период полувыведения деносуаба, полученного с помощью CP3, был обусловлен более быстрым клиренсом видов Man-5. Молекулы деносуаба, содержащие Man-5, предпочтительно подвергались выведению, что приводило к общему снижению уровня Man-5 с течением времени. Напротив, уровень gal-видов оставался в основном постоянным в течение того же периода времени. Это демонстрирует, что молекулы деносуаба с Man-5 преимущественно выводятся из сыворотки крови по сравнению с деносуабом без Man-5, что приводит к общему снижению уровня Man-5. В начале исследования приблизительно 8% молекул деносуаба содержали Man-5; примерно с 60-го дня менее 4% молекул деносуаба содержали Man-5.

Таблица 8.1. Обобщенные данные PK/PD для деносуаба, полученного с помощью CP3

	Параметр	PE (90% CI)*
PK	C_{max}	1,137 (1,016-1,273)
	AUC_{0-112} дни	1,162 (1,032-1,308)
PD	I_{max}	1,014 (0,990-1,039)
	$AUEC_{0-112}$ дни	1,027 (0,985-1,070)

*Точечная оценка (доверительный интервал 90%) для соотношения CP3/CP2

Таблица 8.2. Средние значения (SD) оценки фармакокинетических параметров деносуаба в сыворотке крови после подкожного введения 60 мг деносуаба, полученного с помощью способов CP3 или CP2, здоровым добровольцам

	Среднее арифметическое (SD) ^a	Среднее геометрическое ^a	

Параметр	CP2 (N=58 ^c)	CP3 (N=56 ^c)	CP2 (N=58 ^c)	CP3 (N=56 ^c)	PE ^b (90%CI)
AUC ₀₋₁₆ недель (мкг*день/мл)	330 (120)	380 (130)	308	358	1,16 (1,03, 1,31)
C _{max} (мкг/мл)	6,81 (2,43)	7,70 (2,54)	6,39	7,26	1,14 (1,02, 1,27)
t _{max} (день)	10 (2,3-28)	10 (1,0-21)	--	--	--

AUC₀₋₁₆ недель=площадь под кривой зависимости концентрации деносуаба в сыворотке крови от времени от 0 до 16 недель

C_{max}=максимальная наблюдаемая концентрация

t_{max}=время, при котором C_{max} наблюдается и представляется как медиана (диапазон)

^a Средние значения округлены до 3 значащих цифр (2 для t_{max}), SD сообщается с той же точностью как его

соответствующее среднее; все расчеты проводились с использованием неокругленных значений

^b Точечная оценка (PE) и 90% доверительный интервал (CI) предназначены для соотношения (CP3/CP2) для преобразованного логарифма

AUC₀₋₁₆ недель и C_{max}

^c N=56 и 55 для значений AUC₀₋₁₆ недель CP2 и CP3 соответственно

4.3 Фармакодинамические анализы

[188] Исходную концентрацию СТХ1 в сыворотке крови рассчитывали как среднее значение концентраций, определенных в 3 образцах, полученных до введения деносуаба. Процентное изменение от исходного уровня рассчитывали как измеренное значение после введения дозы минус измеренное значение исходного уровня, деленное на измеренное значение исходного уровня, умноженное на 100%. Концентрациям СТХ1 после исходного уровня ниже LLOQ в аналитическом способе присваивали значение LLOQ (0,049 нг/мл) для расчета процентного изменения от исходного уровня. Все расчеты проводились с использованием неокругленных значений. В анализе использовали номинальные значения времени отбора образцов, если отклонение фактического значения времени не было равно 10% или больше, и в этом случае использовали фактическое значение времени. Фигуры были созданы с помощью SigmaPlot v10 build 10.0.1.2 (SPSS Science, Чикаго, Иллинойс).

[189] % ингибирования СТХ1 после дозирования рассчитывали как % изменения исходного уровня, умноженного на -1. Индивидуальный % ингибирования СТХ1 в зависимости от времени анализировали некомпартментными способами с использованием WinNonlin Enterprise v 5.1.1 (Pharsight Corporation, Маунтин-Вью, Калифорния, США). Регистрировали максимальный наблюдаемый % ингибирования СТХ1 (I_{max}) и время его появления (t_{max}, СТХ1). Площадь под кривой эффекта (% ингибирования СТХ1 в

зависимости от времени) от нулевого времени до шестнадцати недель (AUEC_{0-16 недель}) рассчитывали с помощью линейно-логарифмического способа трапеций, который применяет линейное правило трапеций до I_{max}, и затем логарифмическое правило трапеций для оставшейся части кривой.

[190] На исходном уровне среднее значение (\pm SD) концентрации СТХ1 в сыворотке крови составляло 0,555 (\pm 0,288) нг/мл для группы СР3 и 0,488 (\pm 0,251) нг/мл для группы СР2. Профили среднего (\pm стандартное отклонение) процентного изменения СТХ1 от исходного уровня в зависимости от времени для 2 обработок представлены на фиг. 4С. Среднее процентное изменение профилей СТХ1 от исходного уровня для 2 обработок было по сути совместимым. Среднее геометрическое значение AUEC_{0-16 недель} и I_{max} различались на \leq 3% между обработками (таблицы 8.1 и 8.3). 90% доверительный интервал для соотношения геометрических средних для AUEC_{0-16 weeks} и I_{max} находился в диапазоне от 0,80 до 1,25. Хотя медиана t_{max}, значения СТХ1 различались между СР3 и СР2 (25 дней по сравнению с 12), из среднего процентного изменения СТХ1 по сравнению с исходными профилями (фиг. 10-3) очевидно, что общая степень ингибирования была относительно постоянной с 7 по 112 дни для двух видов обработки.

Таблица 8.3. Средние (SD) значения оценки параметра С-телопептида в сыворотке крови после подкожного введения 60 мг деносумаба, полученного с помощью СР3 или СР2, здоровым добровольцам

Параметр	Среднее арифметическое (SD) ^a		Среднее геометрическое ^a		PE ^b (90%CI)
	СР2 (N=58 ^c)	СР3 (N=56 ^c)	СР2 (N=58 ^c)	СР3 (N=56 ^c)	
AUEC _{0-16 недель} (день*% ингибирования)	9120 (1210)	9290 (810)	9010	9250	1,03 (0,98, 1,07)
I _{max} (% ингибирования)	85,9 (7,1)	86,9 (5,5)	85,5	86,7	1,01 (0,99, 1,04)
t _{max} , СТХ1 (день)	12 (2,0-110)	25 (1,0-110)	--	--	--

AUEC_{0-16 недель}=площадь под кривой эффекта от времени 0 до 16 недель

I_{max}=максимальный наблюдаемый % ингибирования

t_{max}, СТХ1=время, в которое наблюдалось I_{max}, выраженное как медиана (диапазон)

^a Средние значения округлены до 3 значащих цифр (2 для t_{max}), SD сообщается с той же точностью как его

соответствующее среднее; все расчеты проводились с использованием

неокругленных значений

^b Точечная оценка (PE) и 90% доверительный интервал (CI) предназначены для соотношения (CP3/CP2) для преобразованного логарифма

AUEC0-16 недель и I_{max}

^c N=56 и 55 для значений AUEC0-16 недель CP2 и CP3 соответственно.

ПРИМЕР 5. СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ CP2 И CP4

[191] Блок-схема способов, отображающая сравнение операций культивирования и сбора клеток для способа CP2 и способа CP4, представлена в таблице 9. Способы размножения и образования культуры клеток CP4 проводили на основе родительской клеточной линии CS-9 CHO (25B12). В способе CP4 использовали производственные биореакторы меньшего размера, работающие в режиме перфузии, и использовали исключительно сосуды однократного использования (одноразовые) для размножения и образования культур клеток. Способы продуцирования CP2 и CP4 контролировали в соответствии с заданными значениями, оптимизированными для каждой клеточной линии. Составы сред и время подачи питательных веществ были разработаны для оптимального здорового состояния клеток и продуцирования. В биореакторе для образования продукта CP4 использовали химически определенные составы сред и выполняли амплификацию при участии метотрексата (MTX). Для обоих способов размораживание и начальное размножение клеточной массы проводили во встряхиваемых колбах. В обоих процессах использовали среду Игла с модификацией по Дульбекко (DMEM)/среду на основе F12; однако составы были разными и были оптимизированы для разных клеточных линий.

Таблица 9. Культура клеток и сбор клеток для способов получения деносумаба CP2 и CP4

Стадии способа	Способ CP2 (16000 л)	Способ CP4 (2000 л)	Отличия
Размораживание клеток	Размороженный флакон WCV Линия клеток CHO	Размороженный флакон WCV Линия клеток CHO	Линии клеток: CP2: Родительская AM-1/D (без амплификации MTX) CP4: Родительская CS-9 (MTX)
	↓	↓	
Размножение культуры	Встряхиваемые колбы 12-13 дней	Встряхиваемые колбы 12-14 дней	Состав среды: CP4 содержит MTX
	↓	↓	

Биореакторы для размножения (N-4, N-3)	N-4: Биореактор объемом 20 л, 3 дня N-3: Биореактор объемом 100 л, 3 дня	2-Стадийная культура, 50 л Культуральный пакет биореактора Стадия 1 (N-4): 3 дня Стадия 2 (N-3): 3 дня	Стадия в CP2 при отсутствии культурального пакета Состав среды: CP4 содержит МТХ
	↓	↓	
Биореакторы для размножения (N-2, N-1)	N-2: Биореактор объемом 500 л, 3 дня N-1: Биореактор объемом 2,5 кЛ, 3-4 дня	2-Стадийные системы одноразовых пакетов, 500 л Стадия 1 (N-2): 3 дня Стадия 2 (N-1): 4 дня	Состав среды: CP4 N-1 стадия подпитки на день 2
	↓	↓	
Производственный биореактор	Биореактор объемом 16 кЛ, 14 дней Болюсные подпитки на дни 3 и 9 Режим периодической подпитки	Биореактор объемом 2 кЛ, 18 дней Болюсные подпитки на дни 3 и 6 Режим перфузии начинали в день 7 Смена перфузионной среды, день 11	Режим продуцирования Заданные значения в способе В CP4 используют химически определенные составы сред
	↓	↓	
Сбор	Отделение посредством центрифугирования в тарельчатом сепараторе	Разделение посредством флокуляции с использованием PDADMAC* и PEG* и осаждение	Способ разделения

*полидиаллилдиметиламмонийхлорид (PDADMAC) и полиэтиленгликоль (PEG)

[192] Для обоих способов стадии размножения в биореакторе выполняли в периодическом режиме, за исключением CP4 N-1, выполняемой в периодическом режиме с подпиткой. В ходе фазы размножения в биореакторе в способе CP2 использовали 4 биореактора из нержавеющей стали, тогда как в способе CP4 использовали 2 системы одноразовых пакета (SUB), каждый с 2 стадиями. Первая одноразовая система в способе размножения CP4 представляла собой 2-стадийный культуральный пакет на 50 л с

регулированием температуры, $p\text{CO}_2$ и перекрыванием расхода газа в соответствии с заданными значениями для конкретного способа. Вторая одноразовая система в способе размножения CP4 представляла собой 2-стадийную SUB на 500 л с подпиткой из питательных веществ на второй день 2 стадии (N-1). Во время работы всех биореакторов для размножения (стадии SUB CP2 и CP4) pH, температуру, давление, перемешивание и количество растворенного кислорода контролировали до заданных значений для конкретного способа.

[193] Производственные биореакторы работали в разных режимах. В способе CP2 использовали биореактор из нержавеющей стали, с периодическим режимом с подпиткой, объемом 16 кл с подпиткой на 3 и 9 дни, и культуру собрали на 14 день. В способе CP4 использовали 2 кл SUB с 2 болюсными подпитками на 3 и 6 дни, перфузию начинали на 7 день со сменой среды на 11 день, и культуру собрали на 18 день. Посредством смены среды на 11 день снижали концентрацию глюкозы и добавляли галактозу в качестве альтернативного источника углеводов. Это изменение было сделано таким образом, что профиль гликанов с высоким содержанием маннозы в способе CP4 будет сравним с профилем гликанов с высоким содержанием маннозы в способе CP2, поскольку профиль гликанов с высоким содержанием маннозы на моноклональных антителах может иметь потенциал для воздействия на клиренс *in vivo*. В методике перфузионного разделения использовали мембрану с номинальным размером пор 30 кДа, так что все компоненты, приблизительно превышающие этот размер, удерживались в биореакторе, включая клетки и продукт. Все заданные значения были оптимизированы для каждой клеточной линии и режима продуцирования.

[194] Среда для продуцирования и подпитки CP2 основывалась на модифицированной среде DMEM/F12 и содержала гидролизат сои. Среда для продуцирования, подпитки и перфузии CP4 характеризовалась химически определенным составом и не содержала гидролизатов.

Пример 6. Сравнение способов сбора и очистки CP2 и CP4

[195] В обоих способах после завершения фазы продуцирования содержимое биореактора охлаждали до заданных температур $10 \pm 3^\circ\text{C}$ в CP2 и $\leq 12^\circ\text{C}$ в CP4. В способе CP2 центрифугирование в тарельчатом сепараторе завершало первичное отделение продуцирующих клеток и клеточного дебриса от среды для культивирования. В способе CP4 первичное разделение осуществляли с использованием флокуляции с полидиаллилдиметиламмонийхлоридом (PDADMAC) и полиэтиленгликолем (PEG) с последующим осаждением. В обоих способах за первичным разделением следовали глубинная и мембранная фильтрации. Кроме того, в способе CP4 во время обработки сбора использовали барботирование воздуха или кислорода.

[196] Блок-схема способов, отображающая сравнение операций очистки для способа CP2 и способа CP4, представлена в таблице 10.

Таблица 10. Очистка в способах получения деносуаба CP2 и CP4

Стадии способа	Способ СР2 (16000 л)	Способ СР4 (2000 л)
Колонка 1 Аффинная хроматография с белком А	Отбор МАb	Отбор МАb SuRe
Вирусная инактивация	Выдерживание при низком рН рН 3,31-3,60 60-120 минут Нейтрализация и глубинная фильтрация	Выдерживание при низком рН рН 3,5 ± 0,1 60-90 минут Нейтрализация
Колонка 2 Катионообменная хроматография	Fractogel EMD SO ₃ ⁻ (M)	Fractogel COO ⁻ (M)
Вирусная фильтрация в СР2	Вирусная фильтрация при 200 нм	↓
Колонка 3 Хроматография гидрофобных взаимодействий	Phenyl Sepharose Fast Flow с высокой степенью замещения	Phenyl Sepharose Fast Flow с высокой степенью замещения
Вирусная фильтрация в СР4	↓	Вирусная фильтрация при 200 нм
Состав DS	UF/DF до 70 мг/мл (Регенерированная целлюлоза 30 кДа) Фильтрация при 0,2 мкм в 10- литровые поликарбонатные контейнеры, хранящиеся при - 30°С	UF/DF до 70 мг/мл (Регенерированная целлюлоза 30 кДа) Фильтрация при 0,2 мкм в 12- литровую систему пакета для хранения

[197] В обоих способах очистки использовали одни и те же отдельные операции: 2 специальных операции по удалению/инактивации вирусов (инактивация вирусов при низком рН и вирусная фильтрация при 200 нм), 3 операции хроматографии (аффинная

хроматография с белком А, катионообменная хроматография и хроматография гидрофобных взаимодействий) и операция ультрафильтрации (UF)/диафильтрации (DF) для концентрирования и замены буфера деносуаба в окончательном составе DS. Рабочие параметры для каждой отдельной операции и порядок этих отдельных операций были оптимизированы для каждого способа. Дополнительные различия включали изменения в смолах для хроматографии, буферах, типах фильтров и в областях и порядке операций. Эти различия были связаны с изменением клеточной линии и более высокими концентрациями клеток, которые являются результатом использования режима перфузии в производственном биореакторе в способе CP4.

[198] Первая отдельная операция представляла собой стадию аффинной хроматографии с белком А, выполняемую для собранного фильтрата в колонке 1. Использование колонки 1 представлял собой стадию первичной очистки с применением специфического высокоаффинного взаимодействия между иммобилизованным белком А и Fc-областью антител типа IgG для захвата деносуаба. В способе CP4 использовали смолу MabSelect SuRe, и в способе CP2 использовали смолу MabSelect. Вторая отдельная операция в обоих способах представляла собой стадию инактивации вирусов при низком pH, которая была первой из 2 специальных операций по инактивации и осветлению вирусов. Инактивации вирусов достигали для способа CP4 при pH $3,5 \pm 0,1$ в течение 60-90 минут и для способа CP2 при pH 3,31-3,60 в течение 60-120 минут с разницей из-за изменения в линии клеток-хозяев и способе.

[199] В конце периода инкубации при низком pH в способе CP4 pH пула вирусной инактивации доводили до 5,0 с помощью основания Tris, и затем пул фильтровали через мембранный фильтр из полиэфирсульфона (PES) 0,2 мкм. Для способа CP2 pH пула доводили до 3,31-3,60 с помощью натрий-1-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) и трис-основания, и затем пул осветляли с помощью двухстадийной системы фильтрации. Разница в pH была вызвана различиями в работе колонки 2.

[200] Третьей отдельной операцией в обоих способах была стадия катионообменной хроматографии (CEX) в колонке 2. На этой стадии с применением смолы CEX из потока продукта удалялись примеси, присутствующие в отфильтрованном пуле для инактивации вирусов. В способе CP4 использовали смолу Fractogel COO⁻ (M), и в способе CP2 использовали смолу Fractogel SO₃⁻ (M).

[201] Следующие 2 отдельные операции для обоих способов включали стадии вирусной фильтрации и хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC); однако последовательность была обратной.

[202] Следующая отдельная операция для обоих способов представляла собой UF/DF для замены очищенного деносуаба на буфер состава. Оба потока продукта CP4 и CP2 подвергали диафильтрации в отношении 10 mM ацетата натрия, 5% сорбита при pH 4,80 до конечной концентрации деносуаба 70 мг/мл. Не осуществляли никаких изменений в отношении контейнеров для хранения DS или условий хранения

ПРИМЕР 7. КАРТИРОВАНИЕ ГЛИКАНОВ ДЕНОСУАБА, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ

СПОСОБ СР4*7.1 Картирование N-гликанов деносуаба, полученного с помощью способа СР4*

[203] Гликозилирование оценивали путем картирования N-связанных олигосахаридных структур. Эта процедура включала высвобождение N-связанных гликанов из деносуаба посредством обработки PNGазой-F. Высвободившиеся гликаны подвергали мечению 2-аминобензойной кислотой (2-AA) с последующей жидкостной хроматографией гидрофильных взаимодействий (HILIC) с флуоресцентным детектированием. Пики элюирования контролировали детектором флуоресценции. Характеристику пиков N-гликановой карты деносуаба проводили путем картирования олигосахаридов посредством масс-спектрометрии. Присвоенная структура гликана для каждого гликана и теоретическая масса, основанная на эмпирической формуле, по сравнению с наблюдаемой массой, показаны в таблицах 2 и 5. Все наблюдаемые массы находились в пределах ожидаемой экспериментальной точности.

Таблица 11. Композиция основных N-связанных гликанов

Название олигосахарида	Упрощенное название	
	олигосахарида	% ^a
Асиало-, агалакто-, моноантенарный, с фукозным замещением в остове	A1G0F	3,2
Асиало-, агалакто-, биантенарный, с фукозным замещением в остове	A2G0F	60,8
Асиало-, агалакто-, моноантенарный	A1G0	1,4
Асиало-, моногалактозилированный биантенарный, с фукозным замещением в остове	A2G1F	13,1
Асиало-, агалакто-, биантенарный	A2G0	6,3
Асиало-, бигалактозилированный биантенарный, с фукозным замещением в остове	A2G2F	0,9
Манноза-5	M5	7,8
Асиало-, моногалактозилированный биантенарный	A2G1	2,5

а. "%" относится к относительному проценту, рассчитанному в соответствии с пиками HILIC.

[204] Большинство видов представляли собой фукозилированные остовы, сложные биантенарные структуры с 0 или 1 концевой галактозой с относительно низкими уровнями афукозилированных биантенарных структур. Популяция гликанов содержала очень низкие уровни гликанов сиалилированных видов и гибридного типа, а также ~8%

гликанов с высоким содержанием маннозы (преимущественно в виде структуры маннозы 5). Процентное содержание N-связанных гликанов деносумаба определяли путем интеграции всех пиков гликанов. Примеры таких пиков показаны на фиг. 5.

[205] Известно, что N-гликозилирование Asn, не находящегося в мотиве консенсусного сайта (Asn-Xxx-Ser/Thr), происходит на низких уровнях на антителах человека. Эти виды обычно определяются как пик после тяжелой цепи посредством rCE SDS. Определение относительного процента площади этого пика после тяжелой цепи от общей площади пика тяжелой цепи дало уровень неконсенсусного гликозилирования в деносумабе, составляющий приблизительно 1,5%.

[206] Для характеристики первичной структуры деносумаба были проведены масс-спектрометрические исследования последовательности. Результаты подтвердили отсутствие доказательств какого-либо O-связанного гликозилирования в деносумабе.

7.2 Определение характеристик неферментативного гликирования

7.2.1 Определение характеристик гликирования

[207] Неферментативное гликирование представляет собой процесс, при котором восстанавливающий сахар (глюкоза или галактоза) взаимодействует с белком посредством образования основания Шиффа между альдегидной группой сахара и первичными аминами белка. В деносумабе, получаемом в способе CP2, при неферментативном гликировании, вид, обогащенный в пике, расположенном перед главным пиком CE-HPLC, расположен на одном остатке лизина (Lys-98) деносумаба.

[208] Достижения в методиках определения характеристик и инструментах масс-спектрометрии с высоким разрешением позволили дополнительно охарактеризовать неферментативное гликирование на деносумабе. Деносумаб обрабатывали борогидридом натрия с последующим восстановлением, алкилированием и расщеплением трипсином для анализа пептидной карты с обнаружением посредством масс-спектрометрии. Посредством обработки борогидридом натрия, как описано у Brady et al. (Anal. Chem., 2007, 79 (24), pp 9403-9413), достигается стабилизация связи между сахаром и белком, что позволяет идентифицировать сайты посредством MS/MS. С применением данной методики провели идентификацию множественных сайтов гликирования в деносумабе, полученном в CP4. Идентифицированные сайты неферментативного гликирования деносумаба в результате двух способов представлены в таблице 12, что указывает на присутствие тех же сайтов гликирования. Этот ожидаемый результат связан с тем фактом, что гликирование не является случайным событием, а в высокой степени зависит от доступности растворителя, а также от локализованного химического окружения белка (Gadgil et al. J Pharm Sci. 2007 Oct;96(10):2607-21.).

Таблица 12. Сайты гликирования деносумаба

Расположение гликирования	Идентифицированный триптический фрагмент	Сайты гликирования
Легкая цепь	TFGQGTrVEIK	K104

	VEIkR	K108
	VQWkVDNALQSGNSQESVTEQDSK	K150
	DSTYLSSTLTLSkADYEK	K184
	HkVYACEVTHQGLSSPVTk	K191
	DNSkNTLYLQMNSLR	K76
	AEDTAVYYCAk	K98
	VDkTVER	K218
Тяжелая цепь	CCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPk	K249
	VVSVLTVVHQDWLNGKEYk	K318
	VSNkGLPAPIEK	K327
	GLPAPIEkTISK	K335

[209] В способе CP4 во время культивирования клеток используют как глюкозу, так и галактозу, что приводит к образованию антитела, которое гликируется как глюкозными, так и галактозными сахарами. Гликирование, присутствующее в CP4, составляет приблизительно 24%, с оценкой 12%, вследствие галактозного гликирования.

[210] Глюкоза присутствует в сыворотке крови человека в количестве примерно 70-100 мг/дл (Pesce and Bodourian, 1982), что приводит к неферментативному гликированию циркулирующих белков. Галактоза естественным образом присутствует в сыворотке крови человека в количестве приблизительно 0,3 мг/дл. При таких низких уровнях галактозы в сыворотке крови маловероятно, что здоровые индивидуумы будут иметь циркулирующие белки с измеримыми уровнями гликирования галактозой, за исключением пациентов с галактоземией. Клиническая безопасность галактозного гликирования была неизвестна и поэтому оно может рассматриваться как новый молекулярный вид и может быть потенциальной проблемой безопасности. Для решения этой потенциальной проблемы безопасности было проведено исследование для оценки уровней гликирования, клинической безопасности и эффективности такой посттрансляционной модификации.

[211] Деносуаб, полученный с помощью CP4, характеризуется приблизительно 24% гликирования, в то время как CP2 характеризуется приблизительно 10% гликирования. На CP2 идентифицировано двенадцать сайтов гликирования. Те же двенадцать сайтов были обнаружены на CP4 без идентифицированных новых сайтов гликирования. Образцы CP4, CP2 и CP4, обогащенные вследствие гликирования (70%), имели эквивалентную эффективность в двух функциональных биоанализах, демонстрируя, что уровни гликирования и галактозное гликирование не влияли на функцию продукта. Кроме того, эксперименты по картированию триптических пептидов подтвердили, что сайты гликирования лекарственного вещества идентичны в способах CP2 и CP4, при этом всего было идентифицировано 12 сайтов гликирования, ни один из которых не присутствует в области CDR деносуаба.

[212] В способе CP4 использовали среды, содержащие глюкозу, в течение 1-10 дней культивирования клеток, а затем перфузионные среды с низким содержанием глюкозы и высоким содержанием галактозы на 11-18 дни. Анализ моносахаридов среды показал, что уровень глюкозы на 12 день культивирования клеток был ниже обнаруживаемых уровней. Следовательно, на галактозу, вероятно, приходилась большая часть гликирования после переключения среды. На основании этих данных был проведен теоретический расчет для оценки уровня глюкозного гликирования по сравнению с галактозным гликированием, присутствующего на деносумабе, полученном с помощью CP4. Посредством данного расчета определили, что примерно 50% случаев гликирования CP4 (24%) связано с галактозой. Это соответствует 1 из 8 антител, гликированных галактозой, и 1 из 8 антител, гликированных глюкозой.

7.2.2 Определение биологических характеристик гликирования

[213] Модификации терапевтических антител могут привести к снижению клинической эффективности или могут повлиять на безопасность пациента. Поэтому проводили тщательное определение характеристик деносумаба, полученного с помощью CP4, с особым акцентом в отношении гликирования. Анализ эффективности с помощью НТRF и анализы связывания репортерного гена использовали для оценки биологической функции деносумаба, полученного с помощью CP4, по сравнению с деносумабом, полученным с помощью CP.

[214] Во время разработки деносумаба, полученного с помощью CP2, проводили исследования принудительного гликирования для оценки гликирования и влияния на эффективность. Деносумаб, полученный с помощью CP2, подвергали принудительному гликированию до уровней, в ~68 раз превышающих уровни в исходном материале. Этот образец сохранял всю активность при анализе с помощью НТRF и анализах репортерного гена.

[215] В одном анализе очищенные виды CP4 СЕХ пика, расположенного перед главным пиком, характеризовались приблизительно 70% гликирования по сравнению с 24% во фракциях основного пика и основных фракциях. Все три очищенные фракции сохранили свою эффективность по результатам анализа НТRF и анализов репортерного гена, что указывает на то, что повышенные уровни гликирования не влияли на функцию продукта. Кроме того, относительная эффективность CP2 и CP4 была эквивалентна согласно анализам НТRF и анализам репортерного гена, что дополнительно продемонстрировало, что гликирование CP4 не влияло на эффективность продукта.

7.2.3 Гликирование и возможное влияние на функцию Fc

[216] Клиренс или период полувыведения из сыворотки крови антител IgG регулируется неонатальным рецептором Fc (FcRn). Предыдущие исследования принудительного гликирования, проведенные на антителах IgG1 и IgG2 (Goetze et al, 2012), не выявили влияния на связывание FcRn, что дает возможность предположить, что модификация гликирования имеет слабое влияние на функцию белка. Однако анализ FcRn проводили на образцах CP2 и CP4, и эти данные демонстрируют аналогичные результаты

в отношении FcRn. На основании результатов исследования принудительного гликирования и учитывая, что CP2 и CP4 имели одинаковые сайты гликирования, повышенные уровни гликирования CP4 не влияли на связывание FcRn.

7.2.4 Оценка иммуногенности галактозного гликирования

[217] Деносумаб с галактозным гликированием представляет собой новый вид, который не был представлен в предыдущих презентациях лекарственного продукта, в связи с этим была проведена оценка риска иммуногенности. Зрелый гуморальный иммунный ответ требует наличия как В-клеточного эпитопа, так и Т-клеточного эпитопа. В-клеточный эпитоп является сайтом связывания антител и как правило зависит от конформации белка. Т-клеточный эпитоп представляет собой линейную аминокислотную последовательность, которая связывается с белками главного комплекса гистосовместимости класса II на поверхности антигенпрезентирующих клеток и вызывает секрецию цитокинов Т-клетками, которые запускают созревание антител. При оценке риска иммуногенности были приняты во внимание следующие соображения.

[218] *Риск, связанный с В-клеточным эпитопом.* CP4 предусматривает новые виды, гликированные галактозой, по сравнению с CP2, где имеется только глюкозное гликозилирование. Ни один из пациентов не подвергался воздействию этих новых видов, и была некоторая неопределенность в отношении иммунного ответа. Случаи гликирования были распределены по 11 различным лизинам, и примерно 12% молекул деносумаба содержали 1 галактозу. Следовательно, концентрация любой одной молекулы с определенной аминокислотой, модифицированной галактозой, была низкой.

[219] Антитела против полностью человеческих моноклональных клеток как правило связываются с областью CDR посредством нетолерантных последовательностей. CDR в деносумабе содержат 1 лизин и 6 в соседнем каркасе, которые могут быть гликированы галактозой. Однако гликирование в CDR не было обнаружено.

[220] *Риск, связанный с Т-клеточным эпитопом.* Анализ *in silico* предсказал только 1 второстепенный Т-клеточный "агрегет". Гликирование не приводит к образованию вариантов последовательности, которые приводят к образованию Т-хелперов. Галактоза может усиливать процессинг антигена, однако повышенное поглощение молекулами, обогащенными галактозой, может быть связано с олигосахаридами более высокого порядка.

[221] В целом риск гликирования галактозой, изменяющего иммуногенность деносумаба, является минимальным.

7.3 Неконсенсусный N-гликан (NCG)

[222] Неконсенсусные N-гликаны (NCG), как описано у Valliere-Douglas et al (J Biol Chem. 2009 Nov 20; 284(47): 32493-32506), представляют присоединение олигосахарида к остатку Asn, который не является частью консенсусного фрагмента, как правило в домене CH2 антитела. Этот вид как правило обогащен в пиках, расположенных перед главным пиком CE-HPLC, и определяется с помощью rCE-SDS как пик после тяжелой цепи.

[223] Анализ фракций CE-HPLC с помощью rCE-SDS показал, что пик,

расположенный перед главным пиком CE-HPLC, был немного обогащен в пике негликозилированной тяжелой цепи (NGHC). Кроме того, данные rCE-SDS показали, что фракция пика, расположенного перед главным пиком CE-HPLC, была немного обогащена в пике после тяжелой цепи (таблица 13), что согласуется с выводами Valliere-Douglas et al (2009).

Таблица 13. Площади пиков в анализе rCE-SDS фракций CE-HPLC

Образцы	% тяжелой цепи	% легкой цепи	% NGHC	% NCG
Контроль деносумаба	65,7	31,5	0,8	1,5
Пики, расположенные перед главным пиком	64,3	31,4	1,4	2,3
Главные пики, расположенные после главных пиков	65,9	31,7	0,8	1,2
	65,3	31,8	1,1	1,3

ПРИМЕР 8. СРАВНЕНИЕ ГЛИКАНОВЫХ ПРОФИЛЕЙ ДЕНОСУМАБА, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ СПОСОБОВ CP2 И CP4

[224] Сравнивали карты олигосахаридов, полученные посредством анионообменной хроматографии с высоким pH (HP-AEX) из партий CP2 и CP4. Все партии CP4 и CP2 соответствовали критериям приемлемости сопоставимости от 4% до 11% маннозы-5 (таблица 14). Партии лекарственного вещества из CP4 имели сопоставимые уровни маннозы-5 с ретроспективными данными CP2 и находились в пределах ретроспективного минимума и максимума (от 5% до 9% маннозы-5). Наложения гликановой карты (HP-AEX) показаны на фиг. 5. Наложения показывают более низкие уровни A2F-G1 в лекарственном веществе из CP4 по сравнению с партиями CP2, что было ожидаемо.

Таблица 14. Тестирование готовых партий лекарственного вещества в отношении карт гликанов, содержащих маннозу-5 (HP-AEX)

Способ	Партия	% маннозы-5	Критерии	
			приемлемости сопоставимости ^a	Результат сопоставимости
CP4	1	6%	От 4% до 11% маннозы-5	Соответствие
	2	7%		
	3	6%		

CP2	1	7%		
	2	8%		
	3	8%		

а. Критерии приемлемости сопоставимости основаны на внутренних ретроспективных данных. Такие диапазоны не следует рассматривать как определяющие критерии для оценки биоподобия. Для обеспечения биоподобия могут потребоваться различные или более узкие диапазоны содержания маннозы-5.

[225] В результате модификации способа культивирования клеток CP4 для контроля уровней Man-5 ожидалось, что деносуаб, полученный с помощью CP4, будет иметь меньший % A2F-G1 и больший % A2F-G0 видов олигосахаридов, чем деносуаб, полученный с помощью CP2. Эти виды представляют собой встречающиеся в природе гликоформы в сыворотке крови человека и, как таковые, не считаются проблемой безопасности или эффективности.

[226] Для оценки потенциальных изменений гликанового профиля применяли анализ карты гликанов для оценки N-связанных гликанов деносуаба. На фиг. 5 показан согласованный N-гликановый профиль деносуаба, полученного с помощью двух способов. В профиле партий CP4 новых гликоформ не наблюдалось. Обобщенные данные по видам олигосахаридов % A2F-G0, % A2F-G1 и % Man 5 показаны в таблице 14. Данные CP4 находились в пределах рассчитанного диапазона допустимых интервалов (ТИ), при этом результаты % A2F-G1 находились на нижней границе расчетного диапазона ТИ CP2. Небольшой сдвиг концевой галактозилирования для партий CP2 по сравнению с партиями CP4, как ожидается, не повлияет на безопасность или эффективность продукта.

[227] Как показывают эти данные, в деносуабе, полученном с применением способа CP4, не обнаруживали новые виды углеводов по сравнению со способом CP2. Партии CP4 и CP2 соответствуют критериям сопоставимости НР-АЕХ. Обобщенные данные всех видов N-гликанов, зарегистрированных в ходе анализа НР-АЕХ, представлены в таблицах 15.1 и 15.2. Как показано в этой сводной таблице, значения, полученные для партий CP4, аналогичны значениям, полученным в способе CP2. Уровни сиалилированных частиц одинаковы в партиях CP4 и CP2. Незначительные различия в уровнях % A1F-G0 наблюдаются между партиями CP4 и CP2; однако ожидается, что эти различия не повлияют на эффективность продукта.

Таблица 15,1. Деносуаб, полученный в CP4 и CP2, сводная таблица сопоставимости НР-АЕХ

Виды N-гликанов	Критерии приемлемости сопоставимости ^a	Партия	Партия	Партия	Партия	Партия	Партия
		1 CP4	2 CP4	3 CP4	3 CP2	2 CP2	3 CP2
A2F-G0	48%-70%	68	66	67	62	58	61
A2F-G1	13%-26%	13	14	14	20	22	19

Man 5	4%-11%	6	7	6	7	8	8
-------	--------	---	---	---	---	---	---

а. Критерии приемлемости сопоставимости основаны на внутренних ретроспективных данных. Такие диапазоны не следует рассматривать как определяющие критерии для оценки биоподобия. Для обеспечения биоподобия могут потребоваться различные или более узкие диапазоны видов гликанов.

Таблица 15.2. Сводная таблица видов N-гликанов НР-АЕХ деносуаба из СР4 и СР2

Виды N-гликанов	Партии СР4			Партии СР2		
	1	2	3	1	2	3
% A1-G0	1,2	1,2	1,1	1,2	1,3	1,2
% A1F-G0	3,3	3,2	3,0	1,3	1,2	1,5
% A2-G0	5,3	6,1	5,6	4,7	4,4	4,9
% A2-G1	0,9	1,1	1,0	1,1	1,2	1,1
% A2F-G0	67,9	65,9	66,7	61,5	57,6	60,5
% A2F-G1	13,2	13,5	14,4	19,6	22,4	19,0
% A2F-G2	1,1	1,1	1,3	2,1	2,7	2,1
% маннозы-5	6,0	6,7	5,8	7,1	7,6	7,6
% второстепенных пиков	0,5	0,6	0,5	0,9	1,1	1,3
% сиалилированных пиков	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7

[228] Повышенные уровни гликирования, наблюдаемые в лекарственном веществе деносуаба из СР4 по сравнению с лекарственным веществом из СР2, соответствовали изменениям, сделанным в способе СР4, а именно комбинации увеличенной продолжительности способа культивирования клеток и использования как глюкозы, так и галактозы в средах для культивирования клеток. Галактозу не применяли в подпитке для продупродуцирования в СР2, и было показано, что галактоза в среде для культивирования приводит к более высоким уровням неферментативного гликирования, чем глюкоза (Quan et al., Anal Biochem 2008; 373(2):179-91). Лекарственное вещество из СР4 характеризуется приблизительно 24% общего гликирования по сравнению с приблизительно 10% для лекарственного вещества из СР2. Предполагается, что повышенный уровень гликирования, присутствующий в лекарственном веществе из СР4, является результатом комбинации глюкозы и галактозы.

[229] В предыдущем исследовании лекарственное вещество из СР2 сохраняло полную эффективность по результатам НТRF и анализов репортерного гена, даже когда

уровень гликирования увеличивался в ~68 раз (за счет принудительного гликирования). Эффективность лекарственного вещества из CP4 и лекарственного вещества из CP2 была эквивалентна согласно результатам HTRF и анализов репортерного гена, что дополнительно продемонстрировало, что примерно в 2 раза более высокий уровень гликирования лекарственного вещества деносуаба из CP4 не влиял на эффективность (таблицы 16.1 и 16.2). Кроме того, принудительное гликирование антител IgG1 и IgG2 не оказало заметного влияния на связывание FcRn, что также свидетельствует о том, что гликирование имело слабое влияние на биологические функции деносуаба. Совместно эти данные дают возможность предположить, что повышенное гликирование, наблюдаемое для CP4, не повлияет на безопасность или эффективность продукта.

Таблица 16.1. Результаты HTRF в отношении эффективности

Способ	№ партии	% относительной активности	Критерии	
			приемлемости сопоставимости	Результат сопоставимости
CP4	1	97%	82%-128% ^a Относительная эффективность	Соответствие
	2	96%		
	3	101%		
CP2	1	104%		
	2	97%		
	2	99%		

а. Критерии приемлемости сопоставимости основаны на внутренних ретроспективных данных. Такие диапазоны не следует рассматривать как определяющие критерии для оценки биоподобия. Для обеспечения биоподобия могут потребоваться различные или более узкие диапазоны относительной эффективности.

Таблица 16.2. Сводная таблица сопоставимости анализов репортерного гена

Способ	Номер партии	Эффективность	% CV
CP4	1	99	1
	2	101	0
	3	100	2
CP2	1	98	2
	2	97	1
	3	97	0

ПРИМЕР 9. ЭФФЕКТ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ, САХАРОЗЫ И ГАЛАКТОЗЫ НА ВЫСОКОЕ СОДЕРЖАНИЕ МАННОЗЫ

[230] В этом примере применяли разные концентрации глюкозы, сахарозы и галактозы для оценки их эффектов на высокое содержание маннозы в деносуабе.

[231] Были выбраны две альтернативы источника углерода для глюкозы, дисахарида сахарозы и моносахарида галактозы, с целью оценить их эффекты на процентное содержание молекул деносумаба, содержащего гликаны с высоким содержанием маннозы. Смену среды для культивирования производили с 11 по 17 день путем перфузии, как подробно описано выше.

[232] В одном исследовании оценивали эффект концентрации глюкозы и галактозы на содержание Man-5. Схема эксперимента представлена в таблице 17.

Таблица 17. Схема эксперимента. Глюкоза и галактоза

Паттерн	Идентификатор цикла/номер CCD	Глюкоза	Галактоза
Контроль	102/ 1122	2	11,5
++	103/ 1123	3	13
--	104/ 1124	0	10
+-	105/ 1125	0	13
--	106/ 1126	0	10
0	107/ 1127	1,5	11,5
+-	108/ 1128	0	13
+--	109/ 1129	3	10
Контроль	110/ 1130	2	11,5
++	111/ 1131	3	13
+--	112/ 1132	3	10
0	113/ 1133	1,5	11,5

[233] На фиг. 7А показан полный анализ модели Man-5 на 17-й день с прогнозируемым профилем в центральных точках эксперимента. Данные показывают, что взаимодействие между глюкозой и галактозой, вероятно, важно для уровней маннозы-5. На фиг. 7В показан прогноз в отношении Man-5 на 17-й день с уровнем глюкозы, установленным на 2,5 г/л. Результаты в отношении Man-5 получали с помощью аналитического способа HELIC. На фиг. 7С показано изменение динамики времени для Man-5 с 11 по 17 дни. График показывает рост Man-5 с течением времени.

[234] В таблице 18 показан гликановый профиль по данному исследованию. Ни один из вариантов этих видов гликанов не был статистически значимым.

Таблица 18. Гликановый профиль на день 17

Цикл/Номер CCD	Глюкоза		% пика В, RP-HPLC				
	Глюкоза	Галактоза	% 5	% A2G0F	% A2G1F	% A2G2F	
103/ 1123	3	13	12,97	36,66	30,55	6,24	16,91
104/ 1124	0	10	9,68	33,96	33,78	8,16	14,92
105/ 1125	0	13	8,37	40,04	31,69	6,18	13,69

Цикл/Номер CCD	Глюкоза	Галактоза	% Man 5	% A2G0F	% A2G1F	% A2G2F	% пика B, RP-HPLC
106/ 1126	0	10	10,61	37,88	30,79	6,15	16,3
107/ 1127	1,5	11,5	9,05	39,88	31,14	6,13	18,09
108/1128	0	13	8,83	38,64	32,31	6,53	15,57
111/ 1131	3	13	10,2	41,04	29,74	5,92	17,5
112/ 1132	3	10	8,92	39,31	31,47	6,56	16,02
113/ 1133	1,5	11,5	10,89	36,34	31,72	7,1	15,58

[235] На основании этого исследования было определено, что приблизительно для 10% Man-5 среда для культивирования должна содержать приблизительно 2,5 г/л глюкозы и приблизительно 11,5 г/л галактозы. Эти концентрации приводили к балансу между ростом, жизнеспособностью и титром при достижении основной цели, обеспечения целевого уровня Man-5. Анализ также показывает корреляцию между концентрацией глюкозы и ростом и титром, при этом более высокий уровень глюкозы обеспечивает более высокий уровень роста и титр. Выбирали концентрацию 2,5 г/л галактозы, хотя более высокая концентрация галактозы может обеспечивать более высокий уровень Man-5, но более высокий уровень галактозы может оказывать потенциально отрицательный эффект на жизнеспособность культуры.

[236] Во втором исследовании оценивали эффект концентрации глюкозы и сахарозы на содержание Man-5. Схема эксперимента представлена в таблице 19. Целевой уровень Man-5 составляет по меньшей мере 7%-9%.

Таблица 19. Схема эксперимента. Глюкоза и сахароза

№	Паттерн	Глюкоза	Сахароза	Галактоза	Комментарии	Номер реакции
1	++	6	24	*		1
2		2	16	11,5	Если Gal < 2, подпитка Gal	2
3	--	2	16	*		3
4	+-	2	24	*		4
5	-+	2	24	*		5
6	00	4	20	*		6
7	+-	6	16	*		7
8	--	2	16	*		8
9	++	6	24	*		9
10		2	16	11,5	Если Gal < 2, подпитка Gal	10
11	+-	6	16	*		11
12	00	4	20	*		12

[237] Из тестированных факторов все обеспечивали достижение уровней Man-5 выше 8% на 17-й день и многие обеспечивали достижение уровня выше 10% к 15-му дню. Значения 17-й на день для Man-5 варьировались от 9% до чуть ниже 16%. Двумя

условиями, наиболее близкими к уровням CP2, были условия с 2 г/л глюкозы с 16 или 24 г/л сахарозы. Графики для Man-5 с помощью анализа HILIC показаны на фиг. 8B. На фиг. 8C показаны уровни Man-5 и общие виды с высоким содержанием маннозы по сравнению с эталоном CP2.

ПРИМЕР 10. ЭФФЕКТ ДОБАВКИ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ГЛЮКОЗЫ И ГАЛАКТОЗЫ НА КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА SR3 GS-KO

[238] В этом примере применяли линию клеток-хозяев CHO для оценки эффекта среды для культивирования с низким содержанием глюкозы, в которую добавляли альтернативный источник углерода (галактозу). Клеточная линия SR3 GS-KO происходит от линии клеток CHO-K1 с нокаутом GS.

[239] Использовали 10-дневную платформу периодического культивирования с подпиткой (FB) для оценки профиля роста, экспрессии и качества продукта (PQ) молекул деносуаба в условиях продуцирования со следующими стадиями (фиг. 9A).

1. *Инокуляция N-1.* Пулы были восстановлены до >85% жизнеспособности до 10-дневного FB. 4-дневную культуру с системой посевных ферментов трансфицированных деносуабом клеток SR3-E1 GS-KO высевали в среду для культивирования с концентрацией 5×10^5 клеток/мл.

2. *Инокуляция N.* Культуры для продуцирования были созданы из системы посевных ферментов N-1, где клетки засеивали в 50 мл микроцентрифужные пробирки. Периодическую культуру с подпиткой высевали при концентрации 1×10^6 клеток/мл в день 0 при высокой жизнеспособности клеток (>98%). Сосуды для культивирования выдерживали при $36^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ при встряхивании со скоростью 225 об./мин. во время фазы продуцирования.

3. *Контроль в ходе способа.* Плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности измеряли на 3, 6, 8 и 10 день с использованием Vicell. Уровень потребления глюкозы измеряли в тот же день с помощью Novaflex.

4. *Подпитка и добавки.* Культуры для продуцирования подпитывали на 3, 6 и 8 дни питательной средой количестве 5% от начального объема культуры и 1x тирозин-цистеиновой добавкой, подаваемой в количестве 0,4% от объема подпитки. Добавку 10 г/л галактозы добавляли в виде болюса в дни подпитки, в то время как уровень глюкозы снижался за счет потребления, и выполняли подпитку только для поддержания уровня 1-5 г/л во время фазы продуцирования.

5. *Оценка титра и качества продукта.* Перед сбором на 10 день измеряли плотность жизнеспособных клеток, процент жизнеспособности и уровень глюкозы. Для сбора кондиционированной среды (CM) культуры центрифугировали при 200 g в течение 15 минут. CM собирали для измерения титра и очистки на центральной колонке ATOLL. Очищенный материал применяли для оценки качества продукта, что предусматривает анализы HILIC, CEX-HPLC, SE-HPLC, nrCE-SDS и rCE-SDS.

10.1 *Добавление D-галактозы в течение 10-дневного периодического культивирования с подпиткой не влияло на жизнеспособность культуры.*

[240] Три пула трансфицированных деносумабом клеток SR3-E1 GSKO подвергали исследованию с повторениями в трех условиях культивирования: 1) Контроль, или контроль, добавление глюкозы в дни подпитки для поддержания уровня 10-12 г/л во время культивирования; 2) Gal/Gluc, 10 г/л галактозы, добавленной в виде болюса вместе с глюкозой для поддержания уровня 10-12 г/л; и 3) только Gal, 10 г/л галактозы добавленной в виде болюса без подпитки глюкозой для поддержания уровня глюкозы 1-5 г/л во время культивирования. Жизнеспособность клеток в течение 10-дневного периодического культивирования с подпиткой измеряли с помощью Vicell на 3, 6, 8 и 10 день до подпитки и сбора. Все культуры среди пулов и условий показали высокую жизнеспособность (>80%) в течение 10-дневного периодического культивирования с подпиткой (фиг. 9B), что позволяет предположить, что изменение уровня и источника сахара в культуре для продуцирования оказало минимальное влияние на жизнеспособность.

10.2 Эффект низкого уровня глюкозы на рост клеток и удельную продуктивность.

[241] Измерение уровней глюкозы в биореакторе проводили с применением Novaflex на 3, 6, 8 и 10 день до подпитки для гарантии того, что глюкоза поддерживалась на соответствующем уровне для каждого условия. Для условий культивирования только с gal уровень глюкозы снижался за счет потребления до ~2 г/л к 6-му дню. При этом условия глюкоза оставалась на таком уровне в течение оставшейся части 10-дневного периодического культивирования с подпиткой (фиг. 9C). Это наблюдение дает возможность предположить, что в отсутствие глюкозы в качестве источника сахара, клетки GSKO SR3-E1, экспрессирующие деносумаб, могут переходить на использование галактозы для поддержания своего роста и другого вида клеточной активности.

[242] Низкий уровень глюкозы не влиял на жизнеспособность, но рост клеток был немного медленнее в культурах, в которые добавляли галактозу. Самый медленный рост наблюдался в культурах, в которые добавляли как галактозу, так и глюкозу (фиг. 10A). Хотя титр в этих условиях культивирования оказался ниже, удельная продуктивность не показала значительного различия по сравнению с контрольными культурами (фиг. 10B-10C). Добавление галактозы при условиях с низким уровнем глюкозы коррелировало с небольшим падением титра и снижением удельной продуктивности.

10.3 Добавление D-галактозы в комбинации с низким содержанием глюкозы увеличивало уровень высокого содержания маннозы в деносумабе.

[243] Кондиционированную среду после 10-дневного периодического культивирования с подпиткой подвергали очистке с помощью ATOLL и анализам характеристик качества продукта. Очищенный продукт анализировали посредством эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC), и было обнаружено, что он имеет чистоту ~99% и примеси с высокой и низкой молекулярной массой составляют <1% (данные не показаны).

[244] Затем выполняли хроматографию гидрофильных взаимодействий (HILIC) для измерения уровня гликанов в продукте. Результаты показывают, что добавление

галактозы в присутствии высокого уровня глюкозы не влияет на уровень гликанов с высоким содержанием маннозы (M5) в деносумабе. С другой стороны, добавка 10 г/л галактозы при низком уровне глюкозы увеличивала уровень высокого содержания маннозы приблизительно в 1,5 раза или больше (фиг. 11). Эти данные свидетельствуют о том, что изменение источника сахара с глюкозы на галактозу в ходе мелкомасштабного производства оказало прямое влияние на уровень высокого содержанием маннозы в продукте.

10.4 Добавление галактозы увеличивало количество моно- и бигалактозилированных остатков гликана.

[245] Анализ гликанового профиля дополнительно показал, что добавление галактозной добавки в течение 10-дневного периодического культивирования с подпиткой приводило к минимальному уменьшению агалактоостатков, но увеличивало количество асиало- моногалакто- и бигалактоостатков. Увеличение количества этих остатков было обратно пропорционально уровню глюкозы, присутствующей в культурах с низким содержанием глюкозы, показывая ~2-4-кратное увеличение (фиг. 12).

[246] Данное описание наиболее полно понятно в свете принципов, предусмотренных в ссылках, цитируемых в описании. Варианты осуществления в пределах описания обеспечивают иллюстрацию вариантов осуществления настоящего изобретения и не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Специалисту в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение охватывает многие другие варианты осуществления. Все публикации, патенты и последовательности GenBank, цитируемые в данном раскрытии, включены посредством ссылки во всей их полноте. В тех случаях, когда включенный посредством ссылки материал противоречит или не согласуется с данным описанием, это описание имеет приоритет относительно любого такого материала. Цитирование любых ссылок в данном документе не должно рассматриваться как подтверждение того, что такие ссылки являются предшествующим уровнем техники для настоящего изобретения.

[247] Различные признаки и варианты осуществления настоящего изобретения, упомянутые в отдельных разделах выше, применимы, при необходимости, к другим разделам *mutatis mutandis*. Следовательно, признаки, указанные в одном разделе, могут быть при необходимости объединены с признаками, указанными в других разделах.

[248] Специалистам в данной области техники будут понятны или они будут способны определить посредством проведения только обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены приведенными ниже вариантами осуществления.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения уровня высокого содержания маннозы, присутствующей на молекулах деносуаба, где указанные молекулы деносуаба рекомбинантно экспрессируются клеткой-хозяином млекопитающего, предусматривающий:

(а) инкубирование указанной клетки-хозяина млекопитающего в первой среде для культивирования во время фазы роста до тех пор, пока плотность клеток не будет составлять по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл, где указанная первая среда для культивирования содержит от 1 г/л до 20 г/л глюкозы; и затем

(b) инкубирование клеток-хозяев из стадии (а) во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования для экспрессии указанных молекул деносуаба, где указанная вторая среда для культивирования содержит от 0 г/л до 10 г/л глюкозы и от 5 г/л до 20 г/л галактозы;

где от 2% до 14% молекул деносуаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

2. Способ по п. 1, где во время фазы роста концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от 4 г/л до 20 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

3. Способ по п. 2, где, когда клетки-хозяева инкубируют во второй среде для культивирования во время фазы продуцирования, концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от 0 г/л до 8 г/л и концентрацию галактозы поддерживают на уровне от 7 г/л до 15 г/л посредством болюсной подпитки или перфузии.

4. Способ по п. 1, где, во время фазы продуцирования, клетки-хозяева первоначально выдерживают в первой среде для культивирования в течение от приблизительно 3 до приблизительно 15 дней и затем переносят во вторую среду для культивирования посредством перфузии или болюсной подпитки.

5. Способ по п. 1, где на стадии (а) указанная плотность клеток составляет от 5×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 12×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

6. Способ по п. 1, где от приблизительно 4% до приблизительно 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

7. Способ по п. 1, где указанная клетка-хозяин млекопитающего представляет собой клетку СНО.

8. Способ по п. 1, где указанная клетка-хозяин млекопитающего представляет собой клетку CS-9.

9. Способ по п. 1, где указанная первая среда для культивирования содержит метотрексат (MTX).

10. Способ по п. 1, предусматривающий:

(а) инкубирование указанной клетки-хозяина млекопитающего в первой среде для культивирования во время фазы роста и добавление в культуру одной или нескольких болюсных подпиток, где концентрацию глюкозы поддерживают на уровне от приблизительно 4 г/л до приблизительно 18 г/л во время фазы роста;

(b) обеспечение перехода клеток-хозяев из стадии (а) из фазы роста в фазу

продуцирования и поддержание концентрации глюкозы на уровне от приблизительно 4 г/л до приблизительно 18 г/л в течение от приблизительно 3 дней до приблизительно 15 дней; и затем

(с) обеспечение перехода клеток-хозяев из стадии (b) во вторую среду для культивирования, где указанная вторая среда для культивирования содержит от приблизительно 1 г/л до приблизительно 5 г/л глюкозы и от приблизительно 10 г/л до приблизительно 12 г/л галактозы.

11. Композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где по меньшей мере 15% молекул деносуаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина.

12. Композиция по п. 11, где от 2% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

13. Композиция по п. 11, где от 4% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

14. Композиция по п. 11, где указанный деносуаб связывается с RANKL человека со значением аффинности связывания (K_D), составляющим приблизительно 25 пМ или меньше.

15. Композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, где по меньшей мере 5% молекул деносуаба содержат один или несколько гликированных остатков лизина, которые содержат фрагмент галактозы.

16. Композиция по п. 15, где от 2% до 14% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

17. Композиция по п. 15, где от 4% до 11% молекул деносуаба имеют высокое содержание маннозы в сайте N-298.

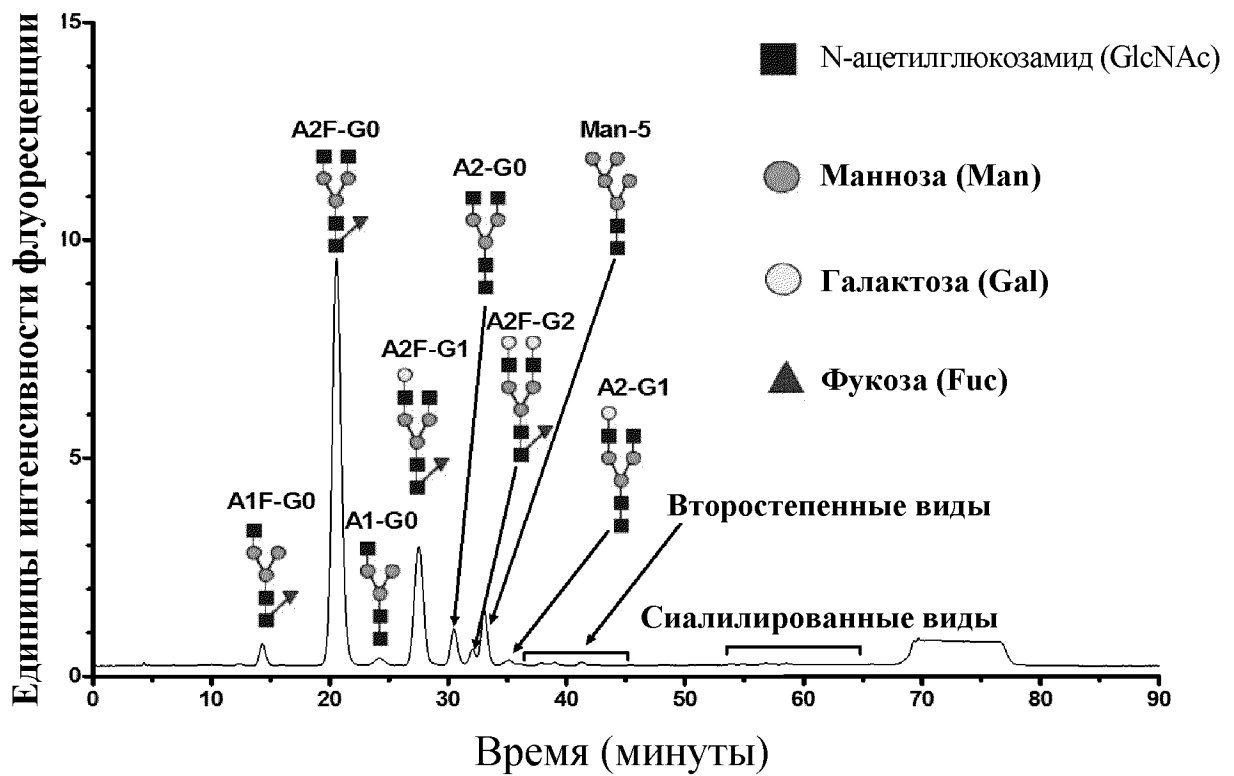
18. Композиция по п. 15, где указанный деносуаб связывается с RANKL человека со значением аффинности связывания (K_D), составляющим приблизительно 25 пМ или меньше.

19. Композиция, содержащая полученные рекомбинантным путем молекулы деносуаба, и где от 0,2% до 1,8% молекул деносуаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

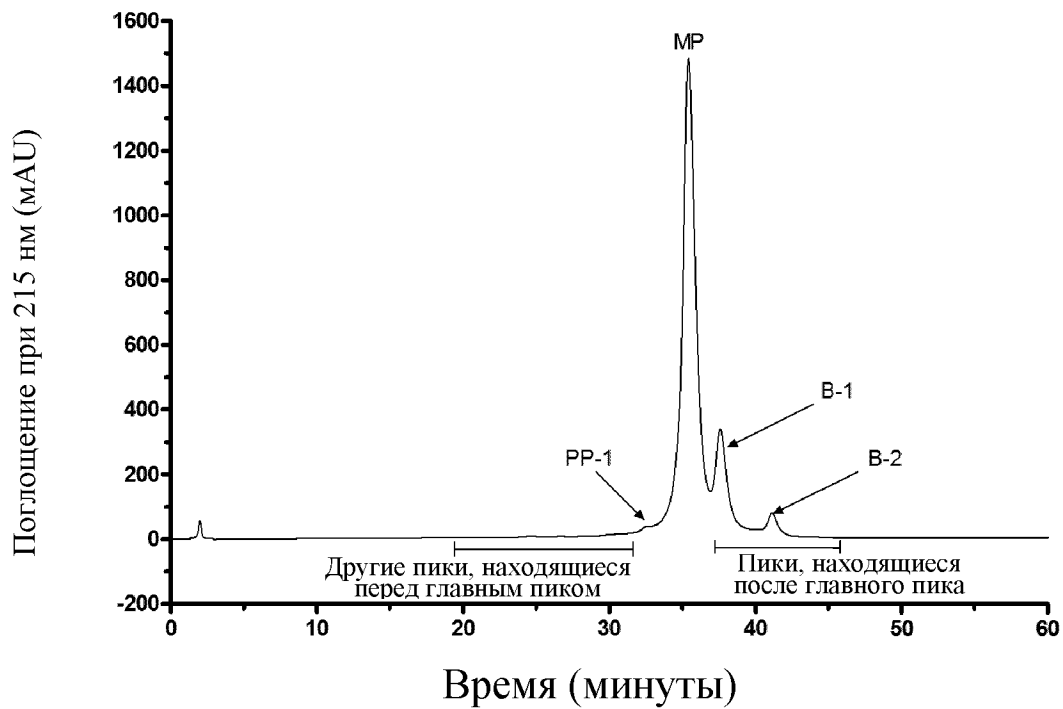
20. Композиция по п. 19, где от приблизительно 0,5% до приблизительно 1% молекул деносуаба содержат гликан с высоким содержанием маннозы в сайте N-298.

По доверенности

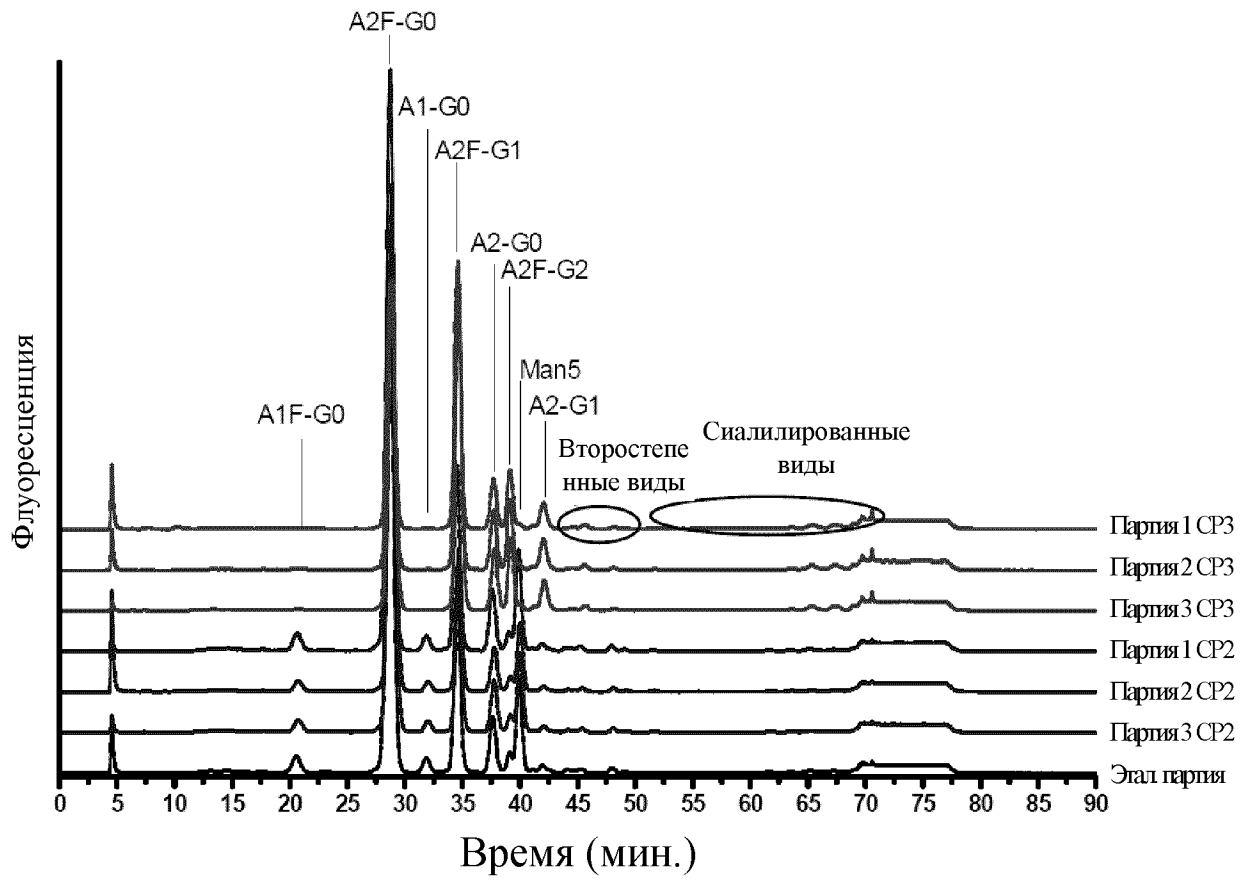
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3А



Фиг. 3В

Относительные распределения N-гликанов в деносумабе из партий CP3 и CP2

Тип образца	Номер партии	% A1F-G0 ^a	% A2F-G0 ^b	% A1-G0 ^c	% A2F-G1 ^d	% A2-G0 ^e	% A2F-G2 ^f	% Man5 ^g	% A2-G1 ^h	% второстепенных видов	% сиалилированных
CP3	1	0,2	41,1	0,1	35,8	7,1	7,4	0,7	3,9	1,7	2,0
	2	0,2	40,7	0,2	35,8	7,1	7,5	0,7	4,0	1,8	2,1
	3	0,2	42,6	0,1	35,6	6,8	7,1	0,7	3,6	1,5	2,0
CP2	1	2,0	61,0	1,6	16,2	5,6	1,4	8,4	0,8	2,0	1,0
	2	1,7	61,8	1,4	16,6	5,5	1,5	7,6	0,7	1,9	1,2
	3	1,6	62,3	1,3	16,8	5,5	1,4	7,5	0,7	1,9	0,8
Эталонный стандарт	этал.	2,1	58,8	1,8	17,6	5,7	1,6	8,6	0,9	1,9	1,1

^a A1FG-G0: асиало-, агалакто-, моноантеннарные, коровые фукозилированные

^b A2F-G0: асиало-, агалакто-, биантеннарные, коровые фукозилированные

^c A1-G0: асиало-, агалакто-, моноантеннарные

^d A2F-G1: асиало-, моногалакто-, биантеннарные, коровые фукозилированные

^e A2-G0: асиало-, агалакто-, биантеннарные

^f A2F-G2: асиало-, бигалакто-, биантеннарные, коровые фукозилированные

^g Man5: высокое содержание маннозы 5

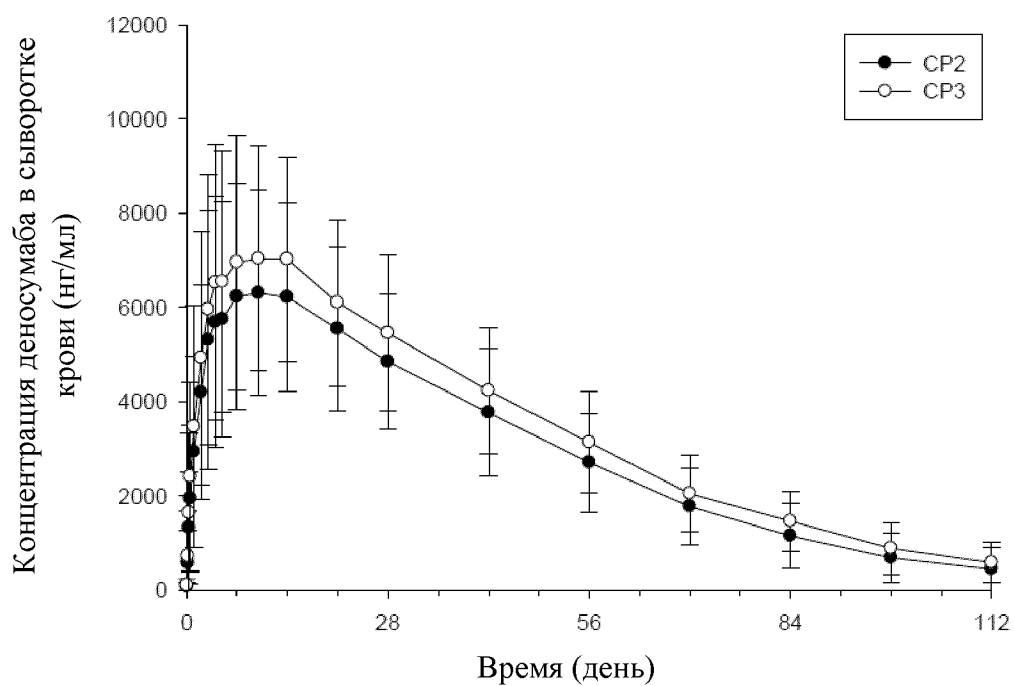
^h A2-G1: асиало-, моногалакто-, биантеннарные

ⁱ второстепенные виды: преимущественно высокое содержание маннозы 6 и высокое содержание маннозы 7

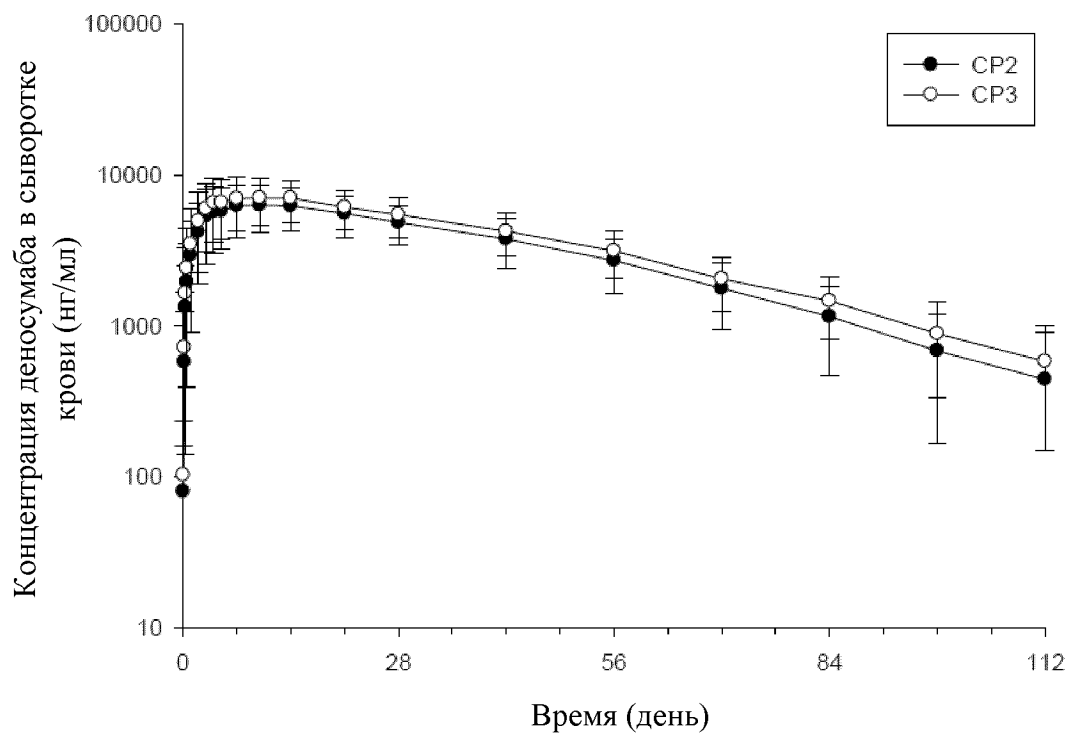
^j сиалилированные виды: моно- и бисиалилированные структуры с различными степенями галактозилирования и включение коровых фукозилированных структур

Тип образца	%галактозилированных	% сиалилированных	% Man-5	% моноантеннарных
CP3 (среднее)	46,9	2,0	0,7	0,3
CP2 (среднее)	18,7	1,0	7,8	3,2
Эталонный стандарт	20,1	1,1	8,6	3,9

Фиг. 4А

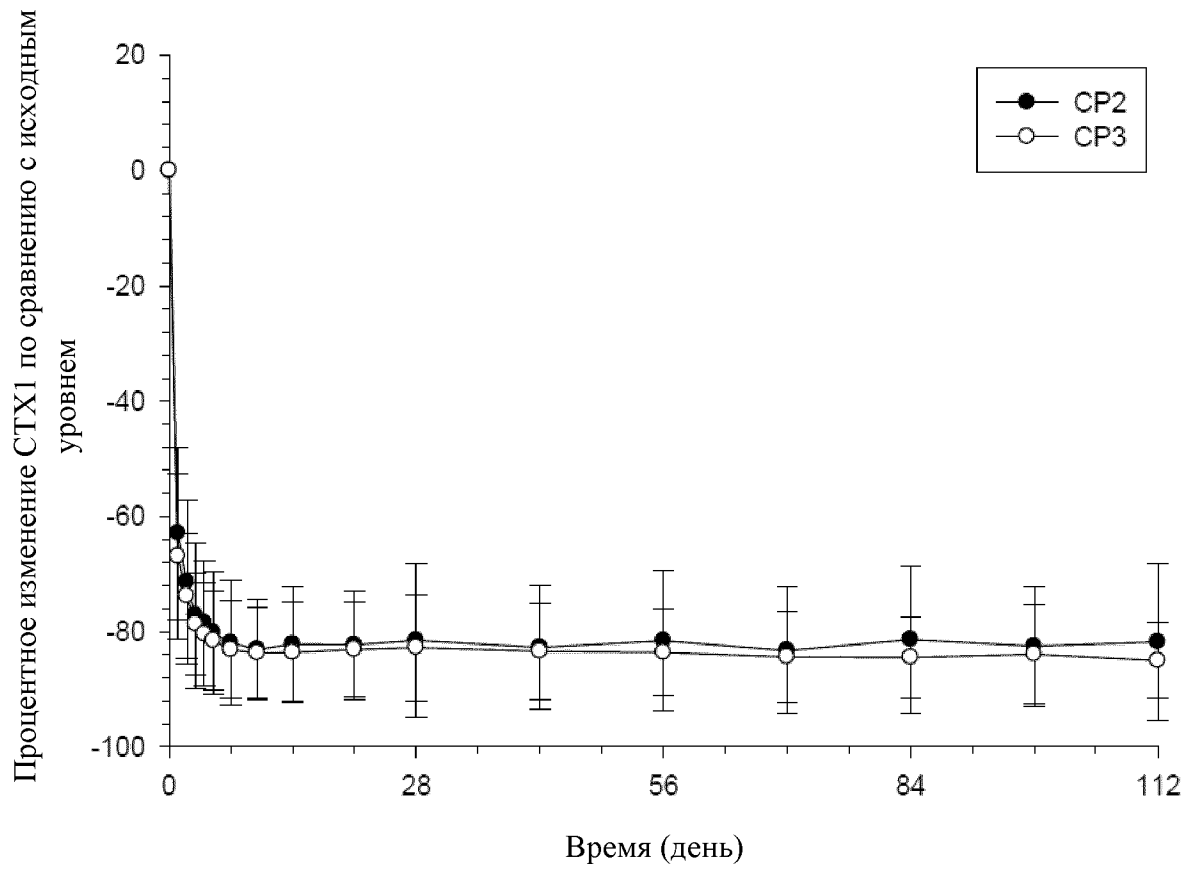


Фиг. 4В



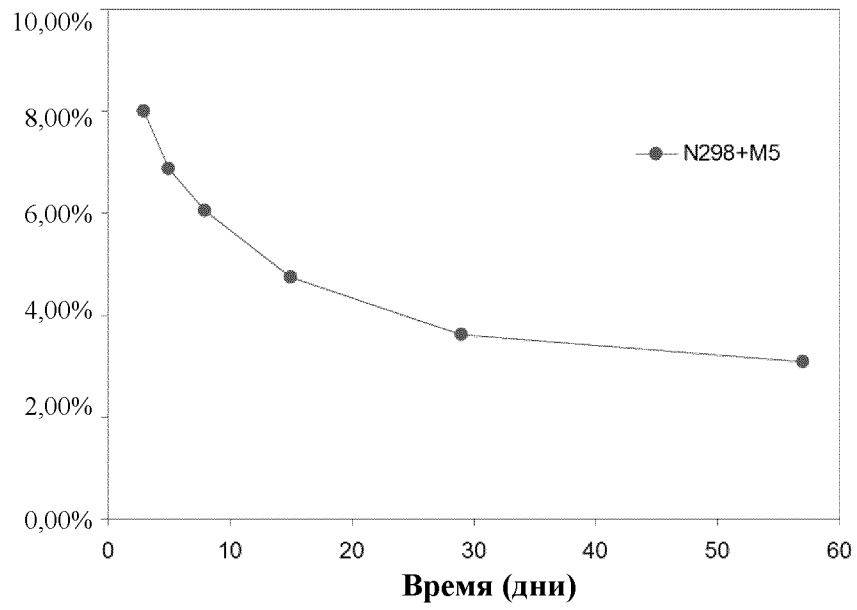
5/20

Фиг. 4С

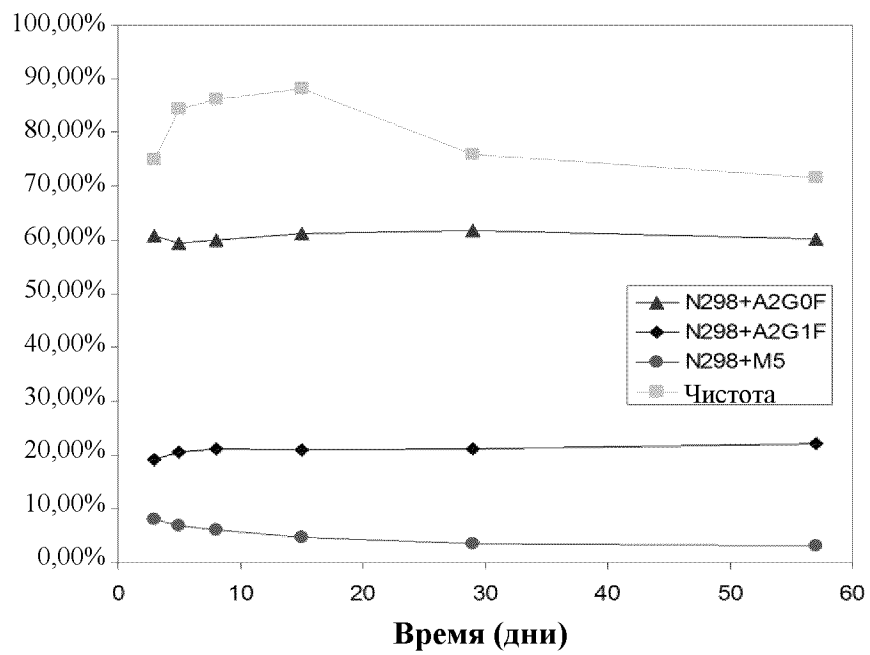


6/20

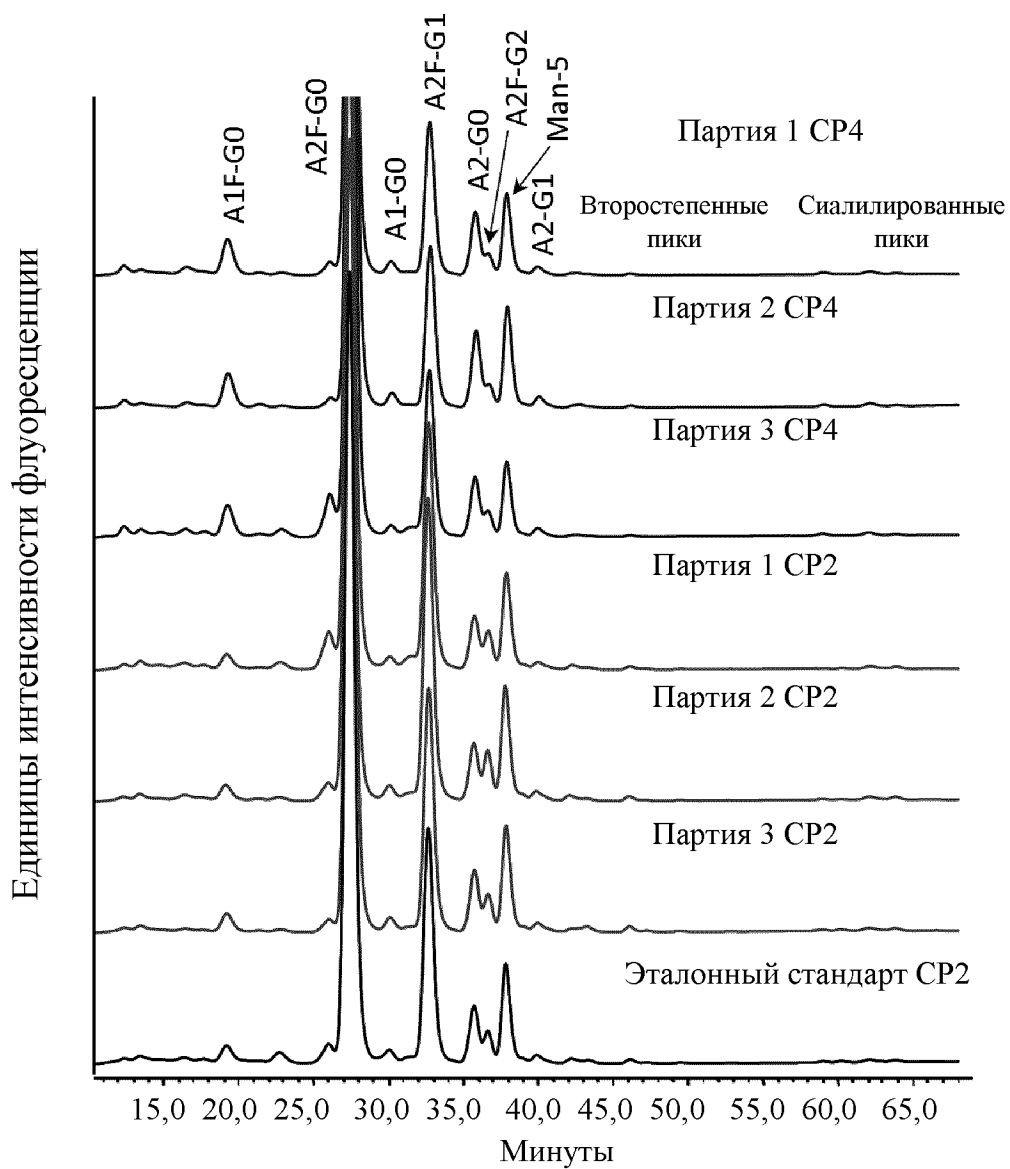
Фиг. 4D



Фиг. 4E



Фиг. 5



Фиг. 6А

M E F G L S W L F L V A I L K G V Q C
ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGT
E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGC
Q A P G K G L E W V S G I T G S G G S
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTACTGGGAGTGGTGGTAGT
T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC
C A K D P G T T V I M S W F D P W G Q
TGTGCGAAAGATCCAGGACTACGGTGATTATGAGTTGGTTCGACCCCTGGGGCCAG
G T L V T V S S A S T K G P S V F P L
GGAACCCTGGTCAACGCTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG
A P C S R S T S E S T A A L G C L V K
GCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGC
V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
GTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H
GTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC
K P S N T K V D K T V E R K C C V E C
AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGC

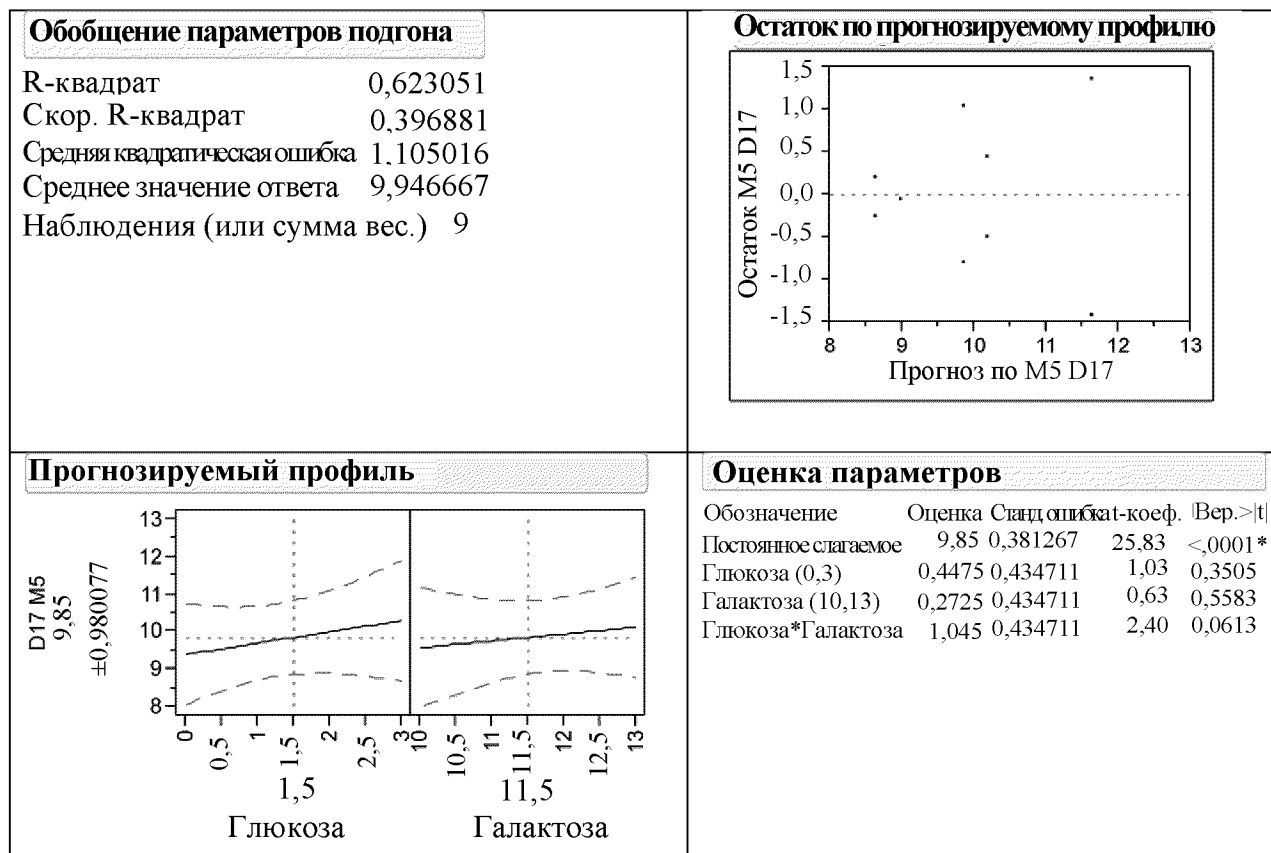
Фиг. 6А(продолжение)

P P C P A P P V A G P S V F L F P P K
CCACCGTGCCCAGCACCCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAA
P K D T L M I S R T P E V T C V V V D
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGAC
V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V
GTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V
CATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTC
S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K
AGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
V S N K G L P A P I E K T I S K T K G
GTCTCCAACAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG
E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTG
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
T Q K S L S L S P G K
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

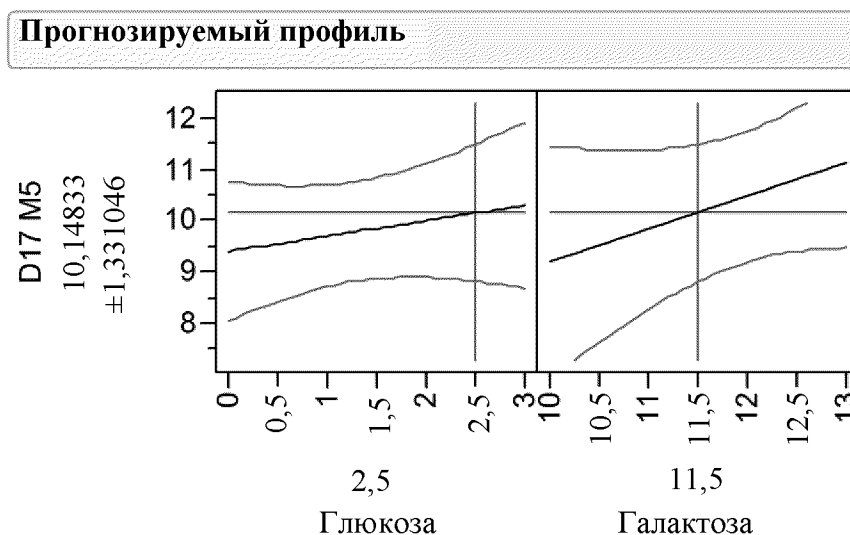
Фиг. 6В

M E T P A Q L L F L L L L W L P D T T
ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACC
G **E** I V L T Q S P G T L S L S P G E R
GGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGA
A T L S C R A S Q S V R G R Y L A W Y
GCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAGAGTGTTCGCGGCAGGTA CTTAGCCTGGTAC
Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A
CAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC
T G I P D R F S G S G S G T D F T L T
ACTGGCATCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACC
I S R L E P E D F A V F Y C Q Q Y G S
ATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGT TTTACTGTCAGCAGTATGGTAGT
S P R T F G Q G T K V E I K R T V A A
TCACCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGAACTGTGGCTGCA
P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S
CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCT
V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTG
D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K
GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAG
D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG
S F N R G E C
AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

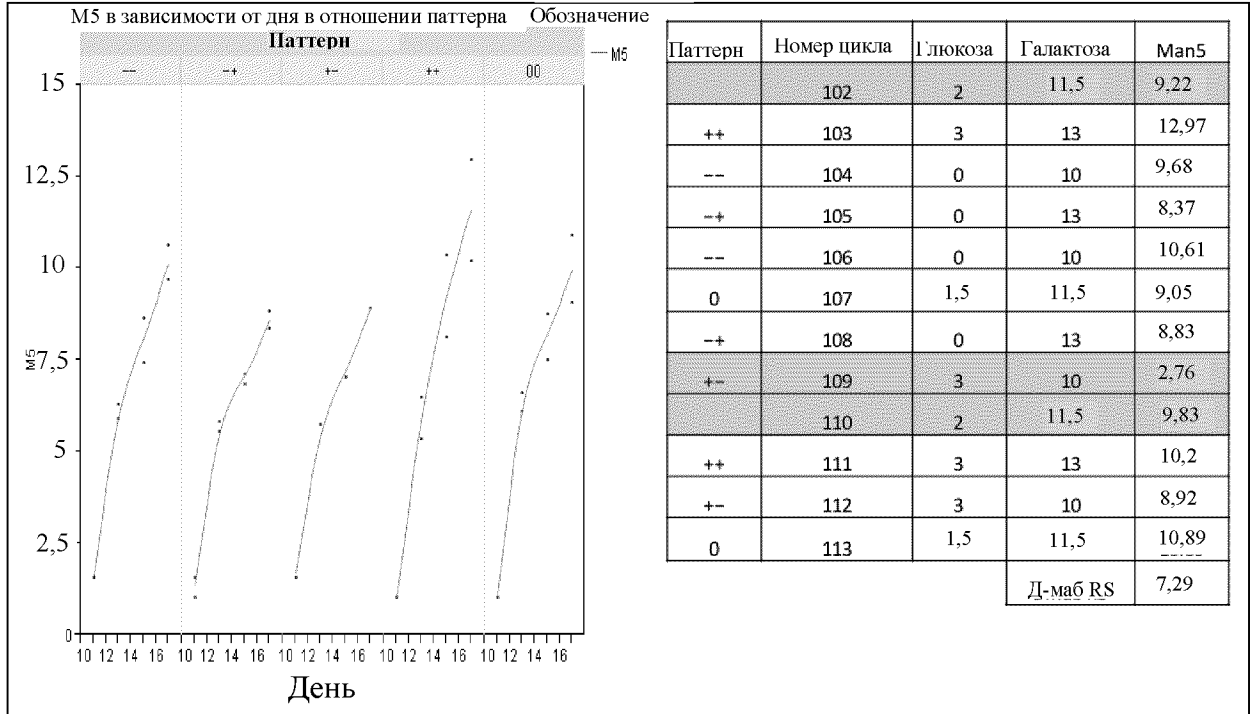
Фиг. 7А



Фиг. 7В



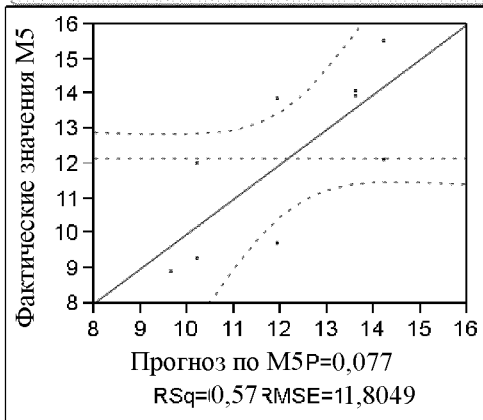
Фиг. 7С



Фиг. 8А

Ответ M5

Фактические значения по прогнозированному профилю



Обобщение параметров подгона

R-квадрат 0,574576
 Скор. R-квадрат 0,432768
 Средняя квадратическая ошибка 1,804941
 Среднее значение ответа 12,16
 Наблюдения (или сумма вес.)⁹

Дисперсионный анализ

Источник	DF	Сумма площадей	Средняя площадь	F-отношение
Модель	2	26,399921	13,2000	4,0518
Ошибка	6	19,546879	3,2578	Вер.>F
Общая к.	8	45,946800		0,0770

Оценка параметров

Обозначение	Оценка	Станд. ошибка	t-коэф.	Вер.> t
Постоянное слагаемое	11,907308	0,613108	19,42	<.0001*
Глюкоза (2,6)	1,9833654	0,696807	2,85	0,0293*
Сахароза (16,24)	0,2908654	0,696807	0,42	0,6909

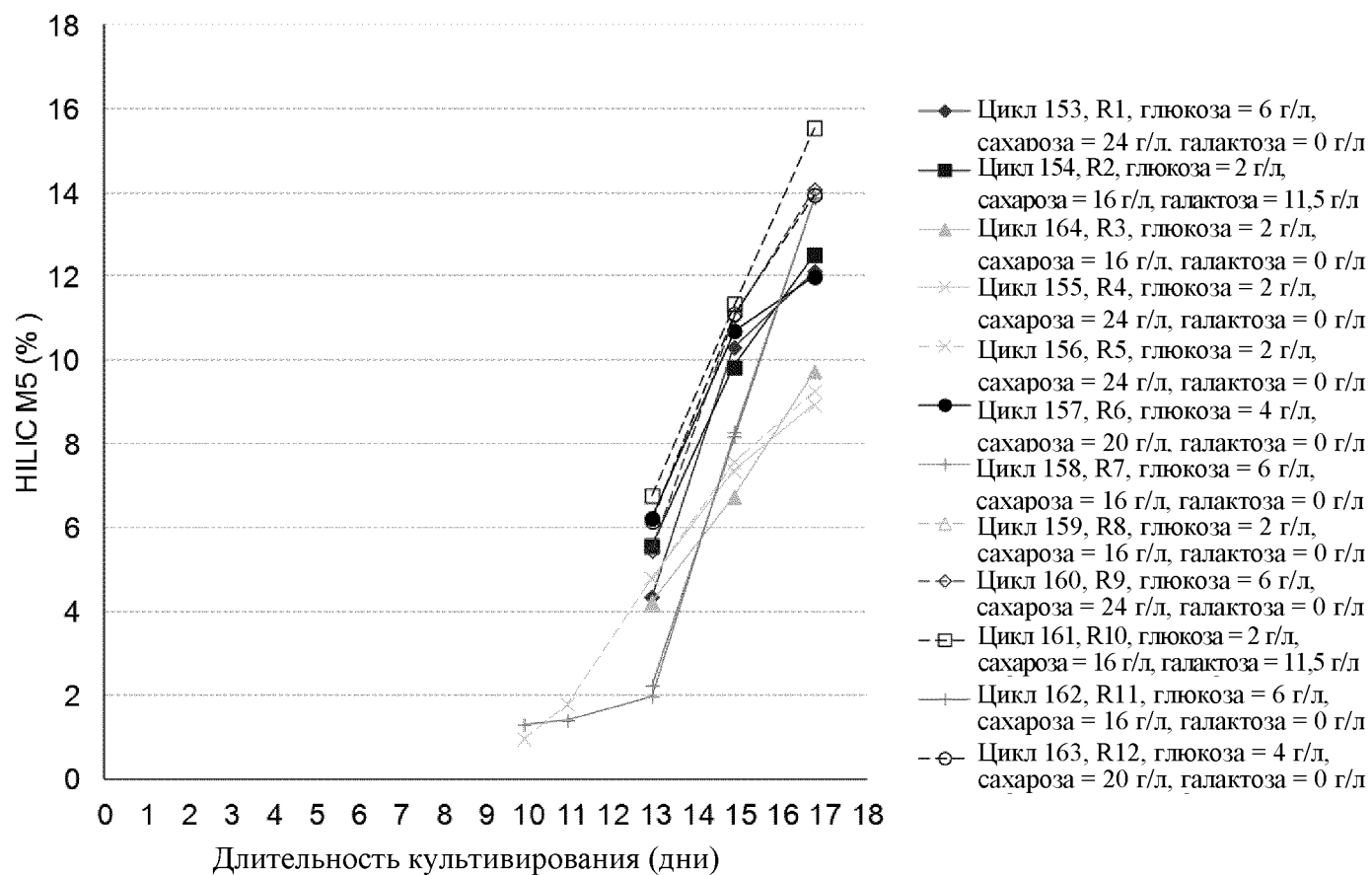
Оценка отсортированных параметров

Обозначение	Оценка	Станд. ошибка	t-коэф.	Вер.> t
Глюкоза (2,6)	1,9833654	0,696807	2,85	0,0293*
Сахароза (16,24)	0,2908654	0,696807	0,42	0,6909

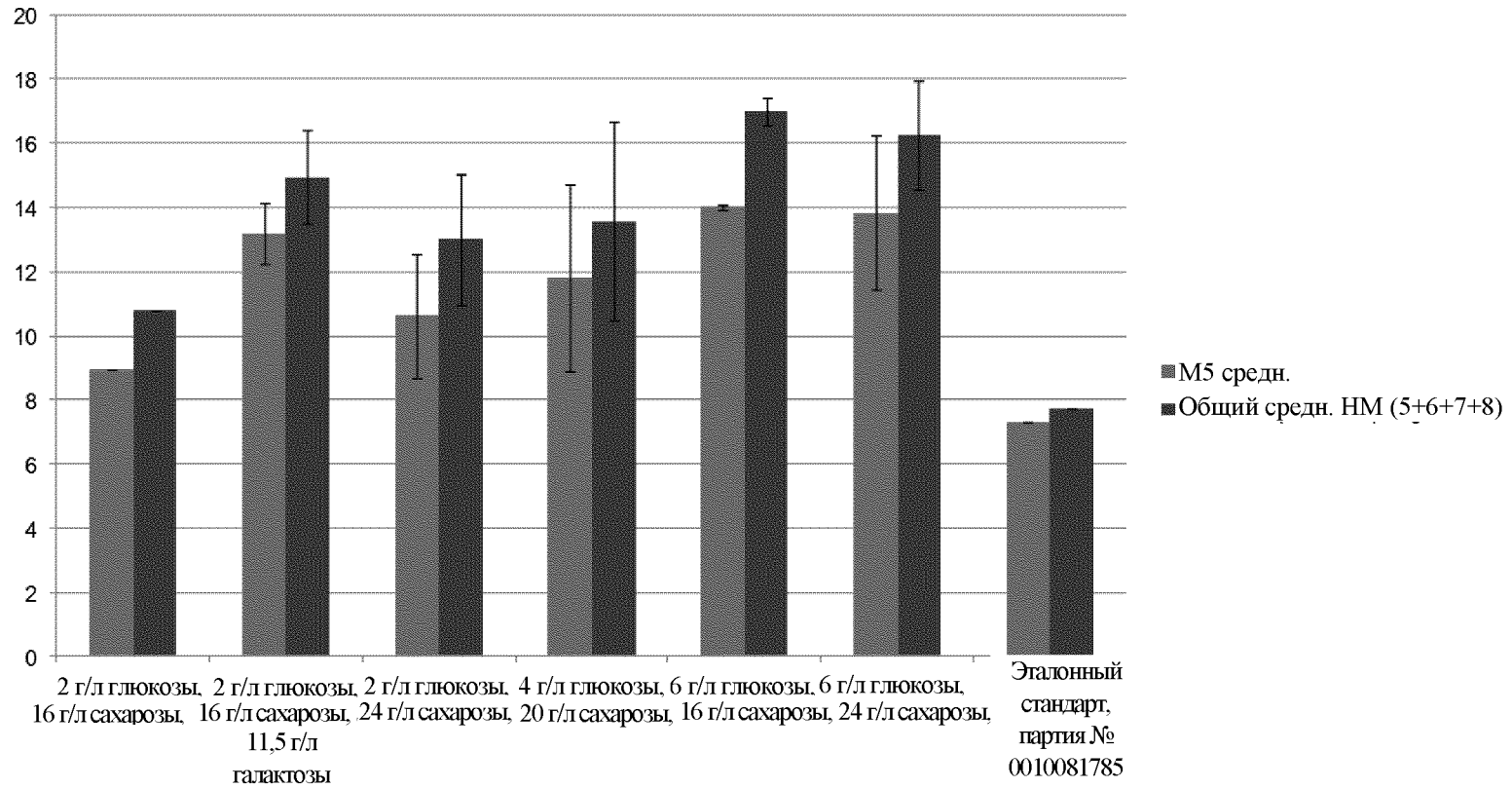


Фиг. 8В

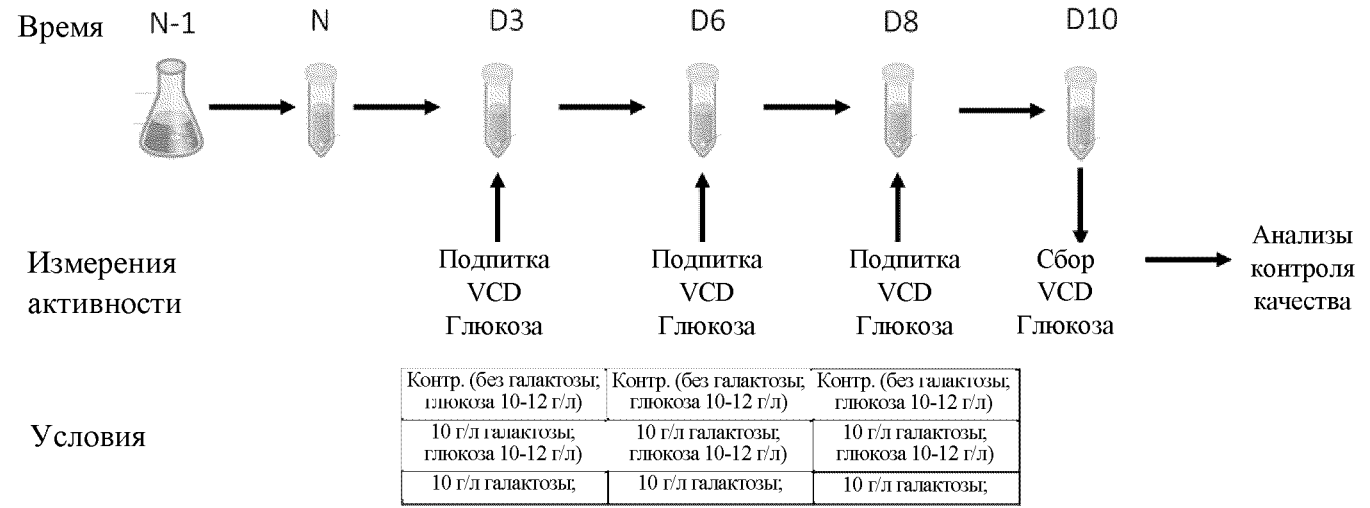
НІІС М5



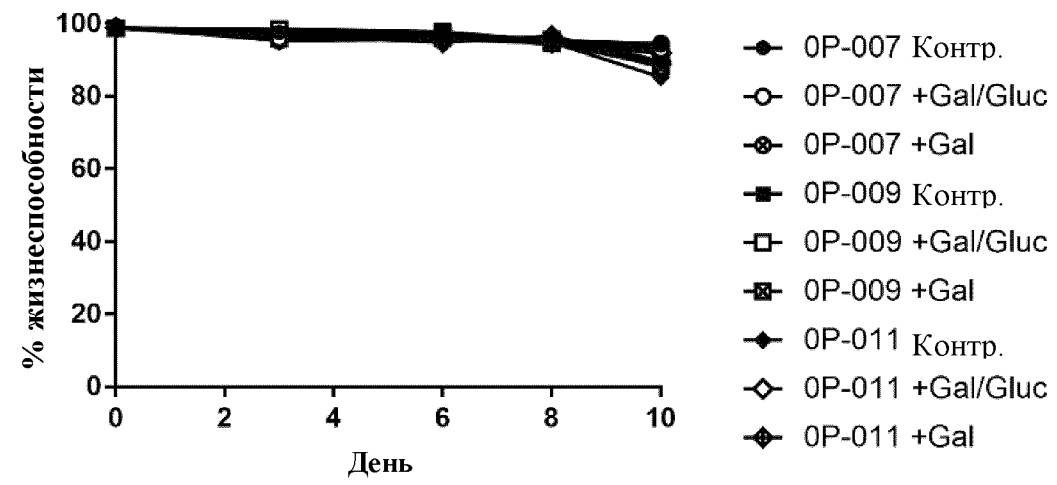
Фиг. 8С



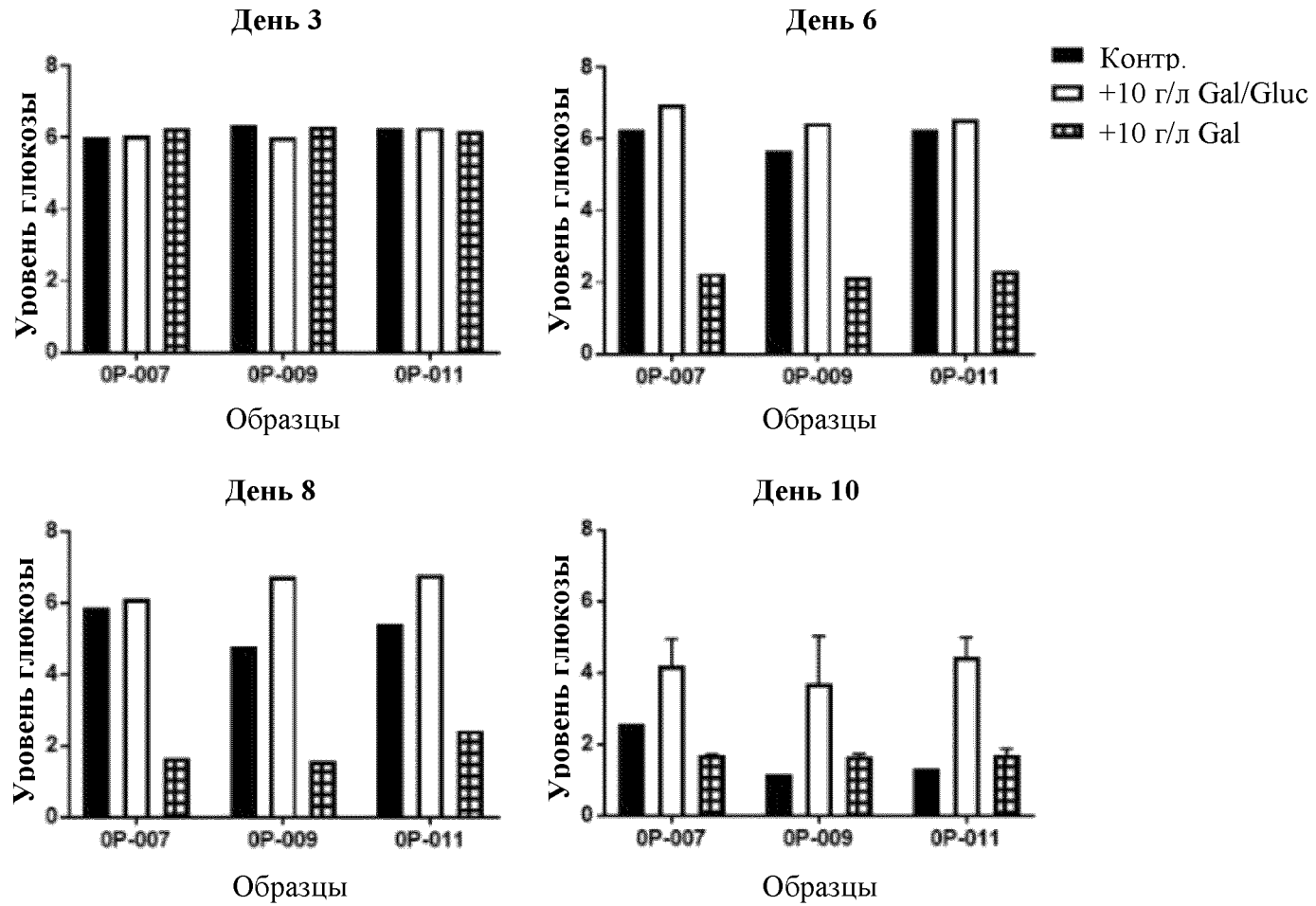
Фиг. 9А



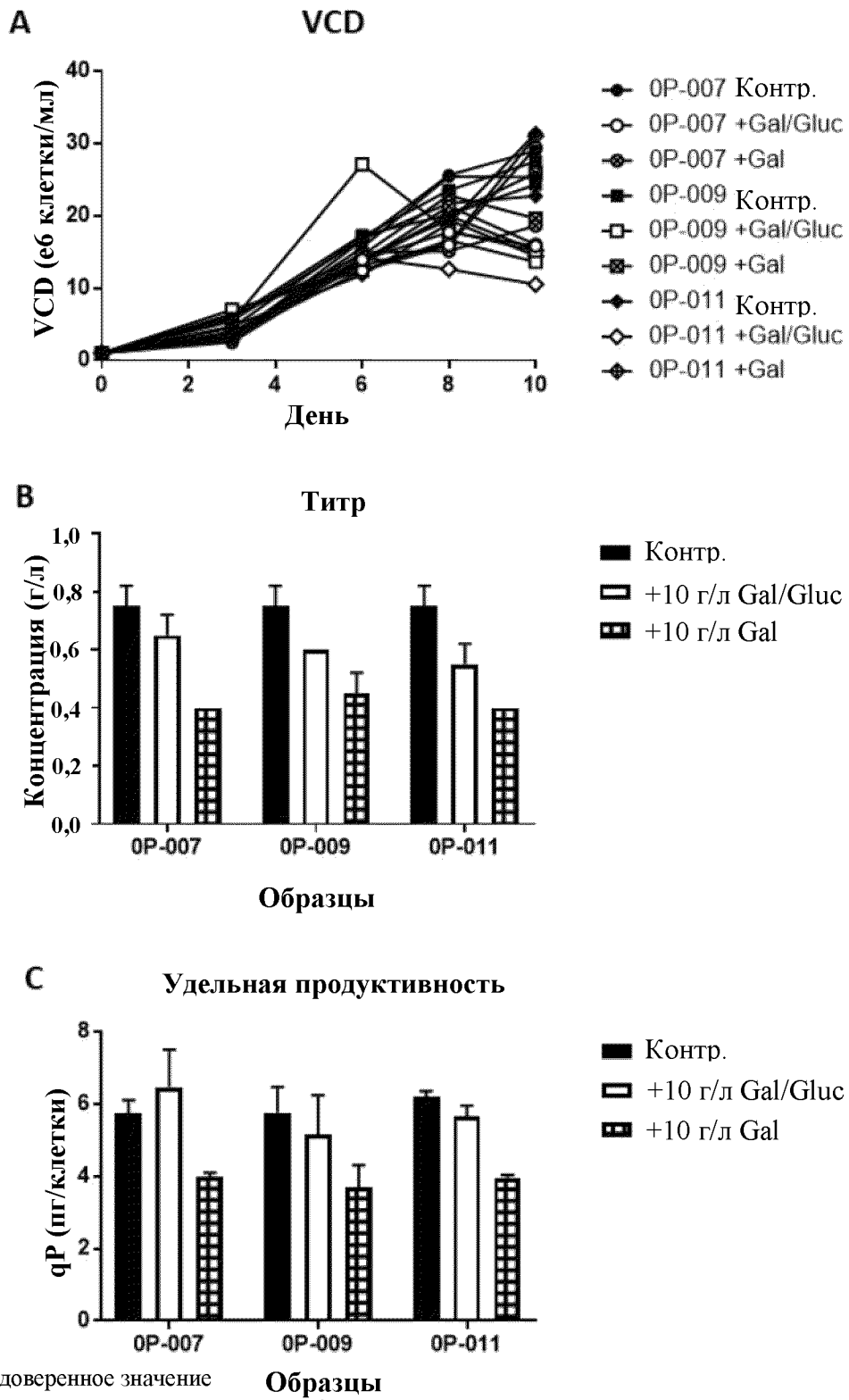
Фиг. 9В



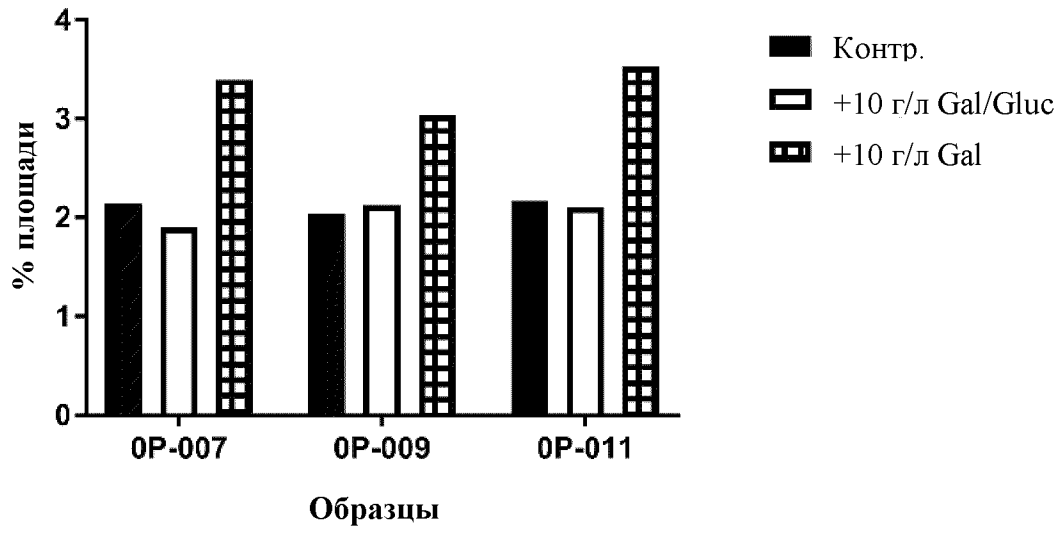
Фиг. 9С



Фиг. 10А-10С



Фиг. 11



Фиг. 12

