

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290991 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.05

(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.28

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ

(31) 62/906,709

(32) 2019.09.26

(33) US

(86) PCT/US2020/053090

(87) WO 2021/062372 2021.04.01

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Дафф Роберт Дж., Хуан Чжэ, Рамирес
Хосе Г. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе предусмотрены способы определения качества продукта для композиции на основе антитела, где уровень ADCC-активности композиции на основе антитела представляет собой критерий, на котором основано качество продукта для композиции на основе антитела. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает (i) определение содержания общих афукозилированных (TAF) гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) определение качества продукта как приемлемого и/или достигающего критерия уровня ADCC-активности, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона. В данном документе дополнительно предусмотрены связанные способы отслеживания качества продукта и способы получения композиции на основе антитела.

202290991

A1

A1

202290991

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573273EA/022

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с §119(е) статьи 35 свода законов США на основании предварительной заявки на патент США № 62/906709, поданной 26 сентября 2019 года; полное раскрытие которой включено посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки во всей своей полноте, подается одновременно с настоящей заявкой и обозначен следующим образом: файл в формате ASCII (текстовый) размером 26660 байт под названием " A-2451-WO-PCST_SeqList_ST25.txt"; созданный 24 сентября 2020 года.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Гликозилирование представляет собой одну из наиболее распространенных, но важных посттрансляционных модификаций, так как оно играет роль во многих клеточных функциях, включая, например, фолдинг белков, контроль качества, молекулярный транспорт и сортировку, а также взаимодействие рецепторов на клеточной поверхности. Гликозилирование оказывает влияние на терапевтическую эффективность лекарственных средств на основе рекомбинантных белков, поскольку оно влияет на биоактивность, фармакокинетику, иммуногенность, растворимость и клиренс in vivo терапевтического гликопротеина. Профили Fc-гликоформ, в частности, являются важными атрибутами качества продукта в случае рекомбинантных антител, поскольку они непосредственно влияют на клиническую эффективность и фармакокинетику антител.

[0004] Конкретные структуры гликанов, связанные с консервативным биантенарным гликаном в домене Fc-CH₂, могут значительно влиять на взаимодействие с FcγR, что опосредует эффекторные функции антитела, например антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) (см. Reusch D, Tejada ML. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* 2015; 25:1325-34). Например, было показано, что наличие фукозы при остове оказывает весьма значительное влияние на аффинность связывания FcγRIIIa, что ведет к существенным изменениям ADCC-активности (см. Okazaki A, et al. Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcγgammaRIIIa. *Journal of molecular biology* 2004; 336:1239-49; Ferrara C, et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγgammaRIII and antibodies lacking core fucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108:12669-74). Также было показано, что высокие уровни маннозы играют роль в модулировании ADCC-активности, однако в намного более умеренной и менее

предсказуемой степени, чем фукоза у остова (Thomann M, et al. Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies. *Molecular immunology* 2016; 73:69-75).

[0005] Различные факторы оказывают влияние на структуру гликанов и, следовательно, на конечную гликозилированную форму (гликоформу) белка (гликопротеина). Например, линия клеток, экспрессирующая антитело, среда для культивирования клеток, состав среды для подпитки и график подпиток во время культивирования клеток способны оказывать влияние на получение гликоформ белка. Хотя исследовательскими группами было предложено множество путей влияния на уровни конкретных гликоформ антитела, в биофармацевтической промышленности все еще существует потребность в простых и эффективных способах прогнозирования уровня эффекторной функции конкретной композиции на основе антитела, которую она будет демонстрировать исходя из заданного профиля гликоформ для данной композиции на основе антитела. Более того, в уровне техники существует потребность в способах определения уровней конкретных гликанов, например афукозилированных гликанов, гликанов с высоким содержанием маннозы, которые будут достигать эффекторной функции требуемого уровня.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Настоящее изобретение предусматривает способы определения качества продукта для композиции на основе антитела, где уровень ADCC-активности композиции на основе антитела представляет собой критерий, на котором основано качество продукта для композиции на основе антитела. В различных аспектах с помощью способа определяют качество продукта с точки зрения критерия уровня ADCC-активности. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает (i) определение содержания общих афукозилированных (TAF) гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) определение качества продукта как приемлемого и/или достигающего критерия уровня ADCC-активности, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона. В иллюстративных аспектах целевой диапазон содержания TAF-гликанов основан на (1) целевом диапазоне уровней ADCC-активности для эталонного антитела и (2) первой модели, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием TAF-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах ADCC, прогнозируемая с помощью первой модели, составляет от приблизительно 95% до приблизительно 105% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели, где вторая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием НМ-гликанов в композиции на основе антитела и содержанием АГ-гликанов в композиции на основе антитела. Используемый в данном документе термин "прогнозируемый" в контексте уровня(-ей) ADCC-активности относится к рассчитанному уровню ADCC-активности, где уровень ADCC-активности рассчитывают в соответствии с моделью, например первой моделью, второй моделью. В качестве преимущества ADCC,

прогнозируемая с помощью первой модели, является статистически в значительной степени схожей с ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели. Например, уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет от приблизительно 95% до приблизительно 105% от уровня ADCC-активности, прогнозируемого с помощью второй модели. Необязательно уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, приблизительно 100%, приблизительно 101%, приблизительно 102%, приблизительно 103%, приблизительно 104% или приблизительно 105% от уровня ADCC-активности, прогнозируемого с помощью второй модели. Уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет, в различных случаях, приблизительно 100% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели. В определенных аспектах между ADCC, прогнозируемой с помощью первой модели, и ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели, наблюдается соответствие один-к-одному. В различных случаях первая модель и/или вторая модель является/являются статистически значимой(-ыми). Например, p -значение для первой модели составляет менее чем 0,0001 и/или p -значение для второй модели составляет менее чем 0,0001. Необязательно каждая из первой модели и второй модели имеет p -значение, которое составляет менее чем 0,0001. В иллюстративных аспектах уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 12Q * \%TAF$, где Q представляет собой число сайтов связывания с антителом на антигене, с которыми связывается антитело, и $\%TAF$ представляет собой содержание TAF-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m до n , где m равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/12Q]$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне для эталонного антитела, и n равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/12Q]$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне для эталонного антитела. В различных случаях Q равняется 2. В различных случаях уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 24 * \%TAF$. В различных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m до n , где m равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/24]$, и n равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/24]$. В различных случаях уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью второй модели, составляет $\sim 27 * \%HM + \sim 22 * \%AF$, где $\%AF$ представляет собой содержание AF-гликанов в композиции на основе антитела, и $\%HM$ представляет собой содержание HM-гликанов в композиции на основе антитела. В различных случаях Q равняется 1. В различных аспектах уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 12 * \%TAF$. В различных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m до n , где m равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/12]$, и n равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/12]$. В различных случаях уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью второй модели, составляет $\sim 14,8 * \%HM + \sim 12,8 * \%AF$. В данном документе описаны подходящие альтернативные первые

модели и вторые модели. В иллюстративных случаях первая модель представляет собой любую из моделей (например, уравнений), описанных в данном документе, которые демонстрируют корреляцию ADCC с содержанием TAF-гликанов, включая без ограничения уравнения 1, 3, 5 и 7, а также уравнение А. В иллюстративных случаях вторая модель представляет собой любую из моделей (например, уравнений), описанных в данном документе, которые демонстрируют корреляцию ADCC с содержанием НМ-гликанов и содержанием АF-гликанов, включая без ограничения уравнения 2, 4, 6 и 8, а также уравнение В. Например, в различных аспектах целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m° до n° , где m° определяется как $[(ADCC_{\text{мин.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n° определяется как $[(ADCC_{\text{макс.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x составляет от приблизительно 20,4 до приблизительно 27,7, и y составляет от приблизительно -11,4 до приблизительно 16,7. В качестве альтернативы x составляет от приблизительно 9,7 до приблизительно 15,2, и y составляет от приблизительно -15,6 до приблизительно 34,2. В различных аспектах целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m' до n' , где m' равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/x']$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n' равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/x']$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x' составляет от приблизительно 24,1 до приблизительно 25,4. В качестве альтернативы x' составляет от приблизительно 13,0 до приблизительно 13,95. В различных случаях уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $13,5\% \pm 0,5\%$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только один сайт связывания с антителом. В различных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $24,74\% \pm 0,625\%$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только два сайта связывания с антителом. В иллюстративных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $12\% \pm 1,5\% * Q$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, Q представляет собой число сайтов связывания с антителом, присутствующих на антигене. В иллюстративных случаях эталонное антитело представляет собой инфликсимаб. В иллюстративных аспектах эталонное антитело представляет собой ритуксимаб. В иллюстративных аспектах способ представляет собой анализ в рамках контроля качества (QC). В иллюстративных аспектах способ представляет собой анализ в рамках внутрипроизводственного QC. В различных аспектах образец представляет собой образец материала, полученного в процессе производства. В различных случаях содержание TAF-гликанов определяют до сбора или после сбора. В иллюстративных случаях содержание TAF-гликанов определяют после

стадии хроматографии. Стадия хроматографии необязательно предусматривает осуществление хроматографии на основе захвата, промежуточной хроматографии и/или хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку. В некоторых аспектах содержание TAF-гликанов определяют после инактивации и нейтрализации вирусов, фильтрации для удаления вирусов или замены буфера. Способ в различных случаях представляет собой анализ при выпуске партий. В некоторых аспектах образец представляет собой образец из производственной партии. В различных аспектах способ дополнительно включает осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона. Если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то одно или более условий культивирования клеток подвергают модификации с получением модифицированной культуры клеток, в различных аспектах. В некоторых аспектах способ дополнительно включает определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела, полученной после того, как одно или более условий культивирования клеток были модифицированы. В различных аспектах, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то способ дополнительно включает (iii) модифицирование одного или более условий культивирования клеток с получением модифицированной культуры клеток и (iv) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела, полученной из модифицированной культуры клеток. В иллюстративных аспектах, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то способ дополнительно включает осуществление стадий (iii) и (iv) до тех пор, пока содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (iv), не будет находиться в пределах целевого диапазона. В иллюстративных случаях анализ, посредством которого непосредственно измеряют значение ADCC-активности композиции на основе антитела, выполняют в отношении композиции на основе антитела только в случае, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, например находится за пределами целевого диапазона. Анализы, посредством которых непосредственно измеряют значение ADCC-активности, включают, например, клеточный анализ, посредством которого измеряют высвобождение выявляемого реагента после лизиса экспрессирующих антиген клеток, содержащих выявляемое средство, с помощью эффекторных клеток, которые связаны с антителом, связывающимся как с клетками, экспрессирующими антиген, так и с эффекторными клетками. В иллюстративных случаях анализ, посредством которого непосредственно измеряют значение ADCC-активности композиции на основе антитела, не выполняют в отношении композиции на основе антитела. В различных аспектах определение содержания TAF-гликанов представляет собой единственную стадию, требуемую для определения качества продукта с точки зрения критерия уровня ADCC-активности. Не ограничиваясь теорией, статистические значимые корреляции первой модели и второй модели позволяют с помощью содержания

ТАФ-гликанов показывать уровень ADCC-активности таким образом, чтобы анализы, посредством которых непосредственно измеряют уровень ADCC-активности, не требуются. Соответственно, непосредственное измерение уровня ADCC-активности композиции на основе антитела не требуется и, таким образом, не выполняется в различных аспектах способов, раскрытых в данном документе.

[0007] Настоящее изобретение также предусматривает способы отслеживания качества продукта для композиции на основе антитела, где уровень ADCC-активности композиции на основе антитела представляет собой критерий, на котором основано качество продукта для композиции на основе антитела. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение качества продукта для композиции на основе антитела в соответствии со способом по настоящему изобретению, при этом первый образец получают в первый момент времени и второй образец получают во второй момент времени, который отличается от первого момента времени. В различных случаях каждый из первого образца и второго образца представляет собой образец материала, полученного в процессе производства. В различных аспектах первый образец представляет собой образец материала, полученного в процессе производства, и второй образец представляет собой образец из производственной партии. Необязательно первый образец представляет собой образец, полученный до того, как одно или более условий культивирования клеток были модифицированы, и второй образец представляет собой образец, полученный после того, как одно или более условий культивирования клеток были модифицированы. В иллюстративных случаях содержание ТАФ-гликанов определяют для каждого из первого образца и второго образца. Качество продукта для композиции на основе антитела зависит от того, находится ли содержание ТАФ-гликанов в пределах целевого диапазона. В иллюстративных аспектах целевой диапазон содержания ТАФ-гликанов основан на (1) целевом диапазоне уровней ADCC-активности для эталонного антитела и (2) первой модели, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием ТАФ-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах ADCC, прогнозируемая с помощью первой модели, составляет от приблизительно 95% до приблизительно 105% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели, где вторая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием НМ-гликанов в композиции на основе антитела и содержанием АФ-гликанов в композиции на основе антитела.

[0008] Настоящее изобретение предусматривает способы получения композиции на основе антитела. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение качества продукта для композиции на основе антитела, где качество продукта для композиции на основе антитела определяют в соответствии со способом по настоящему изобретению. Необязательно способ включает определение содержания ТАФ-гликанов в образце композиции на основе антитела, и образец представляет собой образец материала, полученного в процессе производства. В различных случаях способ включает

определение качества продукта для композиции на основе антитела как приемлемого и/или достигающего критерия уровня ADCC-активности, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона, как определено в данном документе. В иллюстративных аспектах целевой диапазон содержания TAF-гликанов основан на (1) целевом диапазоне уровней ADCC-активности для эталонного антитела и (2) первой модели, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием TAF-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах ADCC, прогнозируемая с помощью первой модели, составляет от приблизительно 95% до приблизительно 105% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели, где вторая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием НМ-гликанов в композиции на основе антитела и содержанием АF-гликанов в композиции на основе антитела. В различных аспектах, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то способ дополнительно включает (iii) модифицирование одного или более условий культивирования клеток с получением модифицированной культуры клеток и (iv) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела, полученной из модифицированной культуры клеток, необязательно повторение стадий (iii) и (iv) до тех пор, пока содержание TAF-гликанов не будет находиться в пределах целевого диапазона. В различных случаях образец представляет собой образец культуры клеток, содержащий клетки, экспрессирующие антитело из композиции на основе антитела. В различных случаях одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания TAF-гликанов. В различных аспектах содержание TAF-гликанов в композиции на основе антитела достигается посредством модифицирования содержания АF-гликанов. В иллюстративных аспектах одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания АF-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах с помощью одного или более условий преимущественно модифицируют содержание АF-гликанов. В различных случаях с помощью одного или более условий модифицируют содержание АF-гликанов и не модифицируют содержание НМ-гликанов. В иллюстративных аспектах способ включает достижение содержания TAF-гликанов в композиции на основе антитела посредством модифицирования содержания НМ-гликанов. Необязательно одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания НМ-гликанов в композиции на основе антитела. В некоторых случаях с помощью одного или более условий преимущественно модифицируют содержание НМ-гликанов. В некоторых аспектах с помощью одного или более условий модифицируют содержание НМ-гликанов и не модифицируют содержание АF-гликанов. В различных случаях способ включает повторение модифицирования содержания афукозилированных (AF) гликанов и/или повторение модифицирования содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) до тех пор, пока содержание TAF-гликанов не будет находиться в пределах целевого

диапазона.

[0009] В иллюстративных вариантах осуществления способ получения композиции на основе антитела включает (i) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки исходя из содержания TAF-гликанов, определенного на стадии (i). В различных аспектах образец получают из культуры клеток, содержащей клетки, экспрессирующие антитело из композиции на основе антитела. В различных случаях способ дополнительно включает модифицирование содержания TAF-гликанов в композиции на основе антитела и определение модифицированного содержания TAF-гликанов. Необязательно одно или более условий культивирования клеток модифицируют с целью модификации содержания TAF-гликанов. В иллюстративных аспектах способ включает повторение модифицирования до тех пор, пока содержание TAF-гликанов не будет находиться в пределах целевого диапазона. В иллюстративных случаях целевой диапазон основан на целевом диапазоне уровня ADCC-активности для антитела. Не ограничиваясь теорией, содержание TAF-гликанов коррелирует с уровнем ADCC-активности композиции на основе антитела таким образом, что уровень ADCC-активности композиции на основе антитела можно прогнозировать исходя из содержания TAF-гликанов в композиции на основе антитела. Уровень ADCC-активности композиции на основе антитела может представлять собой критерий, который следует учитывать при принятии решения о том, должна ли композиция на основе антитела быть выбрана для последующей обработки. Таким образом, в различных аспектах способ включает (i) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела; (ii) определение уровня ADCC-активности композиции на основе антитела исходя из содержания TAF-гликанов, определенного на стадии (i), и необязательно (iii) осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если уровень ADCC композиции на основе антитела, определенный на стадии (ii), находится в пределах целевого диапазона для уровня ADCC-активности. В различных аспектах целевой диапазон для уровня ADCC-активности является известным для антитела из композиции на основе антитела. В различных аспектах антитело из композиции на основе антитела представляет собой биоаналог эталонного антитела. В различных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов основан или определен (например, рассчитан) исходя из целевого диапазона для уровня ADCC-активности, который является известным. Соответственно, в иллюстративных аспектах способ включает (i) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона. Если способ дополнительно включает модифицирование содержания TAF-гликанов в композиции на основе антитела, то в различных случаях способ включает модифицирование содержания афукозилированных (AF) гликанов для модификации содержания TAF-гликанов.

Необязательно одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания АF-гликанов в композиции на основе антитела, что в свою очередь модифицирует содержание ТAF-гликанов. В качестве альтернативы или дополнения, если способ дополнительно включает модифицирование содержания ТAF-гликанов в композиции на основе антитела, то в различных случаях способ включает модифицирование содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) для модификации содержания ТAF-гликанов. Необязательно одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания НF-гликанов в композиции на основе антитела, что в свою очередь модифицирует содержание ТAF-гликанов. В иллюстративных аспектах с помощью одного или более условий преимущественно модифицируют содержание АF-гликанов. В иллюстративных случаях с помощью одного или более условий преимущественно модифицируют содержание НМ-гликанов. В иллюстративных аспектах с помощью одного или более условий модифицируют содержание АF-гликанов, а не содержание НМ-гликанов. В иллюстративных случаях с помощью одного или более условий модифицируют содержание НМ-гликанов, а не содержание АF-гликанов. Способ необязательно включает повторение модифицирования содержания афукозилированных (AF) гликанов и/или повторение модифицирования содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) до тех пор, пока содержание ТAF-гликанов не будет находиться в пределах целевого диапазона. В иллюстративных аспектах антитело из композиции на основе антитела представляет собой IgG, необязательно IgG₁. В различных аспектах целевой диапазон для содержания ТAF-гликанов составляет от m до n, где m равняется $[(ADCC_{\text{мин.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n равняется $[(ADCC_{\text{макс.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x составляет от приблизительно 20,4 до приблизительно 27,7, и y составляет от приблизительно -11,4 до приблизительно 16,7. В качестве альтернативы x составляет от приблизительно 9,7 до приблизительно 15,2, и y составляет от приблизительно -15,6 до приблизительно 34,2. В различных аспектах целевой диапазон для содержания ТAF-гликанов составляет от m' до n', где m' равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/x']$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n' равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/x']$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x' составляет от приблизительно 24,1 до приблизительно 25,4. В качестве альтернативы x' составляет от приблизительно 13,0 до приблизительно 13,95. В различных случаях уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $13,5\% \pm 0,5\%$ для каждого 1% ТAF, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только один сайт связывания с антителом. В различных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $24,74\% \pm 0,625\%$ для каждого

1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только два сайта связывания с антителом. В иллюстративных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $12\% \pm 1,5\% * Q$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, Q представляет собой число сайтов связывания с антителом, присутствующих на антигене. В иллюстративных случаях Q равняется 1, и необязательно антитело представляет собой инфликсимаб или его биоаналог. Необязательно Q равняется 2, и необязательно антитело представляет собой ритуксимаб или его биоаналог.

[0010] В иллюстративных вариантах осуществления способ получения композиции на основе антитела включает (i) определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела; (ii) расчет % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела исходя из % TAF с применением уравнения A:

$$Y = 2,6 + 24,1 * X$$

[уравнение A],

где Y представляет собой % ADCC, и X представляет собой % TAF-гликанов, определенный на стадии (i),

[0011] и (iii) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если Y находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

[0012] Настоящее изобретение также предусматривает способ получения композиции на основе антитела, где способ включает (i) определение % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела; (ii) расчет % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела исходя из % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов с применением уравнения B:

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение B],

где Y представляет собой % ADCC, HM представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, определенный на стадии (i), и AF представляет собой % афукозилированных гликанов, определенный на стадии (i),

[0013] и (iii) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если Y находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

[0014] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы получения композиции на основе антитела с целевым % ADCC. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает (i) расчет целевого % общих афукозилированных (TAF) гликанов для целевого % ADCC с применением уравнения A:

$$Y = 2,6 + 24,1 * X$$

[уравнение A],

где **Y** представляет собой целевой % ADCC, и **X** представляет собой целевой % TAF-гликанов,

[0015] и (ii) поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре клеток с получением композиции на основе антитела с целевым % TAF-гликанов, **X**.

[0016] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы получения композиции на основе антитела с целевым % ADCC, где способ включает (i) расчет целевого % афукозилированных гликанов и целевого % гликанов с высоким содержанием маннозы для целевого % ADCC с применением уравнения B:

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение B],

где **Y** представляет собой целевой % ADCC, **HM** представляет собой целевой % гликанов с высоким содержанием маннозы и **AF** представляет собой целевой % афукозилированных гликанов,

и (ii) поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре клеток с получением композиции на основе антитела с целевым % гликанов с высоким содержанием маннозы и целевым % афукозилированных гликанов.

[0017] В иллюстративных аспектах способов, раскрытых в данном документе, целевой % ADCC находится в пределах целевого диапазона для % ADCC. Необязательно целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от более чем или приблизительно 40 до менее чем или приблизительно 170. В различных аспектах целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от более чем или приблизительно 44 до менее чем или приблизительно 165. В различных случаях целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от более чем или приблизительно 60 до менее чем или приблизительно 130. В иллюстративных аспектах целевой диапазон для % ADCC представляет собой $Y \pm 20$, например $Y \pm 17$ или $Y \pm 18$.

[0018] Дополнительно предусмотрены способы получения композиции на основе антитела с % ADCC, **Y**, который необязательно составляет более чем или приблизительно 40 и менее чем или приблизительно 170, при этом указанный способ включает (i) определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов, **X**, в композиции на основе антитела и (ii) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **X** является эквивалентным $(Y - 2,6)/24,1$. В иллюстративных аспектах **X** составляет более чем или приблизительно 1,55% и менее чем или приблизительно 6,95%. В различных аспектах **Y** составляет более чем или приблизительно 44% и менее чем или приблизительно 165%, и необязательно при этом **X** составляет от приблизительно 1,72% до приблизительно 6,74%.

[0019] Настоящее изобретение предусматривает способ получения композиции на основе антитела с % ADCC, **Y**, при этом указанный способ включает (i) определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов, **X**, в композиции на основе антитела, и (ii)

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **X** является эквивалентным $(Y-2,6)/24,1$, где необязательно **X** составляет более чем или приблизительно **X**-0,4 и менее чем или приблизительно **X**+0,4, и где % ADCC составляет более чем приблизительно **Y** - 17 и менее чем или приблизительно **Y**+17. Также предусмотрен способ получения композиции на основе антитела с % ADCC, при этом указанный способ включает (i) определение % афукозилированных гликанов и % гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела и (ii) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **AF** и **HM** связаны с **Y** в соответствии с уравнением В,

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение В],

где **Y** представляет собой % ADCC, **HM** представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, определенный на стадии (i), и **AF** представляет собой содержание афукозилированных гликанов, определенное на стадии (i). В иллюстративных аспектах **Y** составляет более чем или приблизительно 40 и менее чем или приблизительно 175, необязательно от приблизительно 41 до приблизительно 171, где **AF** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4, и где **HM** составляет от приблизительно 40 до приблизительно 175. Необязательно, **Y** составляет от приблизительно 30 до приблизительно 185, необязательно, от приблизительно 32 до приблизительно 180, где **HM** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4, и где **AF** составляет от приблизительно 30 до приблизительно 185. В иллюстративных случаях % ADCC композиции на основе антитела находится в пределах диапазона, определяемого с помощью **Y**. Необязательно, % ADCC композиции на основе антитела находится в пределах диапазона $Y \pm 18$. В иллюстративных аспектах **AF** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4. Необязательно, % гликанов с высоким содержанием маннозы представляет собой значение в пределах диапазона, определяемого с помощью **HM**, где необязательно диапазон представляет собой $HM \pm 1$. В различных случаях **HM** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4. Необязательно, % афукозилированных гликанов представляет собой значение в пределах диапазона, определяемого с помощью **AF**, где необязательно диапазон представляет собой $AF \pm 1$.

[0020] В иллюстративных вариантах осуществления раскрытые в данном документе способы получения композиции на основе антитела включают модифицирование содержания общих афукозилированных (ТАФ) гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью клеток в культуре клеток. В различных случаях одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания ТАФ-гликанов. В различных аспектах способ включает определение модифицированного содержания ТАФ-гликанов. Необязательно, модифицирование повторяют до тех пор, пока определенное содержание ТАФ-гликанов не будет находиться в пределах целевого диапазона для ТАФ. Не ограничиваясь какой-либо

конкретной теорией, содержание TAF-гликанов можно модифицировать посредством изменения содержания афукозилированных (AF) гликанов или содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) или их комбинации, поскольку каждое из них влияет на содержание TAF-гликанов. Соответственно, способы преимущественно обеспечивают возможность для множества путей достижения целевого диапазона содержания TAF-гликанов. Например, одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания AF-гликанов с целью модификации содержания TAF-гликанов. В качестве альтернативы одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания НМ-гликанов с целью модификации содержания TAF-гликанов. В различных случаях одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания AF-гликанов и содержания НМ-гликанов с целью модификации содержания TAF-гликанов. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы модифицирования содержания общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью клеток в культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает модифицирование содержания AF-гликанов. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает модифицирование содержания НМ-гликанов. В различных аспектах способ включает (i) определение содержания афукозилированных (AF) гликанов и содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) в образце композиции на основе антитела; (ii) определение целевого диапазона для содержания AF-гликанов исходя из целевого диапазона для уровня ADCC-активности антитела из композиции на основе антитела, при условии, что содержание НМ-гликанов является постоянным; и (iii) осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если содержание AF-гликанов находится в пределах целевого диапазона для содержания AF-гликанов. В различных случаях способ включает (i) определение содержания афукозилированных (AF) гликанов и содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) в образце композиции на основе антитела; (ii) определение целевого диапазона для содержания НМ-гликанов исходя из целевого диапазона для уровня ADCC-активности антитела из композиции на основе антитела, при условии, что содержание AF-гликанов является постоянным; и (iii) осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если содержание НМ-гликанов находится в пределах целевого диапазона для содержания AF-гликанов. В различных случаях способ включает (i) определение содержания AF-гликанов и содержания НМ-гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) определение целевого диапазона для содержания AF-гликанов исходя из содержания НМ-гликанов, определенного на стадии (i), и (iii) модифицирование содержания AF-гликанов до тех пор, пока оно не будет находиться в пределах целевого диапазона для содержания AF-гликанов, при этом содержание НМ-гликанов является немодифицированным. В качестве альтернативы способ включает (i) определение содержания AF-гликанов и содержания НМ-гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) определение целевого

диапазона для содержания НМ-гликанов исходя из содержания АF-гликанов, определенного на стадии (i), и (iii) модифицирование содержания НМ-гликанов до тех пор, пока оно не будет находиться в пределах целевого диапазона для содержания НМ-гликанов, при этом содержание АF-гликанов является немодифицированным. В иллюстративных аспектах модель, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием TAF-гликанов в композиции на основе антитела, прогнозирует по сути такой же уровень ADCC-активности, как и прогнозируемый моделью, которая демонстрирует корреляцию ADCC с содержанием НМ- и АF-гликанов.

[0021] В различных аспектах раскрытых в данном документе способов % TAF-гликанов определяют посредством расчета суммы % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов. В различных случаях % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов определяют посредством хроматографии гидрофильных взаимодействий. Необязательно % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов определяют посредством способа, описанного в примере 1. В различных аспектах % ADCC определяют посредством количественного клеточного анализа, с помощью которого измеряют способность антител из композиции на основе антитела дозозависимым образом опосредовать клеточную цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих антиген для антител и вовлекающих рецепторы Fc-гамма RIIIa на эффекторных клетках посредством Fc-домена антител. В различных случаях % ADCC определяют посредством анализа, описанного в примере 2. В иллюстративных аспектах стадию определения осуществляют после стадии сбора. Необязательно, стадию определения осуществляют после стадии хроматографии. В различных аспектах стадия хроматографии представляет собой стадию хроматографии с использованием белка А. В различных случаях раскрытых в данном документе способов одна или более последующих стадий обработки включают стадию разбавления, стадию заполнения, стадию фильтрации, стадию составления, стадию с применением хроматографии, стадию фильтрации для удаления вирусов, стадию инактивации вирусов или их комбинацию. Необязательно, стадия с применением хроматографии представляет собой стадию с применением ионообменной хроматографии, необязательно, стадию с применением катионообменной хроматографии или стадию с применением анионообменной хроматографии.

[0022] В различных аспектах настоящего изобретения каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой IgG, необязательно каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой IgG₁. В иллюстративных случаях каждое антитело из композиции на основе антитела связывается с опухолеассоциированным антигеном. В иллюстративных аспектах опухолеассоциированный антиген содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3. В иллюстративных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой антитело к CD20. В различных случаях каждое антитело из

композиции на основе антитела содержит: (i) CDR1 легкой цепи (LC), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4 с 1 или 2 аминокислотными заменами, (ii) CDR2 LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 5, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5 с 1 или 2 аминокислотными заменами, (iii) CDR3 LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 6, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6 с 1 или 2 аминокислотными заменами, (iv) CDR1 тяжелой цепи (HC), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 7, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7 с 1 или 2 аминокислотными заменами; (v) CDR2 HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 8, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8 с 1 или 2 аминокислотными заменами; и/или (vi) CDR3 HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 9, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9 с 1 или 2 аминокислотными заменами.

[0023] В иллюстративных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела содержит вариабельный участок LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 10, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 с 1-10 аминокислотными заменами. Необязательно каждое антитело из композиции на основе антитела содержит вариабельный участок HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 11, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11 с 1-10 аминокислотными заменами. В иллюстративных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 12, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12 с 1-10 аминокислотными заменами. В иллюстративных случаях каждое антитело из композиции на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 13, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13 с 1-10

аминокислотными заменами.

[0024] В иллюстративных аспектах опухолеассоциированный антиген содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14. В иллюстративных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой антитело к TNF α , необязательно инфликсимаб или его биоаналог. В иллюстративных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела содержит переменный участок LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 15, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15 с 1-10 аминокислотными заменами. Необязательно каждое антитело из композиции на основе антитела содержит переменный участок HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 16, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16 с 1-10 аминокислотными заменами.

[0025] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % ADCC, при этом указанный способ включает (i) измерение % ADCC серии образцов, содержащих различные гликоформы антитела, (ii) определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов для каждого образца из серии, (iii) определение линейного уравнения для линии наилучшего соответствия графику, которая отображает для каждого образца из серии % ADCC, измеренный на стадии (i), в виде функции от % TAF-гликанов, определенного на стадии (ii), (iv) определение % TAF для композиции на основе антитела и затем расчет % ADCC с применением линейного уравнения из стадии (iii) и (v) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если % ADCC, рассчитанный на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

[0026] Предусмотрен способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для содержания TAF-гликанов, при этом указанный способ включает (i) измерение уровня ADCC-активности серии образцов, содержащих различные гликоформы антитела, (ii) определение содержания TAF-гликанов для каждого образца из серии, (iii) получение модели, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности с содержанием TAF-гликанов, (iv) определение уровня ADCC-активности композиции на основе антитела и затем расчет содержания TAF-гликанов с применением модели или определение содержания TAF-гликанов для композиции на основе антитела и расчет уровня ADCC-активности с применением модели и (v) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если содержание TAF-гликанов, рассчитанное на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для содержания TAF-гликанов или если уровень ADCC-активности, рассчитанный на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для уровня ADCC-активности.

[0027] Предусмотрен способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % TAF, при этом указанный способ включает (i) измерение % ADCC серии образцов, содержащих различные гликоформы антитела, (ii) определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов для каждого образца из серии, (iii) определение линейного уравнения для линии графика с наилучшим соответствием, которая отображает для каждого образца из серии % ADCC, измеренный на стадии (i), в виде функции от % TAF-гликанов, определенного на стадии (ii), (iv) определение линейного уравнения для линии графика с наилучшим соответствием, которая отображает для каждого образца из серии % ADCC, измеренный на стадии (i), в виде функции от % TAF-гликанов, определенного на стадии (ii), (v) определение % ADCC для композиции на основе антитела и затем расчет % TAF с применением линейного уравнения из стадии (iii) и (iv) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если % TAF, рассчитанный на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для % TAF. Также предусмотрен способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % TAF, при этом способ включает следующие стадии: (i) получение линейного уравнения для графика наилучшего соответствия посредством нанесения на график % ADCC и % TAF-гликанов серии из по меньшей мере 5 эталонных композиций на основе антител, полученных в условиях культуры клеток, при этом каждая эталонная композиция на основе антитела имеет такую же аминокислотную последовательность, как и композиция на основе антитела, (ii) осуществление выбора целевого диапазона для % TAF-гликанов на основании линейного уравнения, полученного на стадии (i), и требуемого % ADCC-активности; (iii) культивирование композиции на основе антитела в условиях культуры клеток; (iv) осуществление очистки композиции на основе антитела, (v) осуществление сбора образцов композиции на основе антитела для определения % TAF и (vi) определение, находится ли % TAF в композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % TAF из стадии (ii). В иллюстративных аспектах способ дополнительно включает осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если % TAF, рассчитанный на стадии (v), находится в пределах целевого диапазона для % TAF.

[0028] Также предусмотрен способ определения % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела, при этом указанный способ включает (i) определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела и (ii) расчет % ADCC композиции на основе антитела исходя из % TAF с применением уравнения A,

$$Y=2,6+24,1 * X$$

[уравнение A],

где Y представляет собой % ADCC, и X представляет собой % TAF-гликанов, определенный на стадии (i).

[0029] Кроме того, предусмотрен способ определения % антителозависимой

клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела, при этом указанный способ включает (i) определение % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела и (ii) расчет % ADCC композиции на основе антитела исходя из % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов с применением уравнения В:

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение В],

где **Y** представляет собой % ADCC, **HM** представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, определенный на стадии (i), и **AF** представляет собой % афукозилированных гликанов, определенный на стадии (i).

[0030] В иллюстративных случаях способы дополнительно включают осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **Y** находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0031] На фигуре 1А представлена иллюстрация трех типов N-гликанов (олигоманнозного, комплексного и гибридного) и обычно применяемых символов для обозначения таких сахаридов. На фигуре 1В представлена иллюстрация иллюстративных структур гликанов.

[0032] На фигуре 2А представлена репрезентативная хроматограмма с картой гликанов (вид в натуральную величину). На фигуре 2В представлена репрезентативная хроматограмма с картой гликанов (вид в увеличенном масштабе).

[0033] На фигуре 3 представлена схема анализа ADCC NK92, описанного в примере 2.

[0034] На фигуре 4 представлена репрезентативная кривая доза-ответ для анализа ADCC NK92. Каждая дозовая точка представляет собой среднее ± стандартное отклонение для 3 повторностей. Сигнал при анализе = флуоресценция.

[0035] На фигуре 5А представлен график, изображающий фактическую ADCC (%), построенный в виде функции от TAF (%). Показана линия наилучшего соответствия. На фигуре 5В представлена таблица статистических параметров для линии наилучшего соответствия, показанной на фигуре 5А. На фигуре 5С представлен график, изображающий фактическую ADCC (%) (определенную посредством анализа, описанного в примере 2), построенный в виде функции от прогнозируемой ADCC (%), рассчитанной с применением прогностического выражения в виде уравнения, показанного на фигуре 5В. На фигуре 5D представлен график, изображенный на фигуре 5А, с помощью которого показан 95% доверительный интервал (выделен серым цветом). На фигуре 5Е представлен график, с помощью которого показан 95% доверительный интервал как для пересечения по оси у, так и наклона для уравнения 1.

[0036] На фигуре 6А представлен график, изображающий фактическую ADCC (%), построенный в виде функции от HM (%). Показана линия наилучшего соответствия. На фигуре 6В представлен график, изображающий фактическую ADCC (%), построенный в

виде функции от AF (%). Показана линия наилучшего соответствия. На фигуре 6C представлена таблица статистических параметров для линии(-ий) наилучшего соответствия, показанной(-ых) на фигурах 6A и 6B. На фигуре 6D представлен график, изображающий фактическую ADCC (%) (определенную посредством анализа, описанного в примере 2), построенный в виде функции от прогнозируемой ADCC (%), рассчитанной с применением прогностического выражения в виде уравнения, показанного на фигуре 4C.

[0037] На фигуре 7A представлен график, изображающий фактическую ADCC (%), построенный в виде функции от уровня галактозилирования (%). Линия наилучшего соответствия показана с помощью красного цвета. На фигуре 7B представлен график, изображающий фактическую ADCC (%) (определенную посредством анализа, описанного в примере 2), построенный в виде функции от прогнозируемой ADCC (%), рассчитанной с применением прогностического выражения в виде уравнения, демонстрирующего корреляцию ADCC и уровня галактозилирования (не показан).

[0038] На фигуре 8A представлен график, изображающий фактическую ADCC (%), построенный в виде функции от TAF (%). Показана линия наилучшего соответствия. На фигуре 8B представлена таблица статистических параметров для линии наилучшего соответствия, показанной на фигуре 8A. На фигуре 8C представлен график, изображающий фактическую ADCC (%) (определенную посредством анализа, описанного в примере 2), построенный в виде функции от прогнозируемой ADCC (%), рассчитанной с применением прогностического выражения в виде уравнения, показанного на фигуре 8B. На фигуре 8D представлен график, изображенный на фигуре 8A, с помощью которого показан 95% доверительный интервал (выделен серым цветом). На фигуре 8E представлен график, с помощью которого показан 95% доверительный интервал как для пересечения по оси y, так и наклона для уравнения 3.

[0039] На фигуре 9A представлен график, изображающий фактическую ADCC (%), построенный в виде функции от HM (%). Показана линия наилучшего соответствия. На фигуре 9B представлен график, изображающий фактическую ADCC (%), построенный в виде функции от AF (%). Показана линия наилучшего соответствия. На фигуре 9C представлена таблица статистических параметров для линии(-ий) наилучшего соответствия, показанной(-ых) на фигурах 9A и 9B. На фигуре 9D представлен график, изображающий фактическую ADCC (%) (определенную посредством анализа, описанного в примере 2), построенный в виде функции от прогнозируемой ADCC (%), рассчитанной с применением прогностического выражения в виде уравнения, показанного на фигуре 9C.

[0040] На фигуре 10A и фигуре 10B представлены графики, демонстрирующие корреляцию прогнозов, параллельных оси y, модели ADCC-HM/AF с прогнозами, параллельными оси y, модели ADCC-TAF для антитела к CD20 (фигура 10A) и для антитела к TNF-альфа (фигура 10B).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0041] В данном документе впервые предусмотрены данные, демонстрирующие статистически значимую связь между уровнем ADCC композиции на основе антитела и

уровнем TAF-гликанов в данной композиции на основе антитела. Также в данном документе впервые предусмотрены данные, демонстрирующие статистически значимую связь между уровнем ADCC композиции на основе антитела и уровнем гликанов с высоким содержанием маннозы и афукозилированных гликанов в данной композиции на основе антитела. Как описано далее в данном документе, уравнение А и уравнение В демонстрируют связь % ADCC композиции на основе антитела с % TAF-гликанов (уравнение А) или с % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов (уравнение В) в композиции на основе антитела. Данные связи и уравнения и иное по настоящему изобретению являются применимыми в способах прогнозирования уровня ADCC композиции на основе антитела исходя из уровней гликанов. В различных аспектах прогнозируемый уровень ADCC служит в качестве маркера, посредством которого композицию на основе антитела идентифицируют как приемлемую с точки зрения соответствия терапевтическому пороговому критерию, и, таким образом, являющуюся той, которая подлежит применению в одной или более последующих стадиях обработки в процессе изготовления, или в качестве альтернативы композицию на основе антитела идентифицируют как неприемлемую, и она не подлежит переносу на следующую стадию в процессе изготовления. Связи и уравнения, раскрытые в данном документе, дополнительно являются применимыми в идентифицировании гликопрофиля требуемых композиций на основе антитела. С помощью связей и уравнений, представленных в данном документе, а также при заданном целевом уровне ADCC идентифицируют гликопрофиль (например, профиль TAF-гликанов, НМ-гликанов, афукозилированных гликанов) композиций на основе антитела с целевым уровнем ADCC. При наличии идентифицированного профиля TAF-гликанов, НМ-гликанов, афукозилированных гликанов в композициях на основе антитела с целевым уровнем ADCC можно осуществлять процессы изготовления, например стадии культивирования клеток, для целенаправленного воздействия на данный идентифицированный профиль.

[0042] Соответственно, настоящее изобретение предусматривает способы определения качества продукта для композиции на основе антитела, где по меньшей мере один из критериев приемлемости для композиции на основе антитела представляет собой уровень ADCC-активности. Также предусмотрены способы отслеживания качества продукта для композиции на основе антитела. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы получения композиции на основе антитела, например способы получения композиции на основе антитела с целевым % ADCC, способы получения композиции на основе антитела с % ADCC в пределах целевого диапазона для % ADCC или с идентифицированным % ADCC, а также в данном документе предусмотрены способы получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % TAF.

[0043] *Гликозилирование, гликаны и способы измерения уровня гликанов*

[0044] Многие секретируемые белки претерпевают посттрансляционное гликозилирование, процесс, посредством которого остатки сахаров (например, гликанов,

сахаридов) ковалентно присоединяются к конкретным аминокислотам белка. В эукариотических клетках встречаются два типа реакций гликозилирования: (1) Гликозилирование с образованием связи по N, при котором гликаны присоединяются к аспарагину последовательности распознавания Asn-X-Thr/Ser, где "X" представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, и (2) гликозилирование с образованием связи по O, при котором гликаны присоединяются к серину или треонину. Независимо от типа гликозилирования (с образованием связи по N или с образованием связи по O) микрогетерогенность гликоформ белков существует из-за большого диапазона структур гликанов, ассоциированных с каждым сайтом (O или N).

[0045] Все N-гликаны характеризуются общей последовательностью сахара остова: $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$) и относятся к одному из трех типов: (A) тип с высоким содержанием маннозы (HM) или олигоманнозы (OM), в котором N-гликан состоит из двух остатков N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и большого количества (например, 5, 6, 7, 8 или 9) остатков маннозы (Man), (B) комплексный тип, в котором N-гликан содержит более двух остатков GlcNAc и любое количество сахаров других типов, или (C) гибридный тип, в котором N-гликан содержит остаток Man на одной стороне ветви и GlcNAc в основании комплексной ветви. На фигуре 1A (взятой из главы 8 в Stanley et al.: *N-Glycans, Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009) показаны три типа N-гликанов.

[0046] N-связанные гликаны, как правило, содержат один или более моносахаридов галактозы (Gal), N-ацетилгалактозамина (GalNAc), галактозамина (GalN), глюкозы (Glc), N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), глюкозамина (GlcN), маннозы (Man), N-ацетилманнозамина (ManNAc), маннозамина (ManN), ксилозы (Xyl), N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac), N-гликолилнейраминовой кислоты (Neu5Gc), 2-кето-3-доксинононовой кислоты (Kdn), фукозы (Fuc), глюкуроновой кислоты (GLcA), идуроновой кислоты (IdoA), галактуроновой кислоты (Gal A), маннуроновой кислоты (Man A). Обычно применяемые символы для таких сахаридов показаны на фигуре 1A. Иллюстративные гликаны и их состав показаны на фигуре 1B.

[0047] Гликозилирование с образованием связи по N начинается в эндоплазматическом ретикулуме (ER), где сложная совокупность реакций приводит к присоединению структуры остова гликана, образованной главным образом из двух остатков GlcNAc и трех остатков Man. Гликановый комплекс, образованный в ER, модифицируется под действием ферментов в аппарате Гольджи. Если сахарид является относительно недоступным для ферментов, он, как правило, остается в исходной HM-форме. Если ферменты могут получать доступ к сахариду, то многие остатки Man отщепляются и сахарид дополнительно модифицируется, что приводит к образованию структуры N-гликанов комплексного типа. Например, маннозидаза-1, локализованная в цис-компарimente аппарата Гольджи, способна расщеплять или гидролизовать HM-гликан, тогда как фукозилтрансфераза FUT-8, локализованная в медиальном компарimente аппарата Гольджи, фукозилирует гликан (Hanrue Imai-Nishiya (2007), BMC

Biotechnology, 7:84).

[0048] Соответственно, сахаридный состав и структурная конфигурация структуры гликана варьируют в зависимости от системы гликозилирования в ER и аппарате Гольджи, доступности структуры гликана ферментам аппарата, порядка действия каждого фермента и стадии, на которой белок высвобождается из системы гликозилирования, среди других факторов.

[0049] Из уровня техники известны различные способы оценки гликанов, присутствующих в композиции, содержащей гликопротеины или определения, выявления или измерения профиля гликоформ (например, гликопрофиля) в конкретном образце, содержащем гликопротеины. Подходящие способы включают без ограничения MALDI-TOF-анализ в режиме фиксации положительных ионов, MALDI-TOF-анализ в режиме фиксации отрицательных ионов, слабую анионообменную (WAX) хроматографию, нормально-фазовую хроматографию (NP-HPLC), расщепление экзогликозидазами, хроматографию на Bio-Gel P-4, анионообменную хроматографию и одномерную ЯМР-спектроскопию и их комбинации. См., например, 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, страницы 124-133; Ruhaak L.R., Anal Bioanal Chem, 2010, Vol. 397:3457-3481 и Geoffrey, R. G. et. al. Analytical Biochemistry 1996, Vol. 240, страницы 210-226. Кроме того, в примере 1, изложенном в данном документе, описан подходящий способ оценки гликанов, присутствующих в композиции, содержащей гликопротеины, например в композиции на основе антитела. Способ в примере 1 описывает анализ, в котором гликаны, присоединенные к гликозилированным белкам в композиции, например антителам в композиции на основе антитела, ферментативно отщепляются от белка (например, антитела). Затем гликаны отделяют посредством жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC) и получают хроматограмму с несколькими пиками. Каждый пик на хроматограмме представляет собой среднее распределение (количество) отдельного гликана. Два изображения репрезентативной хроматограммы HILIC, содержащей пики для отдельных гликанов, представлены на фигурах 2А и 2В. Для этих целей, площадь пика в $\%$ = площадь пика/общая площадь пиков $\times$ 100%, и общая площадь пиков в $\%$ = общая площадь образца/общая площадь стандарта $\times$ 100%. Соответственно, уровень конкретного гликана (или группы гликанов) представляют в виде $\%$. Например, если композиция на основе антитела характеризуется как имеющая уровень Man6, составляющий 30%, это означает, что 30% всех гликанов, отщепленных от антител в композиции, представляют собой Man6.

[0050] Настоящее изобретение, включая связи и уравнения, представленные в данном документе, относится к общим афукозилированным гликанам, гликанам с высоким содержанием маннозы и афукозилированным гликанам в композиции на основе антитела. Используемые в данном документе термины "общие афукозилированные гликаны" или "ТАФ-гликаны" относятся к суммарному количеству гликанов с высоким

содержанием маннозы (НМ) и афукозилированных гликанов. Используемые в данном документе термины "гликаны с высоким содержанием маннозы" или "НМ-гликаны" охватывают гликаны, содержащие 5, 6, 7, 8 или 9 остатков маннозы, сокращенно обозначенных соответственно Man5, Man6, Man7, Man8 и Man9. Уровень НМ-гликанов в различных аспектах получают посредством суммирования % Man5, % Man6, % Man7, % Man8 и % Man9. Используемые в данном документе термины "афукозилированный гликан" или "АФ-гликан" относятся к гликоформам, в которых отсутствует фукоза при остове, например α 1,6-связанная фукоза при остатке GlcNAc, участвующем в образовании амидной связи с Asn в сайте N-гликозилирования. Афукозилированные гликаны включают без ограничения A1G0, A2G0, A2G1a, A2G1b, A2G2 и A1G1M5. Дополнительные афукозилированные гликаны включают, например, A1G1a, G0[H3N4], G0[H4N4], G0[H5N4], FO-N[H3N3]. См., например, Reusch and Tejada, *Glycobiology* 25(12): 1325-1334 (2015). Уровень афукозилированных гликанов в различных аспектах получают посредством суммирования % A1G0, % A2G0, % A2G1a, % A2G1b, % A2G2, % A1G1M5, % A1G1a, % G0[H3N4], % G0[H4N4], % G0[H5N4] и % FO-N[H3N3].

[0051] В иллюстративных аспектах уровень гликанов (например, содержание гликанов, необязательно выраженное в %, например % TAF-гликанов, % НМ-гликанов, % АФ-гликанов) определяют (например, измеряют) посредством любого из различных способов, известных из уровня техники, для оценки гликанов, присутствующих в композиции, содержащей гликопротеины, или для определения, выявления или измерения профиля гликоформ (например, гликопрофиля) в конкретном образце, содержащем гликопротеины. В иллюстративных случаях уровень гликанов (например, % TAF-гликанов, % НМ-гликанов, % АФ-гликанов) в композиции на основе антитела определяют посредством измерения уровня таких гликанов в образце композиции на основе антитела посредством способа на основе хроматографии, например HPLC, и уровень гликанов выражают в %, как описано в данном документе. См., например, пример 1. В иллюстративных случаях уровень гликанов в композиции на основе антитела выражают в виде % всех гликанов, отщепленных от антител в композиции. В различных аспектах % TAF-гликанов определяют посредством расчета суммы % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов, и % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов определяют посредством хроматографии гидрофильных взаимодействий, например посредством способа, описанного в примере 1. В различных аспектах уровень гликанов (например, % TAF-гликанов, % НМ-гликанов, % АФ-гликанов) определяют (например, измеряют) посредством измерения уровня таких гликанов в образце композиции на основе антитела. В иллюстративных случаях собирают по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 образцов композиции на основе антитела и определяют (например, измеряют) уровень гликанов (например, % TAF-гликанов, % НМ-гликанов, % АФ-гликанов) для каждого образца. В различных аспектах определяют средний или усредненный % TAF-гликанов, % НМ-гликанов и/или % АФ-

гликанов.

[0052] В иллюстративных аспектах уровень гликанов (например, % TAF-гликанов, % НМ-гликанов, % AF-гликанов) рассчитывают с применением уравнения А или уравнения В, как описано далее в данном документе.

[0053] ADCC

[0054] Настоящее изобретение, включая связи и уравнения, представленные в данном документе, показывает связь % общих афукозилированных гликанов или % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела и уровня ADCC-активности, например % ADCC, композиции на основе антитела.

[0055] Термин "ADCC", или "антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность", или "антителозависимая клеточная цитотоксичность" относится к механизму, посредством которого эффекторная клетка иммунной системы (например, натуральные клетки-киллеры (NK-клетки), макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы) активно осуществляет лизис целевой клетки, антигены на мембранной поверхности которой были связаны специфическими антителами. ADCC представляет собой часть адаптивного иммунного ответа и возникает, если антигенспецифические антитела связываются с (1) антигенами на мембранной поверхности целевой клетки с помощью антигенсвязывающих участков и (2) с Fc-рецепторами на поверхности эффекторных клеток посредством их Fc-участка. Связывание Fc-участка антитела с Fc-рецептором обуславливает высвобождение эффекторными клетками цитотоксических факторов, которые приводят к гибели целевой клетки (например, посредством лизиса клетки или клеточной дегрануляции).

[0056] Fc-рецепторы представляют собой рецепторы на поверхностях В-лимфоцитов, фолликулярных дендритных клеток, NK-клеток, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, тромбоцитов и тучных клеток, которые связываются с Fc-участком антитела. Fc рецепторы группируют в различные классы на основании типа антитела, которое они связывают. Например, рецептор Fc-гамма представляет собой рецептор для Fc-участка антитела IgG, рецептор Fc-альфа представляет собой рецептор для Fc-участка антитела IgA и рецептор Fc-эпсилон представляет собой рецептор для Fc-участка антитела IgE.

[0057] Термин "FcγR" или "рецептор Fc-гамма" представляет собой белок, принадлежащий к суперсемейству IgG, участвующий в индукции фагоцитоза опсонизированных клеток или микробов. См., например, Fridman WH. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. FASEB Journal. 5 (12): 2684-90 (1991). Представители семейства рецепторов Fc-гамма включают: FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIA (CD16a) и FcγRIIB (CD16b). Последовательности FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA и FcγRIIB можно найти во многих базах данных последовательностей, например в базе данных Uniprot (www.uniprot.org) под номерами доступа P12314 (FCGR1_HUMAN), P12318 (FCG2A_HUMAN), P31994 (FCG2B_HUMAN), P08637 (FCG3A_HUMAN) и P08637 (FCG3A_HUMAN) соответственно.

[0058] Термин "активность ADCC", или "уровень ADCC", или "уровень ADCC-активности" относится к степени, до которой активируется или стимулируется ADCC. Способы измерения или определения уровня ADCC композиции на основе антитела, включая коммерчески доступные анализы и наборы для измерения или определения уровня ADCC, хорошо известны из уровня техники, как описано в Yamashita et al., *Scientific Reports* 6: номер статьи 19772 (2016), doi:10.1038/srep19772); Kantakamalakul et al., "A novel EGFP-CEM-NKr flow cytometric method for measuring antibody dependent cell mediated-cytotoxicity (ADCC) activity in HIV-1 infected individuals", *J Immunol Methods* 315 (выпуски 1-2): 1-10; (2006); Gomez-Roman et al., "A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity", *J Immunol Methods* 308 (выпуски 1-2): 53-67 (2006); Schnueriger et al., "Development of a quantitative, cell-line based assay to measure ADCC activity mediated by therapeutic antibodies", *Molec Immunology* 38 (выпуски 12-13): 1512-1517 (2011); и Mata et al., "Effects of cryopreservation on effector cells for antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and natural killer (NK) cell activity in ^{51}Cr -release and CD107a assays", *J Immunol Methods* 406: 1-9 (2014); все из которых включены в данный документ посредством ссылки для всех целей. Термин "анализ ADCC" или "анализ репортерного гена FcyR" относится к анализу, набору или способу, применимым для определения ADCC-активности антитела. Иллюстративные способы измерения или определения ADCC-активности антитела в способах, описанных в данном документе, включают анализ ADCC, описанный в примере 2, или ADCC Reporter Assay, коммерчески доступный от Promega (№ по каталогу G7010 и G7018). В некоторых вариантах осуществления ADCC-активность измеряют или определяют с применением анализа высвобождения кальцеина, содержащего одно или более из следующего: клетки NK92(M1), экспрессирующие FcγRIIa (158V), в качестве эффекторных клеток и клетки HCC2218 или клетки WIL2-S в качестве целевых клеток, меченных кальцеином-AM.

[0059] В иллюстративных аспектах уровень ADCC композиции на основе антитела определяют посредством количественного клеточного анализа, с помощью которого измеряют способность антител из композиции на основе антитела дозозависимым образом опосредовать клеточную цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих антиген для антител и вовлекающих рецепторы Fc-гамма RIIa на эффекторных клетках посредством Fc-домена антител. В различных вариантах осуществления способ включает применение целевых клеток, несущих выявляемые метки, которые высвобождаются, если целевые клетки подвергаются лизису с помощью эффекторных клеток. Количество выявляемой метки, высвобождающееся из целевых клеток, представляет собой величину ADCC-активности композиции на основе антитела. Количество выявляемой метки, высвобождающееся из целевых клеток, в некоторых аспектах сравнивают с исходным уровнем. Кроме того, уровень ADCC можно представлять в виде % ADCC относительно % ADCC контроля. В различных аспектах % ADCC представляет собой относительный % ADCC, который необязательно является относительным применительно к % ADCC контроля. В различных аспектах % ADCC контроля представляет собой % ADCC

эталонного антитела. В различных аспектах эталонное антитело представляет собой ритуксимаб. В иллюстративных случаях % ADCC контроля находится в пределах диапазона от приблизительно 60% до приблизительно 130%. Необязательно % ADCC определяют посредством анализа, описанного в примере 2.

[0060] Настоящее изобретение показывает связь содержания TAF-гликанов, содержания НМ-гликанов и/или содержания AF-гликанов в композиции на основе антитела с уровнем ADCC-активности композиции на основе антитела. Как демонстрируется в данном документе, % TAF-гликанов, % НМ-гликанов и/или % AF-гликанов в композиции на основе антитела связаны с % ADCC-активности композиции на основе антитела. В различных аспектах на основании первой модели, которая демонстрирует корреляцию содержания TAF-гликанов с уровнем ADCC-активности, либо (а) уровень ADCC-активности рассчитывают исходя из содержания TAF-гликанов (например, содержание TAF-гликанов измеряют), либо (b) содержание TAF-гликанов рассчитывают исходя из уровня ADCC-активности (например, уровень ADCC-активности измеряют). В различных случаях целевой уровень ADCC-активности или целевой диапазон уровней ADCC-активности являются известными с учетом конкретного антитела из получаемой композиции на основе антитела. Например, антитело может представлять собой биоаналог эталонного антитела, и целевой уровень ADCC-активности или его диапазон для эталонного антитела являются известными. В иллюстративных аспектах целевое содержание TAF-гликанов или целевой диапазон для содержания TAF-гликанов могут быть рассчитаны на основании первой модели. В различных случаях первая модель представляет собой линейную регрессионную модель. В различных случаях первая модель представляет собой упрощенную версию линейной регрессионной модели без пересечения по оси y . В различных аспектах первая модель, которая демонстрирует корреляцию ADCC с содержанием TAF-гликанов, является статистически значимой, что демонстрируется ее низким p -значением. В различных аспектах p -значение составляет менее чем 0,0001.

[0061] В иллюстративных аспектах первая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела в виде приблизительно $13,5\% \pm 0,5\%$ для каждого 1% содержания TAF-гликанов, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только один сайт связывания с антителом. В различных аспектах первая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела в виде приблизительно $24,74\% \pm 0,625\%$ для каждого 1% содержания TAF-гликанов, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только два сайта связывания с антителом. В иллюстративных аспектах первая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела в виде приблизительно $12\% \pm 1,5\% * Q$ для каждого 1% содержания TAF-гликанов, присутствующего в композиции на основе антитела, где Q представляет собой

число сайтов связывания с антителом, присутствующих на антигене. В иллюстративных случаях Q равняется 1, и необязательно антитело представляет собой инфликсимаб или его биоаналог. Необязательно Q равняется 2, и необязательно антитело представляет собой ритуксимаб или его биоаналог.

[0062] В различных аспектах целевой диапазон уровней ADCC-активности является известным, предварительно выбран или предварительно определен, и первая модель позволяет рассчитать целевой диапазон для содержания TAF-гликанов исходя из данного целевого диапазона уровней ADCC-активности. В иллюстративных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m до n , где m равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/12Q]$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне для эталонного антитела, и n равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/12Q]$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне для эталонного антитела. В различных случаях Q равняется 2. В различных случаях уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 24 * \%TAF$. В различных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m до n , где m равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/24]$, и n равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/24]$. В различных случаях Q равняется 1. В различных аспектах уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 12 * \%TAF$. В различных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m до n , где m равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/12]$, и n равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/12]$. В различных аспектах целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m° до n° , где m° равняется $[(ADCC_{\text{мин.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n° равняется $[(ADCC_{\text{макс.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x составляет от приблизительно 20,4 до приблизительно 27,7, и y составляет от приблизительно -11,4 до приблизительно 16,7. В качестве альтернативы x составляет от приблизительно 9,7 до приблизительно 15,2, и y составляет от приблизительно -15,6 до приблизительно 34,2. В различных аспектах целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m' до n' , где m' равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/x']$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n' равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/x']$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x' составляет от приблизительно 24,1 до приблизительно 25,4. В качестве альтернативы x' составляет от приблизительно 13,0 до приблизительно 13,95. В различных случаях уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $13,5\% \pm 0,5\%$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только один сайт связывания с антителом. В различных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $24,74\% \pm 0,625\%$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело

из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только два сайта связывания с антителом. В иллюстративных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $12\% \pm 1,5\% * Q$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, Q представляет собой число сайтов связывания с антителом, присутствующих на антигене. В иллюстративных случаях эталонное антитело представляет собой инфликсимаб. В иллюстративных аспектах эталонное антитело представляет собой ритуксимаб.

[0063] Активность ADCC или % ADCC можно рассчитывать с применением уравнения, которое показывает связь % TAF-гликанов, % HM-гликанов и/или % AF-гликанов с % ADCC-активности указанной композиции на основе антитела. В различных аспектах уравнение показывает связь % TAF-гликанов с % ADCC. В иллюстративных аспектах уравнение представляет собой уравнение A:

$$Y = 2,6 + 24,1 * X$$

[уравнение A],

где Y представляет собой % ADCC, и X представляет собой % TAF-гликанов.

[0064] В различных случаях уравнение показывает связь % HM-гликанов и % AF-гликанов с % ADCC композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах уравнение представляет собой уравнение B:

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение B],

где Y представляет собой % ADCC, HM представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, и AF представляет собой % афукозилированных гликанов.

[0065] В иллюстративных аспектах способ включает определение (например, измерение) % TAF-гликанов, и посредством применения определенного (например, измеренного) % TAF-гликанов можно рассчитывать % ADCC с применением уравнения A. Соответственно, в иллюстративных случаях способ включает расчет % ADCC композиции на основе антитела исходя из определенного (например, измеренного) % TAF-гликанов с применением уравнения A. В различных аспектах % ADCC, рассчитанный таким образом, является применимым касательно отсутствия необходимости экспериментально определять (например, измерять % ADCC) композиции на основе антитела.

[0066] В иллюстративных аспектах способ включает определение (например, измерение) % HM-гликанов и % AF-гликанов, и посредством применения определенного (например, измеренного) % HM-гликанов и % AF-гликанов можно рассчитывать % ADCC с применением уравнения B. Соответственно, в иллюстративных случаях способ включает расчет % ADCC композиции на основе антитела исходя из определенного (например, измеренного) % HM-гликанов и % AF-гликанов с применением уравнения B. В различных аспектах % ADCC, рассчитанный таким образом, является применимым касательно отсутствия необходимости экспериментально определять (например, измерять % ADCC) композиции на основе антитела.

[0067] В различных аспектах уравнения, раскрытые в данном документе, показывающие связь % ADCC и % TAF-гликанов, % HM-гликанов и/или % AF-гликанов, могут быть повторно сформулированы таким образом, чтобы, например, % TAF-гликанов можно было определять с применением уравнения. Например, уравнение А может быть повторно сформулировано следующим образом:

$$X=(Y-2,6)/24,1,$$

где **Y** представляет собой % ADCC, и **X** представляет собой % TAF-гликанов.

[0068] В качестве альтернативы уравнение В может быть повторно сформулировано следующим образом:

$$(Y - 0,24)=27*HM+22,1 * AF; \text{ или}$$

$$[(Y - 0,24) - 22,1 * AF]/27=HM; \text{ или}$$

$$[(Y - 0,24) - 27 * HM]/22,1=AF,$$

где **Y** представляет собой % ADCC, **HM** представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, и **AF** представляет собой % афукозилированных гликанов.

[0069] В иллюстративных случаях определяют (например, измеряют) % ADCC, и посредством применения определенного % ADCC в повторной формулировке уравнения А может быть рассчитан % TAF, связанный с определенным % ADCC. % TAF, рассчитанный с применением уравнения А и определенного % ADCC, является применимым для идентификации целевого % TAF с целью достижения конкретного % ADCC. Кроме того, в иллюстративных аспектах определяют (например, измеряют) % ADCC, и посредством применения определенного % ADCC в повторной формулировке уравнения В может быть рассчитан % HM-гликанов или % AF-гликанов.

[0070] В различных аспектах % ADCC представляет собой целевой % ADCC и способ идентифицирует целевой % TAF-гликанов с применением целевого уровня ADCC. В различных аспектах способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре клеток с получением композиции на основе антитела с целевым уровнем % TAF, как рассчитано с применением уравнения А. После того, как композиция на основе антитела достигнет целевого уровня % TAF, способ может включать выполнение одной или более последующих стадий обработки с композицией на основе антитела. В различных аспектах способ необязательно включает подтверждение фактического % TAF в композиции на основе антитела.

[0071] В различных аспектах способы включают осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **Y**, рассчитанный с применением определенного % TAF-гликанов с помощью уравнения А или % HM-гликанов и % AF-гликанов с помощью уравнения В, находится в пределах целевого диапазона ADCC.

[0072] *Способы определения и/или отслеживания качества продукта*

[0073] На основании данных корреляций можно определять и/или отслеживать качество продукта для композиции на основе антитела. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает способы определения качества продукта для композиции на

основе антитела, где уровень ADCC-активности композиции на основе антитела представляет собой критерий, на котором основано качество продукта для композиции на основе антитела. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает (i) определение содержания общих афукозилированных (TAF) гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) определение качества продукта как приемлемого и/или достигающего критерия уровня ADCC-активности, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона. В иллюстративных аспектах целевой диапазон содержания TAF-гликанов основан на (1) целевом диапазоне уровней ADCC-активности для эталонного антитела и (2) первой модели, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием TAF-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах ADCC, прогнозируемая с помощью первой модели, составляет от приблизительно 95% до приблизительно 105% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели, где вторая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием HM-гликанов в композиции на основе антитела и содержанием AF-гликанов в композиции на основе антитела.

[0074] В качестве преимущества ADCC, прогнозируемая с помощью первой модели, является статистически в значительной степени схожей с ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели. Например, уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет от приблизительно 95% до приблизительно 105% от уровня ADCC-активности, прогнозируемого с помощью второй модели. Необязательно уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, приблизительно 100%, приблизительно 101%, приблизительно 102%, приблизительно 103%, приблизительно 104% или приблизительно 105% от уровня ADCC-активности, прогнозируемого с помощью второй модели. Уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет, в различных случаях, приблизительно 100% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели. В определенных аспектах между ADCC, прогнозируемой с помощью первой модели, и ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели, наблюдается соответствие один-к-одному. В различных случаях первая модель и/или вторая модель является/являются статистически значимой(-ыми). Например, р-значение для первой модели составляет менее чем 0,0001 и/или р-значение для второй модели составляет менее чем 0,0001. Необязательно каждая из первой модели и второй модели имеет р-значение, которое составляет менее чем 0,0001.

[0075] В иллюстративных аспектах уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 12Q * \%TAF$, где Q представляет собой число сайтов связывания с антителом на антигене, с которыми связывается антитело, и $\%TAF$ представляет собой содержание TAF-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от

m до n , где m равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/12Q]$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне для эталонного антитела, и n равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/12Q]$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне для эталонного антитела. В различных случаях Q равняется 2. В различных случаях уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 24 * \%TAF$. В различных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m до n , где m равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/24]$, и n равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/24]$. В различных случаях уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью второй модели, составляет $\sim 27 * \%HM + \sim 22 * \%AF$, где $\%AF$ представляет собой содержание AF-гликанов в композиции на основе антитела, и $\%HM$ представляет собой содержание HM-гликанов в композиции на основе антитела. В различных случаях Q равняется 1. В различных аспектах уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 12 * \%TAF$. В различных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m до n , где m равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/12]$, и n равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/12]$. В различных случаях уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью второй модели, составляет $\sim 14,8 * \%HM + \sim 12,8 * \%AF$. В данном документе описаны подходящие альтернативные первые модели и вторые модели. В иллюстративных случаях первая модель представляет собой любую из моделей (например, уравнений), описанных в данном документе, которые демонстрируют корреляцию ADCC с содержанием TAF-гликанов, включая без ограничения уравнения 1, 3, 5 и 7, а также уравнение A. В иллюстративных случаях вторая модель представляет собой любую из моделей (например, уравнений), описанных в данном документе, которые демонстрируют корреляцию ADCC с содержанием HM-гликанов и содержанием AF-гликанов, включая без ограничения уравнения 2, 4, 6 и 8, а также уравнение B. Например, в различных аспектах целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m° до n° , где m° определяется как $[(ADCC_{\text{мин.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n° определяется как $[(ADCC_{\text{макс.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x составляет от приблизительно 20,4 до приблизительно 27,7, и y составляет от приблизительно -11,4 до приблизительно 16,7. В качестве альтернативы x составляет от приблизительно 9,7 до приблизительно 15,2, и y составляет от приблизительно -15,6 до приблизительно 34,2. В различных аспектах целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m' до n' , где m' равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/x']$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n' равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/x']$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x' составляет от приблизительно 24,1 до приблизительно 25,4. В качестве альтернативы x' составляет от приблизительно 13,0 до приблизительно 13,95. В различных случаях уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $13,5\% \pm 0,5\%$ для

каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только один сайт связывания с антителом. В различных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $24,74\% \pm 0,625\%$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только два сайта связывания с антителом. В иллюстративных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $12\% \pm 1,5\% * Q$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, Q представляет собой число сайтов связывания с антителом, присутствующих на антигене.

[0076] В иллюстративных аспектах антитело связывается с антигеном, который содержит только один сайт связывания с антителом. В иллюстративных случаях эталонное антитело представляет собой инфликсимаб. В иллюстративных аспектах антитело связывается с антигеном, который содержит только два сайта связывания с антителом. В иллюстративных аспектах эталонное антитело представляет собой ритуксимаб.

[0077] В иллюстративных аспектах способ представляет собой анализ в рамках контроля качества (QC). В иллюстративных аспектах способ представляет собой анализ в рамках внутрипроизводственного QC. В различных аспектах образец представляет собой образец материала, полученного в процессе производства. В различных случаях содержание TAF-гликанов определяют до сбора или после сбора. В иллюстративных случаях содержание TAF-гликанов определяют после стадии хроматографии. Стадия хроматографии необязательно предусматривает осуществление хроматографии на основе захвата, промежуточной хроматографии и/или хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку. В некоторых аспектах содержание TAF-гликанов определяют после инактивации и нейтрализации вирусов, фильтрации для удаления вирусов или замены буфера. Способ в различных случаях представляет собой анализ при выпуске партий. В некоторых аспектах образец представляет собой образец из производственной партии.

[0078] В различных аспектах способ дополнительно включает осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона. Если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то одно или более условий культивирования клеток подвергают модификации с получением модифицированной культуры клеток, в различных аспектах. В некоторых аспектах способ дополнительно включает определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела, полученной после того, как одно или более условий культивирования клеток были модифицированы, например, определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела из модифицированной культуры клеток. В различных аспектах, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то

способ дополнительно включает (iii) модифицирование одного или более условий культивирования клеток с получением модифицированной культуры клеток и (iv) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела, полученной из модифицированной культуры клеток. В иллюстративных аспектах, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то способ дополнительно включает осуществление стадий (iii) и (iv) до тех пор, пока содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (iv), не будет находиться в пределах целевого диапазона. В иллюстративных случаях анализ, посредством которого непосредственно измеряют значение ADCC-активности композиции на основе антитела, выполняют в отношении композиции на основе антитела только в случае, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, например находится за пределами целевого диапазона. Анализы, посредством которых непосредственно измеряют значение ADCC-активности, включают, например, клеточный анализ, посредством которого измеряют высвобождение выявляемого реагента после лизиса экспрессирующих антиген клеток, содержащих выявляемое средство, с помощью эффекторных клеток, которые связаны с антителом, связывающимся как с клетками, экспрессирующими антиген, так и с эффекторными клетками. В иллюстративных случаях анализ, посредством которого непосредственно измеряют значение ADCC-активности композиции на основе антитела, не выполняют в отношении композиции на основе антитела. В различных аспектах определение содержания TAF-гликанов представляет собой единственную стадию, требуемую для определения качества продукта с точки зрения критерия уровня ADCC-активности. Не ограничиваясь теорией, статистические значимые корреляции первой модели и второй модели позволяют с помощью содержания TAF-гликанов показывать уровень ADCC-активности таким образом, чтобы анализы, посредством которых непосредственно измеряют уровень ADCC-активности, не требуются. Соответственно, непосредственное измерение уровня ADCC-активности композиции на основе антитела не требуется и, таким образом, не выполняется в различных аспектах способов, раскрытых в данном документе.

[0079] В различных аспектах способ определяет качество продукта с точки зрения критерия уровня ADCC-активности. В различных аспектах критерий уровня ADCC-активности представляет собой один из критериев приемлемости для композиции на основе антитела. В различных аспектах раскрытые в данном документе способы предназначены для обеспечения того, чтобы партии продуктов в виде лекарственного средства отвечали каждой соответствующей спецификации и соответствующим статистическим критериям в рамках контроля качества в качестве условия для их одобрения и выпуска в соответствии со статьей 21 CFR 211.165. В различных аспектах раскрытые в данном документе способы определения качества продукта отвечают статистическим критериям в рамках контроля качества, которые включают соответствующие уровни приемлемости и/или соответствующие уровни отклонения. Терминология, включая без ограничения термины "критерии приемлемости", "партия" и

"внутрипроизводственный", соответствует своему значению, как определено в разделе 210.3 статьи 21 Свода федеральных постановлений США (CFR).

[0080] Настоящее изобретение также предусматривает способы отслеживания качества продукта для композиции на основе антитела, где уровень ADCC-активности композиции на основе антитела представляет собой критерий, на котором основано качество продукта для композиции на основе антитела. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение качества продукта для композиции на основе антитела в соответствии со способом по настоящему изобретению, при этом первый образец получают в первый момент времени и второй образец получают во второй момент времени, который отличается от первого момента времени. В различных случаях каждый из первого образца и второго образца представляет собой образец материала, полученного в процессе производства. В различных аспектах первый образец представляет собой образец материала, полученного в процессе производства, и второй образец представляет собой образец из производственной партии. Необязательно первый образец представляет собой образец, полученный до того, как одно или более условий культивирования клеток были модифицированы, и второй образец представляет собой образец, полученный после того, как одно или более условий культивирования клеток были модифицированы. В иллюстративных случаях содержание TAF-гликанов определяют для каждого из первого образца и второго образца. Дополнительные образцы могут быть получены в целях определения качества продукта для композиции на основе антитела и для определения содержания TAF-гликанов. Качество продукта для композиции на основе антитела зависит от того, находится ли содержание TAF-гликанов в пределах целевого диапазона. В иллюстративных аспектах целевой диапазон содержания TAF-гликанов основан на (1) целевом диапазоне уровней ADCC-активности для эталонного антитела и (2) первой модели, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием TAF-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах ADCC, прогнозируемая с помощью первой модели, составляет от приблизительно 95% до приблизительно 105% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели, где вторая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием HM-гликанов в композиции на основе антитела и содержанием AF-гликанов в композиции на основе антитела.

[0081] *Способы получения композиций на основе антитела*

[0082] Настоящее изобретение предусматривает способы получения композиции на основе антитела. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение качества продукта для композиции на основе антитела, где качество продукта для композиции на основе антитела определяют в соответствии со способом по настоящему изобретению. Необязательно способ включает определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела, и образец представляет собой образец материала, полученного в процессе производства. В различных случаях способ включает

определение качества продукта для композиции на основе антитела как приемлемого и/или достигающего критерия уровня ADCC-активности, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона, как определено в данном документе. В иллюстративных аспектах целевой диапазон содержания TAF-гликанов основан на (1) целевом диапазоне уровней ADCC-активности для эталонного антитела и (2) первой модели, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием TAF-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах ADCC, прогнозируемая с помощью первой модели, составляет от приблизительно 95% до приблизительно 105% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели, где вторая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием НМ-гликанов в композиции на основе антитела и содержанием AF-гликанов в композиции на основе антитела. В различных аспектах, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то способ дополнительно включает (iii) модифицирование одного или более условий культивирования клеток с получением модифицированной культуры клеток и (iv) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела, полученной из модифицированной культуры клеток, необязательно повторение стадий (iii) и (iv) до тех пор, пока содержание TAF-гликанов не будет находиться в пределах целевого диапазона. В различных случаях образец представляет собой образец культуры клеток, содержащий клетки, экспрессирующие антитело из композиции на основе антитела. В различных случаях одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания TAF-гликанов. В различных аспектах содержание TAF-гликанов в композиции на основе антитела достигается посредством модифицирования содержания AF-гликанов. В иллюстративных аспектах одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания AF-гликанов в композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах с помощью одного или более условий преимущественно модифицируют содержание AF-гликанов. В различных случаях с помощью одного или более условий модифицируют содержание AF-гликанов и не модифицируют содержание НМ-гликанов. В иллюстративных аспектах способ включает достижение содержания TAF-гликанов в композиции на основе антитела посредством модифицирования содержания НМ-гликанов. Необязательно одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания НМ-гликанов в композиции на основе антитела. В некоторых случаях с помощью одного или более условий преимущественно модифицируют содержание НМ-гликанов. В некоторых аспектах с помощью одного или более условий модифицируют содержание НМ-гликанов и не модифицируют содержание AF-гликанов. В различных случаях способ включает повторение модифицирования содержания афукозилированных (AF) гликанов и/или повторение модифицирования содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) до тех пор, пока содержание TAF-гликанов не будет находиться в пределах целевого

диапазона.

[0083] В иллюстративных вариантах осуществления способ получения композиции на основе антитела включает (i) определение содержания общих афукозилированных (TAF) гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки исходя из содержания TAF-гликанов, определенного на стадии (i). В различных аспектах образец получают из культуры клеток, содержащей клетки, экспрессирующие антитело из композиции на основе антитела. В различных случаях способ дополнительно включает модифицирование содержания TAF-гликанов в композиции на основе антитела и определение модифицированного содержания TAF-гликанов. Необязательно одно или более условий культивирования клеток модифицируют с целью модификации содержания TAF-гликанов. В иллюстративных аспектах способ включает повторение модифицирования до тех пор, пока содержание TAF-гликанов не будет находиться в пределах целевого диапазона. В иллюстративных случаях целевой диапазон основан на целевом диапазоне уровня ADCC-активности для антитела. Не ограничиваясь теорией, содержание TAF-гликанов коррелирует с уровнем ADCC-активности композиции на основе антитела таким образом, что уровень ADCC-активности композиции на основе антитела можно прогнозировать исходя из содержания TAF-гликанов в композиции на основе антитела. Уровень ADCC-активности композиции на основе антитела может представлять собой критерий, который следует учитывать при принятии решения о том, должна ли композиция на основе антитела быть выбрана для последующей обработки. Таким образом, в различных аспектах способ включает (i) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела; (ii) определение уровня ADCC-активности композиции на основе антитела исходя из содержания TAF-гликанов, определенного на стадии (i), и необязательно (iii) осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если уровень ADCC композиции на основе антитела, определенный на стадии (ii), находится в пределах целевого диапазона для уровня ADCC-активности. В различных аспектах целевой диапазон для уровня ADCC-активности является известным для антитела из композиции на основе антитела. В различных аспектах антитело из композиции на основе антитела представляет собой биоаналог эталонного антитела. В различных случаях целевой диапазон для содержания TAF-гликанов основан или определен (например, рассчитан) исходя из целевого диапазона для уровня ADCC-активности, который является известным. Соответственно, в иллюстративных аспектах способ включает (i) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона. Если способ дополнительно включает модифицирование содержания TAF-гликанов в композиции на основе антитела, то в различных случаях способ включает модифицирование содержания афукозилированных (AF) гликанов для модификации содержания TAF-гликанов.

Необязательно одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания АF-гликанов в композиции на основе антитела, что в свою очередь модифицирует содержание ТАФ-гликанов. В качестве альтернативы или дополнения, если способ дополнительно включает модифицирование содержания ТАФ-гликанов в композиции на основе антитела, то в различных случаях способ включает модифицирование содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) для модификации содержания ТАФ-гликанов. Необязательно одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания НF-гликанов в композиции на основе антитела, что в свою очередь модифицирует содержание ТАФ-гликанов. В иллюстративных аспектах с помощью одного или более условий преимущественно модифицируют содержание АF-гликанов. В иллюстративных случаях с помощью одного или более условий преимущественно модифицируют содержание НМ-гликанов. В иллюстративных аспектах с помощью одного или более условий модифицируют содержание АF-гликанов, а не содержание НМ-гликанов. В иллюстративных случаях с помощью одного или более условий модифицируют содержание НМ-гликанов, а не содержание АF-гликанов. Способ необязательно включает повторение модифицирования содержания афукозилированных (AF) гликанов и/или повторение модифицирования содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) до тех пор, пока содержание ТАФ-гликанов не будет находиться в пределах целевого диапазона. В иллюстративных аспектах антитело из композиции на основе антитела представляет собой IgG, необязательно IgG₁. В различных аспектах целевой диапазон для содержания ТАФ-гликанов составляет от m до n, где m равняется $[(ADCC_{\text{мин.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n равняется $[(ADCC_{\text{макс.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x составляет от приблизительно 20,4 до приблизительно 27,7, и y составляет от приблизительно -11,4 до приблизительно 16,7. В качестве альтернативы x составляет от приблизительно 9,7 до приблизительно 15,2, и y составляет от приблизительно -15,6 до приблизительно 34,2. В различных аспектах целевой диапазон для содержания ТАФ-гликанов составляет от m' до n', где m' равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/x']$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n' равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/x']$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x' составляет от приблизительно 24,1 до приблизительно 25,4. В качестве альтернативы x' составляет от приблизительно 13,0 до приблизительно 13,95. В различных случаях уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $13,5\% \pm 0,5\%$ для каждого 1% ТАФ, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только один сайт связывания с антителом. В различных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $24,74\% \pm 0,625\%$ для каждого

1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, где необязательно антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только два сайта связывания с антителом. В иллюстративных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $12\% \pm 1,5\% * Q$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, Q представляет собой число сайтов связывания с антителом, присутствующих на антигене. В иллюстративных случаях Q равняется 1, и необязательно антитело представляет собой инфликсимаб или его биоаналог. Необязательно Q равняется 2, и необязательно антитело представляет собой ритуксимаб или его биоаналог.

[0084] Раскрытые в данном документе способы получения композиции на основе антитела включают модифицирование содержания общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью клеток в культуре клеток. В различных случаях одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания TAF-гликанов. В различных аспектах способ включает определение модифицированного содержания TAF-гликанов. Необязательно, модифицирование повторяют до тех пор, пока определенное содержание TAF-гликанов не будет находиться в пределах целевого диапазона для TAF. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, содержание TAF-гликанов можно модифицировать посредством изменения содержания афукозилированных (AF) гликанов или содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) или их комбинации, поскольку каждое из них влияет на содержание TAF-гликанов. Соответственно, способы преимущественно обеспечивают возможность для множества путей достижения целевого диапазона содержания TAF-гликанов. Например, одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания AF-гликанов с целью модификации содержания TAF-гликанов. В качестве альтернативы одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания НМ-гликанов с целью модификации содержания TAF-гликанов. В различных случаях одно или более условий культивирования клеток модифицируют для модификации содержания AF-гликанов и содержания НМ-гликанов с целью модификации содержания TAF-гликанов. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы модифицирования содержания общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью клеток в культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает модифицирование содержания AF-гликанов. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает модифицирование содержания НМ-гликанов. В различных аспектах способ включает (i) определение содержания афукозилированных (AF) гликанов и содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) в образце композиции на основе антитела; (ii) определение целевого диапазона для содержания AF-гликанов исходя из целевого диапазона для уровня ADCC-активности антитела из композиции на основе антитела, при условии, что содержание НМ-гликанов является постоянным; и (iii) осуществление

выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если содержание АF-гликанов находится в пределах целевого диапазона для содержания АF-гликанов. В различных случаях способ включает (i) определение содержания афукозилированных (AF) гликанов и содержания гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) в образце композиции на основе антитела; (ii) определение целевого диапазона для содержания НМ-гликанов исходя из целевого диапазона для уровня ADCC-активности антитела из композиции на основе антитела, при условии, что содержание АF-гликанов является постоянным; и (iii) осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если содержание НМ-гликанов находится в пределах целевого диапазона для содержания АF-гликанов. В различных случаях способ включает (i) определение содержания АF-гликанов и содержания НМ-гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) определение целевого диапазона для содержания АF-гликанов исходя из содержания НМ-гликанов, определенного на стадии (i), и (iii) модифицирование содержания АF-гликанов до тех пор, пока оно не будет находиться в пределах целевого диапазона для содержания АF-гликанов, при этом содержание НМ-гликанов является немодифицированным. В качестве альтернативы способ включает (i) определение содержания АF-гликанов и содержания НМ-гликанов в образце композиции на основе антитела и (ii) определение целевого диапазона для содержания НМ-гликанов исходя из содержания АF-гликанов, определенного на стадии (i), и (iii) модифицирование содержания НМ-гликанов до тех пор, пока оно не будет находиться в пределах целевого диапазона для содержания НМ-гликанов, при этом содержание АF-гликанов является немодифицированным. В иллюстративных аспектах модель, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием ТАФ-гликанов в композиции на основе антитела, прогнозирует по сути такой же уровень ADCC-активности, как и прогнозируемый моделью, которая демонстрирует корреляцию ADCC с содержанием НМ- и АF-гликанов. Подходящие способы модифицирования содержания АF-гликанов и/или содержания НМ-гликанов известны из уровня техники. Например, в публикации международной заявки на патент № WO 2019/191150 описаны способы модифицирования уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела и способы модифицирования уровня гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела. В таких способах одно или более условий культивирования клеток, например pH, концентрацию фукозы, концентрацию глюкозы, модифицируют с достижением требуемого уровня АF-гликанов и/или НМ-гликанов. Кроме того, в каждой из публикаций международных заявок на патент №№ WO 2013/114164, WO 2016/089919, WO 2013/114245, WO 2015/128793 и WO 2013/114167, публикации заявки на патент США № US 2014/0356910 и Konno et al., Cytotech 64: 249-265 (2012) описаны способы получения повышенного уровня дефукозилированных гликанов.

[0085] В иллюстративных вариантах осуществления способ получения композиции на основе антитела включает (i) определение % общих афукозилированных (ТАФ)

гликанов в композиции на основе антитела; (ii) расчет % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела исходя из % TAF с применением уравнения A:

$$Y=2,6+24,1 * X$$

[уравнение A],

где **Y** представляет собой % ADCC, и **X** представляет собой % TAF-гликанов, определенный на стадии (i), и

(iii) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **Y** находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

[0086] В иллюстративных вариантах осуществления способ получения композиции на основе антитела включает (i) определение % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела; (ii) расчет % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела исходя из % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов с применением уравнения B:

$$Y=(0,24+27 * HM+22,1 * AF)$$

[уравнение B],

где **Y** представляет собой % ADCC, **HM** представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, определенный на стадии (i), и **AF** представляет собой % афукозилированных гликанов, определенный на стадии (i), и

(iii) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **Y** находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

[0087] В иллюстративных вариантах осуществления предусмотрен способ получения композиции на основе антитела с целевым % ADCC, и способ включает (i) расчет целевого % общих афукозилированных (TAF) гликанов для целевого % ADCC с применением уравнения A:

$$Y=2,6+24,1 * X$$

[уравнение A],

где **Y** представляет собой целевой % ADCC, и **X** представляет собой целевой % TAF-гликанов; и

(ii) поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре клеток с получением композиции на основе антитела с целевым % TAF-гликанов, **X**.

[0088] В иллюстративных вариантах осуществления предусмотрен способ получения композиции на основе антитела с целевым % ADCC, и способ включает (i) расчет целевого % афукозилированных гликанов и целевого % гликанов с высоким содержанием маннозы для целевого % ADCC с применением уравнения B,

$$Y=(0,24+27 * HM+22,1 * AF)$$

[уравнение B],

где **Y** представляет собой % ADCC, **HM** представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, и **AF** представляет собой % афукозилированных гликанов, и

(iii) поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре клеток с получением композиции на основе антитела с целевым % гликанов с высоким содержанием маннозы и целевым % афукозилированных гликанов.

[0089] В иллюстративных аспектах целевой % ADCC находится в пределах целевого диапазона для % ADCC. Необязательно целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от более чем или приблизительно 40 до менее чем или приблизительно 170 или приблизительно 175. Например, целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от приблизительно 40 до приблизительно 175, от приблизительно 50 до приблизительно 175, от приблизительно 60 до приблизительно 175, от приблизительно 70 до приблизительно 175, от приблизительно 80 до приблизительно 175, от приблизительно 90 до приблизительно 175, от приблизительно 100 до приблизительно 175, от приблизительно 110 до приблизительно 175, от приблизительно 120 до приблизительно 175, от приблизительно 130 до приблизительно 175, от приблизительно 140 до приблизительно 175, от приблизительно 150 до приблизительно 175, от приблизительно 160 до приблизительно 175, или от приблизительно 170 до приблизительно 175, или от приблизительно 40 до приблизительно 170, от приблизительно 40 до приблизительно 160, от приблизительно 40 до приблизительно 150, от приблизительно 40 до приблизительно 140, от приблизительно 40 до приблизительно 130, от приблизительно 40 до приблизительно 120, от приблизительно 40 до приблизительно 110, от приблизительно 40 до приблизительно 100, от приблизительно 40 до приблизительно 90, от приблизительно 40 до приблизительно 80, от приблизительно 40 до приблизительно 70, от приблизительно 40 до приблизительно 60 или от приблизительно 40 до приблизительно 50. В различных аспектах целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от более чем или приблизительно 44 до менее чем или приблизительно 165 (например, от приблизительно 45 до приблизительно 165, от приблизительно 50 до приблизительно 165, от приблизительно 60 до приблизительно 165, от приблизительно 100 до приблизительно 165, от приблизительно 45 до приблизительно 100, от приблизительно 45 до приблизительно 60, от приблизительно 100 до приблизительно 150, от приблизительно 100 до приблизительно 125, от приблизительно 125 до приблизительно 150). В иллюстративных аспектах целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от более чем или приблизительно 60 до менее чем или приблизительно 130.

[0090] В иллюстративных случаях целевой диапазон для % ADCC зависит от **Y** из уравнения A или уравнения B. Например, в некоторых аспектах целевой диапазон для % ADCC представляет собой $Y \pm 20$, необязательно $Y \pm 17$ или $Y \pm 18$. В некоторых аспектах целевой диапазон для % ADCC представляет собой $Y \pm 17$ для уравнения A и $Y \pm 18$ для уравнения B.

[0091] Целевой диапазон для % ADCC может представлять собой любой из

таковых, описанных для композиций на основе антител. См., например, раздел *"Композиции"*.

[0092] В иллюстративных вариантах осуществления способ получения композиции на основе антитела с % ADCC, Y , который необязательно составляет более чем или приблизительно 40 и менее чем или приблизительно 170, включает (i) определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов, X , в композиции на основе антитела и (ii) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если X является эквивалентным $(Y-2,6)/24,1$. В различных аспектах X составляет более чем или приблизительно 1,55 и менее чем или приблизительно 6,95, необязательно от приблизительно 1,6 до приблизительно 6,9 или от приблизительно 1,6 до приблизительно 6,5, от приблизительно 1,6 до приблизительно 6,0, от приблизительно 1,6 до приблизительно 5,5, от приблизительно 1,6 до приблизительно 5,0, от приблизительно 1,6 до приблизительно 4,5, от приблизительно 1,6 до приблизительно 4,0, от приблизительно 1,6 до приблизительно 3,5, от приблизительно 1,6 до приблизительно 3,0, от приблизительно 1,6 до приблизительно 2,5, от приблизительно 1,6 до приблизительно 2,0, от приблизительно 2,0 до приблизительно 6,95, от приблизительно 2,5 до приблизительно 6,95, от приблизительно 3,0 до приблизительно 6,95, от приблизительно 3,5 до приблизительно 6,95, от приблизительно 4,0 до приблизительно 6,95, от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,95, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,95, от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,95, от приблизительно 6,0 до приблизительно 6,95 или от приблизительно 6,5 до приблизительно 6,95. В различных аспектах Y составляет более чем или приблизительно 44 и менее чем или приблизительно 165, и необязательно при этом X составляет от приблизительно 1,72 до приблизительно 6,74.

[0093] В иллюстративных вариантах осуществления способ представляет собой способ получения композиции на основе антитела с % ADCC, Y , при этом указанный способ включает (i) определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов, X , в композиции на основе антитела, и (ii) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если X является эквивалентным $(Y-2,6)/24,1$, необязательно при этом X составляет более чем или приблизительно $X-0,4$ и менее чем или приблизительно $X+0,4$, и при этом % ADCC составляет более чем приблизительно $Y - 17$ и менее чем или приблизительно $Y+17$. В различных случаях X равняется $X \pm 0,3$, $X \pm 0,2$, $X \pm 0,1$, и/или Y равняется $Y \pm 16$, $Y \pm 15$, $Y \pm 12$, $Y \pm 9$, $Y \pm 6$, $Y \pm 3$, $Y \pm 2$ или $Y \pm 1$.

[0094] В иллюстративных вариантах осуществления способ представляет собой способ получения композиции на основе антитела с % ADCC, при этом указанный способ включает (i) определение % афукозилированных гликанов и % гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела и (ii) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если AF и NM связаны с Y в соответствии с уравнением В,

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение В],

где **Y** представляет собой % ADCC, **HM** представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, определенный на стадии (i), и **AF** представляет собой содержание афукозилированных гликанов, определенное на стадии (i).

[0095] В иллюстративных случаях **Y** составляет более чем или приблизительно 40 и менее чем или приблизительно 175, или представляет собой любой поддиапазон, описанный в данном документе, необязательно от приблизительно 41 до приблизительно 171. В некоторых аспектах **AF** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4, или от приблизительно 1 до приблизительно 3, или от приблизительно 1 до приблизительно 2, и **HM** составляет от приблизительно 40 до приблизительно 175 или представляет собой любой их поддиапазон. Необязательно **Y** составляет от приблизительно 30 до приблизительно 185, необязательно от приблизительно 32 до приблизительно 180, **HM** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4, и **AF** составляет от приблизительно 30 до приблизительно 185. В иллюстративных аспектах % ADCC композиции на основе антитела находится в пределах диапазона, определяемого с помощью **Y**. Необязательно % ADCC композиции на основе антитела находится в пределах диапазона $Y \pm 18$. В иллюстративных аспектах **AF** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4. В некоторых аспектах % гликанов с высоким содержанием маннозы представляет собой значение в пределах диапазона, определяемого с помощью **HM**, необязательно при этом диапазон представляет собой $HM \pm 1$. Необязательно **HM** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4. В некоторых случаях % афукозилированных гликанов представляет собой значение в пределах диапазона, определяемого с помощью **AF**, где необязательно диапазон представляет собой $AF \pm 1$.

[0096] Предусмотрен способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для содержания TAF-гликанов, при этом указанный способ включает (i) измерение уровня ADCC-активности серии образцов, содержащих различные гликоформы антитела, (ii) определение содержания TAF-гликанов для каждого образца из серии, (iii) получение модели, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности с содержанием TAF-гликанов, (iv) определение уровня ADCC-активности композиции на основе антитела и затем расчет содержания TAF-гликанов с применением модели или определение содержания TAF-гликанов для композиции на основе антитела и расчет уровня ADCC-активности с применением модели и (v) осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если содержание TAF-гликанов, рассчитанное на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для содержания TAF-гликанов или если уровень ADCC-активности, рассчитанный на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для уровня ADCC-активности. В некоторых аспектах уровень ADCC-активности измеряют так, как по сути описано в примере 2. В некоторых аспектах содержание TAF-гликанов измеряют так, как по сути описано в примере 1. Модель может быть получена посредством любого из

способов, известных из уровня техники. В различных аспектах модель представляет собой линейную регрессионную модель, и ее получают так, как по сути описано в примере 3 и/или в примере 5.

[0097] Предусмотрен способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % ADCC, при этом указанный способ включает

измерение % ADCC серии образцов, содержащих различные гликоформы антитела, определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов в каждом образце серии,

определение линейного уравнения для линии графика с наилучшим соответствием, которая отображает для каждого образца из серии % ADCC, измеренный на стадии (i), в виде функции от % TAF-гликанов, определенного на стадии (ii),

определение % TAF для композиции на основе антитела, и затем расчет % ADCC с применением линейного уравнения из стадии (iii), и

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если % ADCC, рассчитанный на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

[0098] Кроме того, предусмотрен способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона %TAF, при этом указанный способ включает

измерение % ADCC серии образцов, содержащих различные гликоформы антитела, определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов в каждом образце серии,

определение линейного уравнения для линии графика с наилучшим соответствием, которая отображает для каждого образца из серии % ADCC, измеренный на стадии (i), в виде функции от % TAF-гликанов, определенного на стадии (ii),

определение % ADCC для композиции на основе антитела, и затем расчет % TAF с применением линейного уравнения из стадии (iii), и

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если % TAF, рассчитанный на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для % TAF.

[0099] Иллюстративные способы осуществления первых трех стадий более подробно описаны в примере 3.

[00100] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для содержания TAF-гликанов, включающий определение целевого диапазона для содержания TAF-гликанов и осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более стадий обработки на этапе выделения и очистки, если содержание TAF-гликанов находится в пределах целевого диапазона для содержания TAF-гликанов. В различных аспектах целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m до n , где m равняется $[(ADCC_{\text{мин.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n равняется $[(ADCC_{\text{макс.}} - y)/x]$, где $ADCC_{\text{макс.}}$

представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x составляет от приблизительно 20,4 до приблизительно 27,7, и y составляет от приблизительно -11,4 до приблизительно 16,7. В качестве альтернативы x составляет от приблизительно 9,7 до приблизительно 15,2, и y составляет от приблизительно -15,6 до приблизительно 34,2. В различных аспектах целевой диапазон для содержания TAF-гликанов составляет от m' до n' , где m' равняется $[ADCC_{\text{мин.}}/x']$, где $ADCC_{\text{мин.}}$ представляет собой минимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне, и n' равняется $[ADCC_{\text{макс.}}/x']$, где $ADCC_{\text{макс.}}$ представляет собой максимальное значение уровня ADCC-активности в целевом диапазоне. Необязательно x' составляет от приблизительно 24,1 до приблизительно 25,4. В качестве альтернативы x' составляет от приблизительно 13,0 до приблизительно 13,95.

[00101] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона % TAF, при этом указанный способ включает следующие стадии (i) получение линейного уравнения для графика наилучшего соответствия посредством нанесения на график % ADCC и % TAF-гликанов серии из по меньшей мере 5 эталонных композиций на основе антител, полученных в условиях культуры клеток, при этом каждая эталонная композиция на основе антитела имеет такую же аминокислотную последовательность, как и композиция на основе антитела, (ii) осуществление выбора целевого диапазона для % TAF-гликанов на основании линейного уравнения, полученного на стадии (i), и требуемого % ADCC-активности; (iii) культивирование композиции на основе антитела в условиях культуры клеток; (iv) осуществление очистки композиции на основе антитела, (v) осуществление сбора образцов композиции на основе антитела для определения % TAF и (vi) определение, находится ли % TAF в композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % TAF из стадии (ii). В иллюстративных аспектах способ дополнительно включает осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если % TAF, рассчитанный на стадии (v), находится в пределах целевого диапазона для % TAF.

[00102] Настоящее изобретение также предусматривает способ определения % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела.

[00103] В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела;

расчет % ADCC композиции на основе антитела исходя из % TAF с применением уравнения A:

$$Y = 2,6 + 24,1 * X$$

[уравнение A],

где Y представляет собой % ADCC, и X представляет собой % TAF-гликанов, определенный на стадии (i).

[00104] Кроме того, предусмотрен способ определения % антителозависимой

клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела. В иллюстративных вариантах осуществления указанный способ включает

определение % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела,

расчет % ADCC композиции на основе антитела исходя из % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов с применением уравнения В:

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение В],

где **Y** представляет собой % ADCC, **HM** представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, определенный на стадии (i), и **AF** представляет собой % афукозилированных гликанов, определенный на стадии (i), и

[00105] В различных аспектах способ дополнительно включает осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **Y** находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

[00106] *Стадии обработки*

[00107] % Общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов определяют (например, измеряют) для лучшего информирования о % антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела. Стадию определения (например, стадию измерения) можно осуществлять на любой стадии в ходе изготовления. В частности, измерения можно осуществлять до или после сбора, на любой стадии в ходе последующей обработки, как, например, после любой отдельной операции хроматографии, включая отдельные операции хроматографии на основе захвата, промежуточной хроматографии и/или хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку; инактивации и нейтрализации вирусов, фильтрации для удаления вирусов; и/или заключительного составления. В различных аспектах % общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов определяют (например, измеряют) в режиме реального времени, почти в режиме реального времени и/или постфактум. Отслеживание и измерения можно проводить с помощью известных методик и коммерчески доступного оборудования.

[00108] В различных аспектах настоящего изобретения стадию определения (например, измерения) % общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов осуществляют после стадии сбора. Используемый в данном документе термин "сбор" относится к стадии, в ходе которой среды для культивирования клеток, содержащие рекомбинантный белок, представляющий интерес, собирают и отделяют по меньшей мере от клеток клеточной культуры. Сбор можно осуществлять непрерывно. В некоторых аспектах сбор осуществляют с применением центрифугирования, и он может дополнительно включать осаждение, фильтрацию и т. п. В различных аспектах стадию определения осуществляют

после стадии с применением хроматографии, необязательно стадии с применением хроматографии с использованием белка А. В различных аспектах стадию определения осуществляют после сбора и после стадии с применением хроматографии, например стадии с применением хроматографии с использованием белка А.

[00109] Что касается раскрытых в данном документе способов, композицию на основе антитела в различных аспектах выбирают или отбирают для дальнейших стадий обработки, например для одной или более последующих стадий обработки, и выбор осуществляют на основании конкретного параметра, например % ADCC, % общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов. В различных случаях раскрытые в данном документе способы включают применение композиции на основе антитела на дальнейших стадиях обработки, например на одной или более последующих стадиях обработки, на основании конкретного параметра, например на основании % ADCC, % общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов. В различных случаях раскрытые в данном документе способы включают осуществление дальнейших стадий обработки, например одной или более последующих стадий обработки, с применением композиции на основе антитела, на основании конкретного параметра, например на основании % ADCC, % общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов.

[00110] В иллюстративных случаях одна или более стадий обработки на этапе выделения и очистки представляют собой любую стадию обработки, которую осуществляют после (или далее) стадии обработки, на которой определяют (например, измеряют) % общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов. Например, если был определен (например, измерен) % общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов. Например, если % общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов определяли (например, измеряли) во время сбора, то одна или более последующих стадий обработки представляют собой любую стадию обработки, которую осуществляют после (или далее) стадии сбора, которая в различных аспектах включает стадию разбавления, стадию заполнения, стадию фильтрации, стадию составления, стадию с применением хроматографии, стадию фильтрации для удаления вирусов, стадию инактивации вирусов или их комбинацию. Кроме того, например, если % общих афукозилированных (TAF) гликанов, % гликанов с высоким содержанием маннозы и/или % афукозилированных гликанов определяли (например, измеряли) после стадии с применением хроматографии, например стадии с применением хроматографии с использованием белка А, то одна или более последующих стадий обработки представляют собой любую стадию обработки, которую осуществляют после (или далее) стадии с применением хроматографии, которая в различных аспектах

включает стадию разбавления, стадию заполнения, стадию фильтрации, стадию составления, дополнительную стадию с применением хроматографии, стадию фильтрации для удаления вирусов, стадию инаktivации вирусов или их комбинацию. В иллюстративных случаях дополнительная стадия с применением хроматографии представляет собой стадию ионообменной хроматографии (например, стадию катионообменной хроматографии или стадию анионообменной хроматографии).

[00111] Этапы/типы хроматографии, применяемые в ходе последующей обработки, включают хроматографию на основе захвата или аффинную хроматографию, которую применяют для отделения рекомбинантного продукта от других белков, агрегатов, ДНК, вирусов и других подобных примесей. В иллюстративных случаях начальную стадию с применением хроматографии осуществляют с использованием белка А (например, белка А, присоединенного к смоле). В различных аспектах посредством промежуточной хроматографии и хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку, дополнительно очищают рекомбинантный белок, удаляя основную массу загрязняющих веществ, посторонние вирусы, следовые примеси, агрегаты, изоформы и т. д. Хроматографию можно осуществлять либо в режиме связывания и элюирования, где белок, представляющий интерес, связывается с хроматографической средой и примеси протекают насквозь, либо в проточном режиме, где примеси связываются и рекомбинантный белок протекает насквозь. Примеры таких хроматографических способов включают ионообменную хроматографию (ИEX), такую как анионообменная хроматография (АEX) и катионообменная хроматография (СEX); хроматографию гидрофобных взаимодействий (НИС); смешанную модальную или мультимодальную хроматографию (ММ), хроматографию на гидроксипатите (НА); обращенно-фазовую хроматографию и гель-фильтрацию.

[00112] В различных аспектах последующая стадия представляет собой стадию инаktivации вирусов. Вирусы с оболочкой имеют капсид, окруженный липопротеиновой мембраной или "оболочкой" и, таким образом, являются восприимчивыми к инаktivации. В различных случаях стадия инаktivации вирусов включает тепловую инаktivацию/пастеризацию, инаktivацию посредством рН, облучение УФ- и гамма-лучами, применение высокоинтенсивного белого света широкого спектра, добавление средств химической инаktivации, поверхностно-активных веществ и средств для обработки на основе растворителей/детергентов.

[00113] В различных аспектах последующая стадия представляет собой стадию фильтрации для удаления вирусов. В различных аспектах стадия фильтрации для удаления вирусов предусматривает удаление вирусов, не имеющих оболочки. В различных аспектах стадия фильтрации для удаления вирусов предусматривает применение микро- или нано-фильтров.

[00114] В различных аспектах последующая стадия предусматривает одну или более стадий составления. После завершения стадии с применением хроматографии очищенные рекомбинантные белки в различных аспектах подвергают замене буфера на

буфер для составления. В иллюстративных аспектах замену буфера осуществляют с применением ультрафильтрации и диафильтрации (UF/DF). В иллюстративных аспектах рекомбинантный белок подвергают замене буфера на требуемый буфер для составления с применением диафильтрации и концентрируют до требуемой концентрации конечного состава с применением ультрафильтрации. В различных аспектах после стадии составления с UF/DF добавляют дополнительные увеличивающие стабильность вспомогательные вещества.

[00115] *Рекомбинантные гликозилированные белки*

[00116] Раскрытые в данном документе способы относятся к композиции, содержащей рекомбинантный гликозилированный белок. В различных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок содержит аминокислотную последовательность, содержащую одну или более консенсусных последовательностей N-гликозилирования формулы:



где Xaa₁ представляет собой любую аминокислоту за исключением Pro, и Xaa₂ представляет собой Ser или Thr.

[00117] В иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантный гликозилированный белок содержит полипептид, представляющий собой кристаллизующийся фрагмент (Fc). Применяемый в данном документе термин "Fc-полипептид" включает нативные и мутантные формы полипептидов, полученных из Fc-участка антитела. Также включены усеченные формы таких полипептидов, содержащие шарнирный участок, который способствует димеризации. Слитые белки, содержащие Fc-фрагменты (и олигомеры, образованные из них), обеспечивают преимущество, заключающееся в легкой очистке с помощью аффинной хроматографии на колонках с белком А или белком G. В иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантный гликозилированный белок содержит Fc IgG, например IgG человека. В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок содержит Fc IgG1 или IgG2. В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой антитело, белковый продукт на основе антитела, пептитело или белок, слитый с Fc.

[00118] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой антитело. Используемый в данном документе термин "антитело" относится к белку в общепринятом формате иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему переменные и константные участки. Например, антитело может представлять собой IgG, который характеризуется "Y-образной" структурой из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну "легкую" (как правило, имеющую молекулярную массу, составляющую приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, имеющую молекулярную массу, составляющую приблизительно 50-70 кДа). Антитело имеет переменный участок и константный участок. В форматах IgG переменный участок обычно содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три участка, определяющих

комплементарность (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается от других антител, которые связываются с различными антигенами. См., например, Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999).

[00119] Вкратце, в осто́ве антитела CDR встроены в каркас вариабельного участка тяжелой и легкой цепей, где они составляют участки, преимущественно отвечающие за связывание и распознавание антигена. Вариабельный участок содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепи (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; см. также Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883) в пределах каркасного участка (обозначенные как каркасные участки 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4, по Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше).

[00120] Легкие цепи человека классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon-цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая без ограничения IgM1 и IgM2. Варианты осуществления настоящего изобретения включают все такие классы или изотипы антител. Константный участок легкой цепи может представлять собой, например, константный участок легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например константный участок легкой цепи каппа- или лямбда-типа человека. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой, например, константные участки тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например константный участок тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа человека. Соответственно, в иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, включая любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

[00121] В различных аспектах антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. В иллюстративных случаях антитело представляет собой антитело млекопитающего, например антитело мыши, антитело крысы, антитело кролика, антитело козы, антитело лошади, антитело курицы, антитело хомяка, антитело свиньи, антитело человека и т. п. В определенных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой моноклональное антитело человека.

[00122] В различных аспектах антитело расщепляется на фрагменты под действием ферментов, таких как, например, папаин и пепсин. Папаин расщепляет антитело с образованием двух Fab-фрагментов и одного Fc-фрагмента. Пепсин расщепляет антитело с образованием F(ab')₂-фрагмента и pFc'-фрагмента. В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой фрагмент антитела, например Fab, Fc, F(ab')₂ или pFc', в котором остается по меньшей мере один сайт

гликозилирования. Что касается способов по настоящему изобретению, антитело может не содержать определенных частей антитела и может представлять собой фрагмент антитела. В различных аспектах фрагмент антитела содержит сайт гликозилирования. В некоторых аспектах фрагмент представляет собой "гликозилированный Fc-фрагмент", который содержит по меньшей мере часть Fc-участка антитела, которая посттрансляционно гликозилирована в эукариотических клетках. В различных случаях рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой гликозилированный Fc-фрагмент.

[00123] Архитектура антител была использована для создания возрастающего диапазона альтернативных форматов антител, который охватывает диапазон молекулярной массы, составляющий по меньшей мере или приблизительно 12-150 кДа, и диапазон валентности (n) от мономерных ($n=1$), димерных ($n=2$) и тримерных ($n=3$) до тетрамерных ($n=4$) и потенциально выше; такие альтернативные форматы антител называются в данном документе "белковыми продуктами на основе антител" или "связывающими белками на основе антител".

[00124] Белковые продукты на основе антител могут являться таковыми, антигенсвязывающий формат которых основан на фрагментах антител, например scFv, Fab и VHH/VN, которые сохраняют полную способность к связыванию антигена. Наименьшим антигенсвязывающим фрагментом, у которого сохраняется его полный антигенсвязывающий сайт, является Fv-фрагмент, который полностью состоит из переменных (V) участков. Растворимый гибкий аминокислотный пептидный линкер применяют для присоединения V-участков к scFv-фрагменту (одноцепочечный переменный фрагмент) для стабилизации молекулы, или константные (C) домены добавляют к V-участкам с получением Fab-фрагмента [антигенсвязывающего фрагмента]. Как scFv, так и Fab являются широко применяемыми фрагментами, которые можно легко получать в прокариотических хозяевах. Другие белковые продукты на основе антител включают scFv, стабилизированный дисульфидными связями (ds-scFv), одноцепочечный Fab (scFab), а также ди- и мультимерные форматы антител, такие как диа-, триа- и тетрамера, или миниантитела (мини-Ab), которые включают различные форматы, состоящие из scFv, связанных с олигомеризационными доменами. Наименьшие фрагменты представляют собой VHH/VN из тяжелой цепи Ab верблюдовых, а также однодоменные Ab (sdAb). Структурным элементом, который наиболее часто применяется для создания новых форматов антител, является фрагмент антитела, представляющий собой одноцепочечный переменный (V) домен (scFv), который содержит V-домены из тяжелой и легкой цепей (домен VH и VL), связанные посредством пептидного линкера из ~ 15 аминокислотных остатков. Пептитело или продукт слияния пептид-Fc представляет собой еще один белковый продукт на основе антитела. Структура пептитела состоит из биологически активного пептида, привитого на Fc-домен. Пептитела хорошо описаны в данной области техники. См., например, Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012).

[00125] Другие белковые продукты на основе антител включают одноцепочечное

антитело (SCA); диатело; триатело; тетратело; биспецифические или триспецифические антитела и т. п. Биспецифические антитела можно разделить на пять основных классов: BsIgG, дополненные IgG, фрагменты BsAb, биспецифические слитые белки и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., *Molecular Immunology* 67(2) Part A: 97-106 (2015).

[00126] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок содержит любой из этих белковых продуктов на основе антител (например, scFv, VHH/VH Fab, Fv-фрагмент, ds-scFv, scFab, димерное антитело, мультимерное антитело (например, диатело, триатело, тетратело), мини-Ab, VHH-/VH-пептитело из тяжелой цепи антитела верблюдовых, sdAb, диатело; триатело; тетратело; биспецифическое или триспецифическое антитело, BsIgG, дополненный IgG, фрагмент BsAb, биспецифический слитый белок и конъюгат BsAb) и содержит одну или более консенсусных последовательностей N-гликозилирования, необязательно, один или более Fc-полипептидов. В различных аспектах белковый продукт на основе антитела содержит сайт гликозилирования. В иллюстративных аспектах белковый продукт на основе антитела может представлять собой гликозилированный Fc-фрагмент, конъюгированный со связывающим фрагментом антитела ("продукт на основе антитела с гликозилированным Fc-фрагментом").

[00127] Рекомбинантный гликозилированный белок может представлять собой белковый продукт на основе антитела в мономерной форме или в полимерной, олигомерной или мультимерной форме. В определенных вариантах осуществления, в которых антитело содержит два или более различных участка, представляющих собой антигенсвязывающие фрагменты, антитело считается биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим, или бивалентным, тривалентным или поливалентным, в зависимости от количества различных эпитопов, которые распознаются и связываются антителом.

[00128] В различных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Термин "химерное антитело" применяется в данном документе для обозначения антитела, содержащего константные домены от одного вида и переменные домены от второго или, в более общем случае, содержащего отрезки аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Термин "гуманизированное" при применении в отношении антител относится к антителам, содержащим по меньшей мере участки CDR из источника, отличного от человека, сконструированные таким образом, что они характеризуются структурой и иммунологической функцией, более сходными с таковыми у настоящих антител человека, чем у антител из исходного источника. Например, гуманизация может включать прививание CDR из антитела, отличного от антитела человека, такого как антитело мыши, на антитело человека. Гуманизация также может включать селективные аминокислотные замены, чтобы сделать последовательность, отличную от последовательности человека, более сходной с последовательностью человека.

[00129] В иллюстративных аспектах антитело из композиции на основе антитела

связывается с антигеном, содержащим только один сайт связывания с антителом, и необязательно уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $13,5\% \pm 0,5\%$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела. В различных аспектах антитело из композиции на основе антитела связывается с антигеном, содержащим только два сайта связывания с антителом, и необязательно уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $24,74\% \pm 0,625\%$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела. В иллюстративных аспектах уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет приблизительно $12\% \pm 1,5\% * Q$ для каждого 1% TAF, присутствующего в композиции на основе антитела, Q представляет собой число сайтов связывания с антителом, присутствующих на антигене. В иллюстративных случаях Q равняется 1, и необязательно антитело представляет собой инфликсимаб или его биоаналог. Необязательно Q равняется 2, и необязательно антитело представляет собой ритуксимаб или его биоаналог. В различных случаях Q равняется 3, и, таким образом, уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет от приблизительно 36% до приблизительно 40,5% для каждого 1% содержания TAF-гликанов, присутствующего в композиции на основе антитела. Кроме того, в некоторых случаях Q равняется 4, и, таким образом, уровень ADCC-активности композиции на основе антитела составляет от приблизительно 48% до приблизительно 54% для каждого 1% содержания TAF-гликанов, присутствующего в композиции на основе антитела.

[00130] В качестве преимущества способы не ограничены специфичностью антитела, гликозилированного Fc-фрагмента, белкового продукта на основе антитела, химерного антитела или гуманизированного антитела по отношению к антигену. Соответственно, антитело, гликозилированный Fc-фрагмент, белковый продукт на основе антитела, химерное антитело или гуманизированное антитело обладает любой специфичностью связывания с фактически любым антигеном. В иллюстративных аспектах антитело связывается с гормоном, фактором роста, цитокином, рецептором на клеточной поверхности или любым его лигандом. В иллюстративных аспектах антитело связывается с белком, экспрессируемым на клеточной поверхности клетки иммунной системы. В иллюстративных аспектах антитело связывается с молекулой кластера дифференцировки, выбранной из группы, состоящей из следующих: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11A, CD11B, CD11C, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD45RA, CD45RB, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD76, CD79 α , CD79 β , CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95,

CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CD109, CD114, CD 115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CDw128, CD129, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 и CD182.

[00131] В иллюстративных аспектах антитело, гликозилированный Fc-фрагмент, белковый продукт на основе антитела, химерное антитело или гуманизированное антитело представляют собой одно из таковых, описанных в патенте США № 7947809 и публикации заявки на патент США № 20090041784 (рецептор глюкокагона), патенте США № 7939070, патенте США № 7833527, патенте США № 7767206 и патенте США № 7786284 (рецептор A IL-17), патенте США № 7872106 и патенте США № 7592429 (склеростин), патенте США № 7871611, патенте США № 7815907, патенте США № 7037498, патенте США № 7700742 и публикации заявки на патент США № 20100255538 (рецептор IGF-1), патенте США № 7868140 (B7RP1), патенте США № 7807159 и публикации заявки на патент США № 20110091455 (миостатин), патенте США № 7736644, патенте США № 7628986, патенте США № 7524496 и публикации заявки на патент США № 20100111979 (мутанты с делециями рецептора эпидермального фактора роста), патенте США № 7728110 (коронавирус SARS), патенте США № 7718776 и публикации заявки на патент США № 20100209435 (OPGL), патенте США № 7658924 и патенте США № 7521053 (ангиопоэтин-2), патенте США № 7601818, патенте США № 7795413, публикации заявки на патент США № 20090155274, публикации заявки на патент США № 20110040076 (NGF), патенте США № 7579186 (рецептор TGF- β типа II), патенте США № 7541438 (фактор роста соединительной ткани), патенте США № 7438910 (IL1-R1), патенте США № 7423128 (пропердин), патенте США № 7411057, патенте США № 7824679, патенте США № 7109003, патенте США № 6682736, патенте США № 7132281 и патенте США № 7807797 (CTLA-4), патенте США № 7084257, патенте США № 7790859, патенте США № 7335743, патенте США № 7084257 и публикации заявки на патент США № 20110045537 (интерферон гамма), патенте США № 7932372 (MAdCAM), патенте США № 7906625, публикации заявки на патент США № 20080292639 и публикации заявки на патент США № 20110044986 (амилоид), патенте США № 7815907 и патенте США № 7700742 (инсулиноподобный фактор роста I), патенте США № 7566772 и патенте США № 7964193 (интерлейкин-1 β), патенте США № 7563442, патенте США № 7288251, патенте США № 7338660, патенте США № 7626012, патенте США № 7618633 и публикации заявки на патент США № 20100098694 (CD40), патенте США № 7498420 (с-Met), патенте США № 7326414, патенте США № 7592430 и патенте США № 7728113 (M-CSF), патенте США № 6924360, патенте США № 7067131 и патенте США № 7090844 (MUC18), патенте США № 6235883, патенте США № 7807798 и публикации заявки на патент США № 20100305307 (рецептор эпидермального фактора роста), патенте США №

6716587, патенте США № 7872113, патенте США № 7465450, патенте США № 7186809, патенте США № 7317090 и патенте США № 7638606 (рецептор интерлейкина-4), публикации заявки на патент США № 20110135657 (БЕТА-КЛОТО), патенте США № 7887799 и патенте США № 7879323 (полипептиды, подобные фактору роста фибробластов), патенте США № 7867494 (IgE), публикации заявки на патент США № 20100254975 (АЛЬФА-4 БЕТА-7), публикации заявки на патент США № 20100197005 и патенте США № 7537762 (КИНАЗА-1, ПОДОБНАЯ РЕЦЕПТОРУ АКТИВИНА), патенте США № 7585500 и публикации заявки на патент США № 20100047253 (IL-13), публикации заявки на патент США № 20090263383 и патенте США № 7449555 (CD148), публикации заявки на патент США № 20090234106 (АКТИВИН А), публикации заявки на патент США № 20090226447 (ангиопоэтин-1 и ангиопоэтин-2), публикации заявки на патент США № 20090191212 (ангиопоэтин-2), публикации заявки на патент США № 20090155164 (C-FMS), патенте США № 7537762 (киназа-1, подобная рецептору активина), патенте США № 7371381 (галанин), публикации заявки на патент США № 20070196376 (ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА), патенте США № 7267960 и патенте США № 7741115 (LDCAM), US 7265212 (CD45RB), патенте США № 7709611, публикации заявки на патент США № 20060127393 и публикации заявки на патент США № 20100040619 (DKK1), патенте США № 7807795, публикации заявки на патент США № 20030103978 и патенте США № 7923008 (остеопротегерин), публикации заявки на патент США № 20090208489 (OV064), публикации заявки на патент США № 20080286284 (PSMA), патенте США № 7888482, публикации заявки на патент США № 20110165171 и публикации заявки на патент США № 20110059063 (PAR2), публикации заявки на патент США № 20110150888 (ГЕПЦИДИН), патенте США № 7939640 (B7L-1), патенте США № 7915391 (c-Kit), патенте США № 7807796, патенте США № 7193058 и патенте США № 7427669 (ULBP), патенте США № 7786271, патенте США № 7304144 и публикации заявки на патент США № 20090238823 (TSLP), патенте США № 7767793 (SIGIRR), патенте США № 7705130 (HER-3), патенте США № 7704501 (полипептид, подобный атаксину 1), патенте США № 7695948 и патенте США № 7199224 (TNF- α -превращающий фермент), публикации заявки на патент США № 20090234106 (АКТИВИН А), публикации заявки на патент США № 20090214559 и патенте США № 7438910 (IL1-R1), патенте США № 7579186 (рецептор TGF- β типа II), патенте США № 7569387 (молекулы, подобные рецептору TNF), патенте США № 7541438 (фактор роста соединительной ткани), патенте США № 7521048 (рецептор-2 TRAIL), патенте США № 6319499, патенте США № 7081523 и публикации заявки на патент США № 20080182976 (рецептор эритропоэтина), публикации заявки на патент США № 20080166352 и патенте США № 7435796 (B7RP1), патенте США № 7423128 (пропердин), патенте США № 7422742 и патенте США № 7141653 (интерлейкин-5), патенте США № 6740522 и патенте США № 7411050 (RANKL), патенте США № 7378091 (опухолевый антиген, представляющий собой карбоангидразу IX (CA IX), патенте США № 7318925 и патенте США № 7288253 (паратиреоидный гормон), патенте США № 7285269 (TNF), патенте США № 6692740 и патенте США №

7270817 (ACPL), патенте США № 7202343 ((моноцитарный хемоаттрактантный белок-1), патенте США № 7144731 (SCF), патенте США № 6355779 и патенте США № 7138500 (4-1BB), патенте США № 7135174 (PDGFD), патенте США № 6630143 и патенте США № 7045128 (лиганд Flt-3), патенте США № 6849450 (ингибитор металлопротеиназы), патенте США № 6596852 (LERK-5), патенте США № 6232447 (LERK-6), патенте США № 6500429 (нейротрофический фактор, полученный из головного мозга), патенте США № 6184359 (Т-клеточный фактор, полученный из эпителия), патенте США № 6143874 (нейротрофический фактор NNT-1), публикации заявки на патент США № 20110027287 (ПРОПРОТЕИНОВАЯ КОНВЕРТАЗА СУБТИЛИЗИН-КЕКСИНОВОГО ТИПА 9 (PCSK9)), публикации заявки на патент США № 20110014201 (РЕЦЕПТОР IL-18) и публикации заявки на патент США № 20090155164 (C-FMS). Приведенные выше патенты и опубликованные заявки на патенты включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для целей раскрытия полипептидов переменных доменов, нуклеиновых кислот, кодирующих переменные домены, клеток-хозяев, векторов, способов получения полипептидов, кодирующих указанные переменные домены, фармацевтических композиций и способов лечения заболеваний, связанных с соответствующей мишенью антигенсвязывающего белка, содержащего переменный домен, или антитела.

[00132] В иллюстративных вариантах осуществления антитело, гликозилированный Fc-фрагмент, белковый продукт на основе антитела, химерное антитело или гуманизированное антитело представляют собой одно из следующего: муромонаб-CD3 (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Orthoclone Okt3®), абциксимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Reopro®), ритуксимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой MabThera®, Rituxan®), базиликсимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Simulect®), даклизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Zenarax®), паливизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Synagis®), инфликсимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Remicade®), трастузумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Herceptin®), алемтузумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой MabCampath®, Campath-1H®), адалимумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Humira®), тозитумомаб-I131 (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Веххаг®), эфализумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Raptiva®), цетуксимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Erbitux®), тиуксетан ибритумомаба (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Zevalin®), омализумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Xolair®), бевацизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Avastin®), натализумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Tysabri®), ранибизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Lucentis®), панитумумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой

Vectibix®), экулизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Soliris®), пэгол цертолизумаба (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Cimzia®), голимумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Simponi®), канакинумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Ilaris®), катумаксамаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Removab®), устекинумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Stelara®), тоцилизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой RoActemra®, Actemra®), офатумумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Arzerra®), деносумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Prolia®), белимумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Benlysta®), раксимаба, ипилимумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Yervoy®), и пертузумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Perjeta®). В иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой одно из антител к TNF альфа, такое как адалимумаб, инфликсимаб, этанерцепт, голимумаб и пэгол цертолизумаба; антител к IL1.бета, такое как канакинумаб; антител к IL12/23 (p40), такое как устекинумаб и бриакинумаб; и антител к IL2R, такое как даклизумаб.

[00133] В иллюстративных аспектах антитело связывается с опухолеассоциированным антигеном и представляет собой противораковое антитело. Примеры подходящих противораковых антител включают без ограничения антитела к BAFF, такие как белимумаб; антитела к CD20, такие как ритуксимаб; антитела к CD22, такие как эспратузумаб; антитела к CD25, такие как даклизумаб; антитела к CD30, такие как иратумумаб, антитела к CD33, такие как гемтузумаб, антитела к CD52, такие как алемтузумаб; антитела к CD152, такие как ипилимумаб; антитела к EGFR, такие как цетуксимаб; антитела к HER2, такие как трастузумаб и пертузумаб; антитела к IL6, такие как силтуксимаб; и антитела к VEGF, такие как бевацизумаб; антитела к рецептору IL6, такие как тоцилизумаб.

[00134] В иллюстративных аспектах опухолеассоциированный антиген представляет собой CD20, и антитело представляет собой антитело к CD20, например моноклональное антитело к CD20. В иллюстративных аспектах опухолеассоциированный антиген содержит SEQ ID NO: 3. В иллюстративных случаях антитело содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В различных аспектах антитело IgG1 представляет собой ритуксимаб или его биоаналог. Термин ритуксимаб относится к химерному IgG1 каппа мыши/человека, моноклональному антителу, которое связывает антиген CD20 (см. номер CAS: 174722-31-7; DrugBank - DB00073; запись D02994 в Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)). В иллюстративных аспектах антитело содержит легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в таблице A. В иллюстративных аспектах антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в таблице A. В различных случаях антитело содержит VH и VL или содержит последовательности VH-IgG1 и VL-IgG1 каппа, представленные в таблице A.

ТАБЛИЦА А. Аминокислотные последовательности ритуксимаба

Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR1 LC	RASSSVSYIH	4
CDR2 LC	ATSNLAS	5
CDR3 LC	QQWTSNPPT	6
CDR1 HC	SYNMH	7
CDR2 HC	AIYPGNGDTSYNQKFKG	8
CDR3 HC	STYYGGDWYFNV	9
VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKP WIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ WTSNPPTFGGGTKLEIK	10
VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTP GRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA	11
VL-IgG каппа	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKP WIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ WTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	12
VH-IgG1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTP GRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	13

	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
--	--	--

LC, легкая цепь; HC, тяжелая цепь; VL, переменный участок легкой цепи; VH, переменный участок тяжелой цепи.

[00135] В различных аспектах антитело содержит

CDR1 легкой цепи (LC), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 4, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4 с 1 или 2 аминокислотными заменами,

CDR2 LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 5, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5 с 1 или 2 аминокислотными заменами,

CDR3 LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 6, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6 с 1 или 2 аминокислотными заменами,

CDR1 тяжелой цепи (HC), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 7, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7 с 1 или 2 аминокислотными заменами;

CDR2 HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 8, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8 с 1 или 2 аминокислотными заменами;

CDR3 HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 9, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9 с 1 или 2 аминокислотными заменами.

[00136] В различных случаях антитело содержит переменный участок LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 10, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00137] В иллюстративных аспектах антитело содержит вариабельный участок НС, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 11, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00138] В иллюстративных случаях антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 12, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00139] В различных аспектах антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 13, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00140] В иллюстративных аспектах антиген для антитела представляет собой TNF α и антитело представляет собой антитело к TNF α (которое для краткости также может называться просто "антитело к TNF"), например моноклональное антитело к TNF α . В иллюстративных аспектах антиген для антитела содержит SEQ ID NO: 14. В различных аспектах антитело IgG1 представляет собой инфликсимаб или его биоаналог. Термин инфликсимаб относится к химерному моноклональному антителу IgG1 с каппа-цепью, состоящему из человеческого константного участка и мышинового вариабельного участка, и связывает антиген TNF α (см. номер CAS: 170277-31-3, номер доступа в DrugBank DB00065). Инфликсимаб, также известный как химерное антитело cA2, получали из мышинового моноклонального антитела под названием A2 (Knight et al., Molec Immunol 30(16): 1443-1453 (1993)). Вариабельный участок легкой цепи cA2 и легкой цепи cA2 раскрыты в публикации международной заявки на патент № WO 2006/065975. В иллюстративных аспектах антитело содержит легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи инфликсимаба, как изложено в таблице В. В иллюстративных аспектах антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и

CDR3 переменного участка тяжелой цепи инфликсимаба, как изложено в таблице В. В различных случаях антитело содержит VH и VL или содержит последовательности VH-IgG1 и VL-IgG каппа инфликсимаба.

ТАБЛИЦА В. Аминокислотные последовательности инфликсимаба

Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
VL	DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQFVGSSIHWHYQQRTN GSPRLLIKYASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVEEDIA DYVCQQSHSWPFTFGSGTNLEVK	15
VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFSNHWMNWVR QSPEKGLEWVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKS AVYLQMTDLRTEDTGVIYCSRNYYGSTYDYWGQGTTLT VS	16

LC, легкая цепь; HC, тяжелая цепь; VL, переменный участок легкой цепи; VH, переменный участок тяжелой цепи.

[00141] В различных случаях антитело содержит переменный участок LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 15, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами. В иллюстративных аспектах антитело содержит переменный участок HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 16, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00142] *Композиции*

[00143] Раскрытые в данном документе способы относятся к композициям, содержащим рекомбинантные гликозилированные белки. В различных аспектах композиция содержит только один тип рекомбинантного гликозилированного белка. В различных случаях композиция содержит рекомбинантные гликозилированные белки, где каждый рекомбинантный гликозилированный белок из композиции содержит одинаковую или по сути одинаковую аминокислотную последовательность. В различных аспектах композиция содержит рекомбинантные гликозилированные белки, где каждый рекомбинантный гликозилированный белок из композиции содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотным последовательностям всех других рекомбинантных гликозилированных белков из композиции. В различных аспектах композиция содержит рекомбинантные

гликозилированные белки, где каждый рекомбинантный гликозилированный белок из композиции содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотным последовательностям всех других рекомбинантных гликозилированных белков из композиции. В различных аспектах композиция содержит рекомбинантные гликозилированные белки, где каждый рекомбинантный гликозилированный белок из композиции содержит аминокислотную последовательность, которая является одинаковой или по сути одинаковой (например, на по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной аминокислотным последовательностям всех других рекомбинантных гликозилированных белков из композиции), но гликопрофили рекомбинантных гликозилированных белков из композиции могут отличаться друг от друга.

[00144] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой фрагмент антитела и, соответственно, композиция может представлять собой композицию на основе фрагмента антитела.

[00145] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой белковый продукт на основе антитела и, соответственно, композиция может представлять собой композицию на основе белкового продукта на основе антитела.

[00146] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой гликозилированный Fc-фрагмент и, соответственно, композиция может представлять собой композицию на основе гликозилированного Fc-фрагмента.

[00147] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой продукт на основе гликозилированного Fc-фрагмента антитела и, соответственно, композиция может представлять собой композицию на основе продукта на основе гликозилированного Fc-фрагмента антитела.

[00148] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой химерное антитело и, соответственно, композиция может представлять собой композицию на основе химерного антитела.

[00149] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой гуманизированное антитело и, соответственно, композиция может представлять собой композицию на основе гуманизированного антитела.

[00150] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой антитело и композиция представляет собой композицию на основе антитела. В различных аспектах композиция содержит только один тип антитела. В различных случаях композиция содержит антитела, где каждое антитело из композиции на основе антитела содержит одинаковую или по сути одинаковую аминокислотную последовательность. В различных аспектах композиция на основе антитела содержит антитела, где каждое антитело из композиции на основе антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична

аминокислотным последовательностям всех других антител из композиции на основе антитела. В различных аспектах композиция на основе антитела содержит антитела, где каждое антитело из композиции на основе антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотным последовательностям всех других антител из композиции на основе антитела. В различных аспектах композиция на основе антитела содержит антитела, где каждое антитело из композиции на основе антитела содержит аминокислотную последовательность, которая является одинаковой или по сути одинаковой (например, на по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной аминокислотным последовательностям всех других антител из композиции на основе антитела), но гликопрофили антител из композиции на основе антитела могут отличаться друг от друга. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела содержит гетерогенную смесь различных гликоформ антитела. В различных случаях композицию на основе антитела можно охарактеризовать с точки зрения содержания TAF-гликанов, содержания НМ-гликанов и/или содержания AF-гликанов. В различных аспектах композицию на основе антитела описывают с точки зрения % TAF-гликанов, % НМ-гликанов и/или % афукозилированных гликанов. Необязательно композицию на основе антитела можно охарактеризовать с точки зрения содержания других типов гликанов, например галактозилированных гликоформ, фукозилированных гликоформ и т. п.

[00151] В различных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой IgG, необязательно IgG1. В различных случаях каждое антитело из композиции на основе антитела связывается с опухолеассоциированным антигеном, например CD20. В различных аспектах CD20 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3. В иллюстративных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой антитело к CD20. В различных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела содержит

CDR1 легкой цепи (LC), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 4, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4 с 1 или 2 аминокислотными заменами,

CDR2 LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 5, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5 с 1 или 2 аминокислотными заменами,

CDR3 LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6 или

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 6, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6 с 1 или 2 аминокислотными заменами,

CDR1 тяжелой цепи (HC), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 7, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7 с 1 или 2 аминокислотными заменами;

CDR2 HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 8, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8 с 1 или 2 аминокислотными заменами; и/или

CDR3 HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 9, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9 с 1 или 2 аминокислотными заменами.

[00152] В различных случаях каждое антитело из композиции на основе антитела содержит вариабельный участок LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 10, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00153] В иллюстративных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела содержит вариабельный участок HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 11, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00154] В иллюстративных случаях каждое антитело из композиции на основе антитела содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 12, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6,

1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00155] В различных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 13, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00156] В различных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой IgG, необязательно IgG1. В различных случаях каждое антитело из композиции на основе антитела связывается с опухолеассоциированным антигеном, например TNF-альфа. В различных аспектах TNF-альфа содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14. В иллюстративных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой антитело к TNF-альфа.

[00157] В различных случаях каждое антитело из композиции на основе антитела содержит вариабельный участок LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 15, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00158] В иллюстративных аспектах каждое антитело из композиции на основе антитела содержит вариабельный участок HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 16, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16 с 1-10 (например, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотными заменами.

[00159] В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела содержит гетерогенную смесь различных гликоформ антитела. В различных случаях композицию на основе антитела можно охарактеризовать с точки зрения содержания TAF-гликанов, содержания НМ-гликанов и/или содержания AF-гликанов. В различных аспектах композицию на основе антитела описывают с точки зрения % TAF-гликанов, % НМ-гликанов и/или % афукозилированных гликанов. Необязательно композицию на основе антитела можно охарактеризовать с точки зрения содержания других типов гликанов, например галактозилированных гликоформ, фукозилированных гликоформ и т. п.

[00160] В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % TAF-гликанов, рассчитанным с применением уравнения А. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется % TAF-гликанов в пределах диапазона, определяемого с помощью X из уравнения А. В

иллюстративных случаях % TAF-гликанов находится в пределах $X \pm 0,4$. В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % TAF-гликанов, определяемым (например, измеряемым) на стадии определения способов, раскрытых в данном документе. В иллюстративных аспектах % TAF-гликанов определяют посредством хроматографии гидрофильных взаимодействий, необязательно посредством способа, описанного в примере 1. В качестве примера композиция на основе антитела в различных случаях характеризуется менее чем или приблизительно 50% (например, менее чем или приблизительно 40%, менее чем или приблизительно 30%, менее чем или приблизительно 25%, менее чем или приблизительно 20%, менее чем или приблизительно 15%) TAF-гликанов. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется менее чем приблизительно 10% (например, менее чем или приблизительно 9%, менее чем или приблизительно 8%, менее чем или приблизительно 7%, менее чем или приблизительно 6%, менее чем или приблизительно 5%, менее чем или приблизительно 4%, менее чем или приблизительно 3%, менее чем или приблизительно 2%) TAF-гликанов. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется от приблизительно 4% до приблизительно 10% TAF-гликанов. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется от приблизительно 2% до приблизительно 6% TAF-гликанов. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется от приблизительно 2,5% до приблизительно 5% TAF-гликанов. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется менее чем или приблизительно 4% TAF-гликанов. В дополнительных иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется менее чем или приблизительно 4% и более чем или приблизительно 2% TAF-гликанов. В различных аспектах % TAF-гликанов составляет более чем или приблизительно 1,55% и менее чем или приблизительно 6,95%, или от приблизительно 1,72% до приблизительно 6,74%.

[00161] В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % афукозилированных гликанов, рассчитанным с применением уравнения В. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется % афукозилированных гликанов в пределах диапазона, определяемого с помощью **AF** из уравнения В. В иллюстративных случаях % афукозилированных гликанов находится в пределах $AF \pm 1$. В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % афукозилированных гликанов, определяемым (например, измеряемым) на стадии определения способов, раскрытых в данном документе. В иллюстративных аспектах % афукозилированных гликанов определяют посредством хроматографии гидрофильных взаимодействий, необязательно посредством способа, описанного в примере 1. В качестве примера композиция на основе антитела в различных случаях характеризуется менее чем или приблизительно 5% афукозилированных гликанов. В иллюстративных аспектах % афукозилированных гликанов составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела

характеризуется менее чем или приблизительно 4% афукозилированных гликанов. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется менее чем или приблизительно 3,5% афукозилированных гликанов.

[00162] В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % гликанов с высоким содержанием маннозы, рассчитанным с применением уравнения В. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется % гликанов с высоким содержанием маннозы в пределах диапазона, определяемого с помощью **НМ** из уравнения В. В иллюстративных случаях % гликанов с высоким содержанием маннозы находится в пределах **НМ**±1. В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % гликанов с высоким содержанием маннозы, определяемым (например, измеряемым) на стадии определения способов, раскрытых в данном документе. В иллюстративных аспектах % гликанов с высоким содержанием маннозы определяют посредством хроматографии гидрофильных взаимодействий, необязательно посредством способа, описанного в примере 1. В качестве примера композиция на основе антитела в иллюстративных аспектах характеризуется менее чем или приблизительно 5% гликанов с высоким содержанием маннозы. В иллюстративных аспектах % гликанов с высоким содержанием маннозы составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется менее чем или приблизительно 4% гликанов с высоким содержанием маннозы. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется менее чем или приблизительно 3,5% гликанов с высоким содержанием маннозы.

[00163] В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % ADCC, рассчитанным с применением уравнения А или уравнения В. В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % ADCC определяемым (например, измеряемым) на стадии определения. В иллюстративных аспектах % ADCC определяют посредством количественного клеточного анализа, с помощью которого измеряют способность антител из композиции на основе антитела дозозависимым образом опосредовать клеточную цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих антиген для антител и вовлекающих рецепторы Fc-гамма RIIIa на эффекторных клетках посредством Fc-домена антител, например посредством способа, описанного в примере 2. В качестве примера композиция на основе антитела в различных случаях характеризуется от приблизительно 40% до приблизительно 175% ADCC, или от приблизительно 40% до приблизительно 170% ADCC, или от приблизительно 44% до приблизительно 165% ADCC. В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % ADCC, составляющим более чем или приблизительно 40 и менее чем или приблизительно 175 или менее чем или приблизительно 170, необязательно от приблизительно 41 до приблизительно 171. В иллюстративном аспекте композиция на основе антитела характеризуется % ADCC, который составляет от приблизительно 30 до приблизительно 185, необязательно от приблизительно 32 до приблизительно 180. В

различных аспектах % ADCC составляет более чем или приблизительно 60 и менее чем или приблизительно 130. В иллюстративных аспектах композиция на основе антитела характеризуется % ADCC в пределах диапазона, определяемого с помощью Y из уравнения А или уравнения В. В различных аспектах % ADCC находится в пределах $Y \pm 20$, например в пределах $Y \pm 19$, $Y \pm 18$ или $Y \pm 17$.

[00164] Что касается % TAF-гликанов, X , и % ADCC, Y , из уравнения А, в некоторых аспектах Y составляет более чем или приблизительно 40 и менее чем или приблизительно 170, и X составляет более чем или приблизительно 1,55% и менее чем или приблизительно 6,95%. В различных случаях Y составляет более чем или приблизительно 44% и менее чем или приблизительно 165%, и где необязательно X составляет от приблизительно 1,72% до приблизительно 6,74%.

[00165] Что касается % афукозилированных гликанов, AF, и % гликанов с высоким содержанием маннозы, HM, и % ADCC, Y , из уравнения В, в некоторых аспектах Y составляет более чем или приблизительно 40 и менее чем или приблизительно 175, необязательно от приблизительно 41 до приблизительно 171, где AF составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4 и где HM составляет от приблизительно 40 до приблизительно 175. В различных случаях Y составляет от приблизительно 30 до приблизительно 185, необязательно от приблизительно 32 до приблизительно 180, где HM составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4 и где AF составляет от приблизительно 30 до приблизительно 185.

[00166] В иллюстративных вариантах осуществления композицию объединяют с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом. Соответственно, в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие композицию на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композицию на основе антитела или композицию на основе связывающего белка на основе антитела), описанного в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой из стандартных фармацевтических носителей, таких как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии, такие как эмульсия типа "масло в воде" или "вода в масле", и различные типы смачивающих средств.

[00167] В иллюстративных вариантах осуществления композицию на основе антитела получают с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток в клеточной культуре, как описано в данном документе.

[00168] *Дополнительные стадии*

[00169] Способы, раскрытые в данном документе, в различных аспектах включают дополнительные стадии. Например, в некоторых аспектах способы включают одну или более предшествующих стадий или последующих стадий, используемых для получения, очистки и составления рекомбинантного гликозилированного белка, например, антитела. Необязательно последующие стадии представляют собой любые из

тех последующих стадий обработки, описанных в данном документе или известных из уровня техники. См., например, раздел *"Стадии обработки"*. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает стадии получения клеток-хозяев, которые экспрессируют рекомбинантный гликозилированный белок (например, антитело). Клетки-хозяева в некоторых аспектах представляют собой прокариотические клетки-хозяева, например *E. coli* или *Bacillus subtilis*, или клетки-хозяева в некоторых аспектах представляют собой эукариотические клетки-хозяева, например клетки дрожжей, клетки мицелиальных грибов, клетки простейших, клетки насекомых или клетки млекопитающих (например, клетки CHO). Такие клетки-хозяева описаны в уровне техники. См., например, Frenzel, et al., *Front Immunol* 4: 217 (2013) и в данном документе в разделе "Клетки". Например, в некоторых случаях способы включают введение в клетки-хозяева вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный гликозилированный белок или его полипептидную цепь.

[00170] В иллюстративных аспектах способы включают поддержание клеток, например поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток, в клеточной культуре. Соответственно, способы могут включать осуществление любой одной или более стадий, описанных в данном документе в разделе *"Поддержание клеток в клеточной культуре"*.

[00171] В иллюстративных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают стадии выделения и/или очистки рекомбинантного гликозилированного белка (например, рекомбинантного антитела) из культуры. В иллюстративных аспектах способ включает одну или более стадий с применением хроматографии, включая без ограничения, например, аффинную хроматографию (например, аффинную хроматографию с применением белка А), ионообменную хроматографию и/или хроматографию гидрофобных взаимодействий. В иллюстративных аспектах способ включает стадии получения кристаллических биомолекул из раствора, содержащего рекомбинантные гликозилированные белки.

[00172] Способы по настоящему изобретению в различных аспектах включают одну или более стадий получения композиции, включая в некоторых аспектах фармацевтическую композицию, содержащую очищенный рекомбинантный гликозилированный белок. Такие композиции рассматриваются в данном документе.

[00173] *Поддержание клеток в клеточной культуре*

[00174] Что касается способов получения композиции на основе антитела по настоящему изобретению, композицию на основе антитела можно получать посредством поддержания клеток в клеточной культуре. Культуру клеток можно поддерживать в соответствии с любым набором условий, подходящих для получения рекомбинантного гликозилированного белка. Например, в некоторых аспектах культуру клеток поддерживают при конкретном значении pH, температуры, плотности клеток, объема культуры, уровня растворенного кислорода, давления, осмоляльности и т. п. В иллюстративных аспектах культуру клеток перед инокуляцией встряхивают (например,

при 70 об./мин.) при 5% CO₂ в условиях стандартной влажности в инкубаторе с подачей CO₂. В иллюстративных аспектах культурой клеток инокулируют среду объемом 1,5 л при плотности засева, составляющей приблизительно 10⁶ клеток/мл.

[00175] В иллюстративных аспектах способы по настоящему изобретению включают поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток при значении pH, составляющем от приблизительно 6,85 до приблизительно 7,05, например, в различных аспектах, приблизительно 6,85, приблизительно 6,86, приблизительно 6,87, приблизительно 6,88, приблизительно 6,89, приблизительно 6,90, приблизительно 6,91, приблизительно 6,92, приблизительно 6,93, приблизительно 6,94, приблизительно 6,95, приблизительно 6,96, приблизительно 6,97, приблизительно 6,98, приблизительно 6,99, приблизительно 7,00, приблизительно 7,01, приблизительно 7,02, приблизительно 7,03, приблизительно 7,04 или приблизительно 7,05.

[00176] В иллюстративных аспектах способы включают поддержание культуры клеток при температуре от 30°C до 40°C. В иллюстративных вариантах осуществления температура составляет от приблизительно 32°C до приблизительно 38°C или от приблизительно 35°C до приблизительно 38°C.

[00177] В иллюстративных аспектах способы включают поддержание осмоляльности в диапазоне от приблизительно 200 мОсм/кг до приблизительно 500 мОсм/кг. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание осмоляльности в диапазоне от приблизительно 225 мОсм/кг до приблизительно 400 мОсм/кг или от приблизительно 225 мОсм/кг до приблизительно 375 мОсм/кг. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание осмоляльности в диапазоне от приблизительно 225 мОсм/кг до приблизительно 350 мОсм/кг. В различных аспектах осмоляльность (мОсм/кг) поддерживают на уровне приблизительно 200, 225, приблизительно 250, приблизительно 275, приблизительно 300, приблизительно 325, приблизительно 350, приблизительно 375, приблизительно 400, приблизительно 425, приблизительно 450, приблизительно 475 или приблизительно 500.

[00178] В иллюстративных аспектах способы включают поддержание уровня растворенного кислорода (DO) в культуре клеток на уровне насыщения кислородом, составляющем от приблизительно 20% до приблизительно 60%, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных случаях способ включает поддержание уровня DO в культуре клеток на уровне насыщения кислородом, составляющем от приблизительно 30% до приблизительно 50% (например, от приблизительно 35% до приблизительно 45%), в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных случаях способ включает поддержание уровня DO в культуре клеток на уровне насыщения кислородом, составляющем приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55% или приблизительно 60%, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах уровень DO составляет от приблизительно 35 мм рт. ст. до

приблизительно 85 мм рт. ст., или от приблизительно 40 мм рт. ст. до приблизительно 80 мм рт. ст., или от приблизительно 45 мм рт. ст. до приблизительно 75 мм рт. ст.

[00179] Культуру клеток поддерживают в любой одной или более средах для культивирования. В иллюстративных аспектах культуру клеток поддерживают в среде, подходящей для роста клеток, и/или обеспечивают одной или более средами для подпитки в соответствии с любым подходящим режимом подпитки. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей глюкозу, фукозу, лактат, аммиак, глутамин и/или глутамат. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей марганец в концентрации приблизительно 1 мкМ или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей от приблизительно 0,25 мкМ до приблизительно 1 мкМ марганца. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей пренебрежимо малые количества марганца. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей медь в концентрации приблизительно 50 ppb или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей медь в концентрации приблизительно 40 ppb или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей медь в концентрации приблизительно 30 ppb или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей медь в концентрации приблизительно 20 ppb или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах среда содержит медь в концентрации приблизительно 5 ppb или больше или приблизительно 10 ppb или больше. В иллюстративных аспектах среда для культивирования клеток содержит маннозу. В иллюстративных аспектах среда для культивирования клеток не содержит маннозу.

[00180] В иллюстративных вариантах осуществления тип культуры клеток представляет собой периодическую культуру с подпиткой или непрерывную перфузионную культуру. Однако способы по настоящему изобретению преимущественно не ограничены каким-либо конкретным типом культуры клеток.

[00181] Клетки, поддерживаемые в клеточной культуре, могут представлять собой компетентные в отношении гликозилирования клетки. В иллюстративных аспектах компетентные в отношении гликозилирования клетки представляют собой эукариотические клетки, включая без ограничения клетки дрожжей, клетки мицелиальных грибов, клетки простейших, клетки водорослей, клетки насекомых или клетки млекопитающих. Такие клетки-хозяева описаны в уровне техники. См., например, Frenzel, et al., *Front Immunol* 4: 217 (2013). В иллюстративных аспектах эукариотические клетки представляют собой клетки млекопитающих. В иллюстративных аспектах клетки

млекопитающих представляют собой клетки млекопитающих, отличных от человека. В некоторых аспектах клетки представляют собой клетки яичника китайского хомяка (CHO) и их производные (например, CHO-K1, CHO pro-3), клетки миеломы мыши (например, NS0, GS-NS0, Sp2/0), клетки, сконструированные с обеспечением недостаточности активности дигидрофолатредуктазы (DHFR) (например, DUKX-X11, DG44), клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293) или их производные (например, HEK293T, HEK293-EBNA), клетки почки африканской зеленой мартышки (например, клетки линии COS, клетки линии VERO), раковые клетки шейки матки человека (например, HeLa), эпителиальные клетки остеосаркомы из кости человека U2-OS, базальные клетки альвеолярного эпителия аденокарциномы человека A549, клетки фибросаркомы человека HT1080, клетки опухоли головного мозга мыши CAD, клетки эмбриональной карциномы P19, эмбриональные фибробластные клетки мыши NIH 3T3, *фибробластные* клетки мыши L929, клетки нейробластомы мыши N2a, раковые клетки молочной железы человека MCF-7, клетки ретинобластомы Y79, клетки ретинобластомы человека SO-Rb50, раковые клетки печени человека Hep G2, клетки В-клеточной миеломы мыши J558L или клетки почки новорожденного хомяка (BHK) (Gaillet et al. 2007; Khan, Adv Pharm Bull 3(2): 257-263 (2013)).

[00182] Клетки, которые не являются компетентными в отношении гликозилирования, можно также трансформировать в компетентные в отношении гликозилирования клетки, например, посредством их трансфекции генами, кодирующими соответствующие ферменты, необходимые для гликозилирования. Иллюстративные ферменты включают без ограничения олигосахарилтрансферазы, гликозидазы, глюкозидазу I, глюкозидазу II, кальнексин/кальретикулин, гликозилтрансферазы, маннозидазы, GlcNAc-трансферазы, галактозилтрансферазы и сиалилтрансферазы.

[00183] В иллюстративных вариантах осуществления компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. Эти два пути метаболизма фукозы показаны на фигуре 2. В иллюстративных вариантах осуществления компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности любого одного или более из следующих: фукозилтрансфераза (FUT, например FUT1, FUT2, FUT3, FUT4, FUT5, FUT6, FUT7, FUT8, FUT9), фукокиназа, GDP-фукозопирофосфорилаза, GDP-D-манноза-4,6-дегидратаза (GMD) и GDP-кето-6-дезоксиманноза-3,5-эпимераза-4-редуктаза (FX). В иллюстративных вариантах осуществления компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего FX.

[00184] В иллюстративных вариантах осуществления компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GNTIII) или GDP-6-дезоксид-ликсо-4-гексулозоредуктазы (RMD). В иллюстративных аспектах

компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения сверхэкспрессии GNTIII или RMD.

[00185] *Иллюстративные варианты осуществления*

[00186] Ниже представлены иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения.

Е1. Способ получения композиции на основе антитела, при этом указанный способ включает

определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела;

расчет % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела исходя из % TAF с применением уравнения А:

$$Y = 2,6 + 24,1 * X$$

[уравнение А],

где Y представляет собой % ADCC, и X представляет собой % TAF-гликанов, определенный на стадии (i), и

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий, если Y находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

Е2. Способ получения композиции на основе антитела, при этом указанный способ включает

определение % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела,

расчет % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела исходя из % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов с применением уравнения В:

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение В],

где Y представляет собой % ADCC, HM представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, определенный на стадии (i), и AF представляет собой % афукозилированных гликанов, определенный на стадии (i), и

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий, если Y находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

Е3. Способ получения композиции на основе антитела с целевым % ADCC, при этом указанный способ включает

расчет целевого % общих афукозилированных (TAF) гликанов для целевого % ADCC с применением уравнения А:

$$Y = 2,6 + 24,1 * X$$

[уравнение А],

где Y представляет собой целевой % ADCC, и X представляет собой целевой % TAF-гликанов, и

поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре

клеток с получением композиции на основе антитела с целевым % TAF-гликанов, **X**.

Е4. Способ получения композиции на основе антитела с целевым % ADCC, при этом указанный способ включает

расчет целевого % афукозилированных гликанов и целевого % гликанов с высоким содержанием маннозы для целевого % ADCC с применением уравнения В:

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение В],

где **Y** представляет собой целевой % ADCC, **HM** представляет собой целевой % гликанов с высоким содержанием маннозы, и **AF** представляет собой целевой % афукозилированных гликанов, и

поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре клеток с получением композиции на основе антитела с целевым % гликанов с высоким содержанием маннозы и целевым % афукозилированных гликанов.

Е5. Способ по варианту осуществления 3 или варианту осуществления 4, где целевой % ADCC находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

Е6. Способ по любому из вариантов осуществления 1, 2 и варианта осуществления 5, где целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от более чем или приблизительно 40 до менее чем или приблизительно 170.

Е7. Способ по варианту осуществления 6, где целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от более чем или приблизительно 44 до менее чем или приблизительно 165.

Е8. Способ по варианту осуществления 7, где целевой диапазон для % ADCC представляет собой диапазон от более чем или приблизительно 60 до менее чем или приблизительно 130.

Е9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-4, где целевой диапазон для % ADCC составляет $Y \pm 20$.

Е10. Способ по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 3, где целевой диапазон для % ADCC составляет $Y \pm 17$.

Е11. Способ по варианту осуществления 2 или варианту осуществления 4, где целевой диапазон для % ADCC составляет $Y \pm 18$.

Е12. Способ получения композиции на основе антитела с % ADCC, **Y**, который необязательно составляет более чем или приблизительно 40 и менее чем или приблизительно 170, при этом указанный способ включает

определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов, **X**, в композиции на основе антитела и

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **X** является эквивалентным $(Y - 2,6)/24,1$.

Е13. Способ по варианту осуществления 13, где **X** составляет более чем или приблизительно 1,55% и менее чем или приблизительно 6,95%.

Е14. Способ по варианту осуществления 13 или варианту осуществления 14, где **Y**

составляет более чем или приблизительно 44% и менее чем или приблизительно 165%, и где необязательно **X** составляет от приблизительно 1,72% до приблизительно 6,74%.

E15. Способ получения композиции на основе антитела с % ADCC, **Y**, при этом указанный способ включает

определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов, **X**, в композиции на основе антитела и

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **X** является эквивалентным $(Y-2,6)/24,1$, где необязательно **X** составляет более чем или приблизительно $X-0,4$ и менее чем или приблизительно $X+0,4$, и где % ADCC составляет более чем приблизительно **Y** - 17 и менее чем или приблизительно **Y**+17.

E16. Способ получения композиции на основе антитела с % ADCC, при этом указанный способ включает

определение % афукозилированных гликанов и % гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела и

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если **AF** и **HM** связаны с **Y** в соответствии с уравнением В,

$$Y=(0,24+27 * HM+22,1 * AF)$$

[уравнение В],

где **Y** представляет собой % ADCC, **HM** представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, определенный на стадии (i), и **AF** представляет собой % афукозилированных гликанов, определенный на стадии (i).

E17. Способ по варианту осуществления 16, где **Y** составляет более чем или приблизительно 40 и менее чем или приблизительно 175, необязательно от приблизительно 41 до приблизительно 171, где **AF** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4, и где **HM** составляет от приблизительно 40 до приблизительно 175.

E18. Способ по варианту осуществления 16, где **Y** составляет от приблизительно 30 до приблизительно 185, необязательно от приблизительно 32 до приблизительно 180, где **HM** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4, и где **AF** составляет от приблизительно 30 до приблизительно 185.

E19. Способ по варианту осуществления 16, где % ADCC композиции на основе антитела находится в пределах диапазона, определяемого с помощью **Y**.

E20. Способ по варианту осуществления 19, где % ADCC композиции на основе антитела находится в пределах диапазона $Y \pm 18$.

E21. Способ по любому из вариантов осуществления 16, 19 и варианта осуществления 20, где **AF** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4.

E22. Способ по варианту осуществления 21, где % гликанов с высоким содержанием маннозы представляет собой значение в пределах диапазона, определяемого с помощью **HM**, где необязательно диапазон представляет собой $HM \pm 1$.

Е23. Способ по любому из вариантов осуществления 16, 19 и варианта осуществления 20, где **НМ** составляет от приблизительно 1 до приблизительно 4.

Е24. Способ по варианту осуществления 24, где % афукозилированных гликанов представляет собой значение в пределах диапазона, определяемого с помощью **АF**, где необязательно диапазон представляет собой **АF**±1.

Е25. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где % TAF-гликанов определяют посредством расчета суммы % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов.

Е26. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов определяют посредством хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Е27. Способ по варианту осуществления 26, где % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов определяют посредством способа, описанного в примере 1.

Е28. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где % ADCC определяют посредством количественного клеточного анализа, с помощью которого измеряют способность антител из композиции на основе антитела дозозависимым образом опосредовать клеточную цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих антиген для антител и вовлекающих рецепторы Fc-гамма RIIIa на эффекторных клетках посредством Fc-домена антител.

Е29. Способ по варианту осуществления 28, где % ADCC определяют посредством анализа, описанного в примере 2.

Е30. Способ по любому из вариантов осуществления 1, 2 и вариантов осуществления 5-19, где стадию определения осуществляют после стадии сбора.

Е31. Способ по варианту осуществления 30, где стадию определения осуществляют после стадии с применением хроматографии.

Е32. Способ по варианту осуществления 31, где стадия с применением хроматографии представляет собой стадию с применением хроматографии с использованием белка А.

Е33. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где одна или более последующих стадий обработки включают стадию разбавления, стадию заполнения, стадию фильтрации, стадию составления, стадию хроматографии, стадию фильтрации для удаления вирусов, стадию инактивации вирусов или их комбинацию.

Е34. Способ по варианту осуществления 33, где стадия с применением хроматографии представляет собой стадию с применением ионообменной хроматографии, необязательно стадию с применением катионообменной хроматографии или стадию с применением анионообменной хроматографии.

Е35. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой IgG.

Е36. Способ по варианту осуществления 35, где каждое антитело из композиции на

основе антитела представляет собой IgG₁.

E37. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждое антитело из композиции на основе антитела связывается с опухолеассоциированным антигеном.

E38. Способ по варианту осуществления 37, где опухолеассоциированный антиген содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3.

E39. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждое антитело из композиции на основе антитела представляет собой антитело к CD20.

E40. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждое антитело из композиции на основе антитела содержит

CDR1 легкой цепи (LC), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 4, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4 с 1 или 2 аминокислотными заменами,

CDR2 LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 5, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5 с 1 или 2 аминокислотными заменами,

CDR3 LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 6, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6 с 1 или 2 аминокислотными заменами,

CDR1 тяжелой цепи (HC), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 7, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7 с 1 или 2 аминокислотными заменами;

CDR2 HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 8, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8 с 1 или 2 аминокислотными заменами; и

CDR3 HC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 9, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9 с 1 или 2 аминокислотными заменами.

E41. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждое антитело из композиции на основе антитела содержит переменный участок LC, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 10, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 с 1-10 аминокислотными заменами.

Е42. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждое антитело из композиции на основе антитела содержит вариабельный участок НС, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 11, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11 с 1-10 аминокислотными заменами.

Е43. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждое антитело из композиции на основе антитела содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 12, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12 с 1-10 аминокислотными заменами.

Е44. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждое антитело из композиции на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 13, или вариантную аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13 с 1-10 аминокислотными заменами.

Е45. Способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % ADCC, при этом указанный способ включает

измерение % ADCC серии образцов, содержащих различные гликоформы антитела, определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов в каждом образце серии,

определение линейного уравнения для линии графика с наилучшим соответствием, которая отображает для каждого образца из серии % ADCC, измеренный на стадии (i), в виде функции от % TAF-гликанов, определенного на стадии (ii),

определение % TAF для композиции на основе антитела, и затем расчет % ADCC с применением линейного уравнения из стадии (iii), и

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если % ADCC, рассчитанный на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

Е46. Способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % общих афукозилированных (TAF) гликанов, при этом указанный способ включает

измерение % ADCC серии образцов, содержащих различные гликоформы антитела, определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов в каждом образце серии,

определение линейного уравнения для линии графика с наилучшим соответствием, которая отображает для каждого образца из серии % ADCC, измеренный на стадии (i), в виде функции от % TAF-гликанов, определенного на стадии (ii),

определение % ADCC для композиции на основе антитела, и затем расчет % TAF с применением линейного уравнения из стадии (iii), и

осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если % TAF, рассчитанный на стадии (iv), находится в пределах целевого диапазона для % TAF.

Е47. Способ определения % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела, при этом указанный способ включает

определение % общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела;

расчет % ADCC композиции на основе антитела исходя из % TAF с применением уравнения А:

$$Y = 2,6 + 24,1 * X$$

[уравнение А],

где Y представляет собой % ADCC, и X представляет собой % TAF-гликанов, определенный на стадии (i).

Е48. Способ определения % антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) композиции на основе антитела, при этом указанный способ включает

определение % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела,

расчет % ADCC композиции на основе антитела исходя из % гликанов с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликанов с применением уравнения В:

$$Y = (0,24 + 27 * HM + 22,1 * AF)$$

[уравнение В],

где Y представляет собой % ADCC, HM представляет собой % гликанов с высоким содержанием маннозы, определенный на стадии (i), и AF представляет собой % афукозилированных гликанов, определенный на стадии (i), и

Е49. Способ по варианту осуществления 47 или варианту осуществления 48, дополнительно включающий осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если Y находится в пределах целевого диапазона для % ADCC.

Е50. Способ получения композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % TAF, при этом указанный способ включает следующие стадии:

получение линейного уравнения для графика наилучшего соответствия посредством нанесения на график % ADCC и % TAF-гликанов серии из по меньшей мере 5 эталонных композиций на основе антител, полученных в условиях культуры клеток, при этом каждая эталонная композиция на основе антитела имеет такую же аминокислотную последовательность, как и композиция на основе антитела;

осуществление выбора целевого диапазона для % TAF-гликанов на основании линейного уравнения, полученного на стадии (i), и требуемого % ADCC-активности;

культивирование композиции на основе антитела в условиях культуры клеток;

осуществление очистки композиции на основе антитела;
 осуществление сбора образцов композиции на основе антитела для определения % TAF и

определение, находится ли % TAF в композиции на основе антитела в пределах целевого диапазона для % TAF из стадии (ii).

E51. Способ по варианту осуществления 50, дополнительно включающий осуществление выбора композиции на основе антитела для одной или более последующих стадий обработки, если % TAF, рассчитанный на стадии (v), находится в пределах целевого диапазона для % TAF.

[00187] Следующие примеры даны лишь для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают каким-либо образом его объем.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

[00188] В данном примере описан иллюстративный способ определения профиля N-связанного гликозилирования для антитела.

[00189] Цель данного аналитического способа состоит в определении профиля N-связанного гликозилирования для конкретного антитела в образцах, содержащих антитело, посредством хроматографии гидрофильных взаимодействий. Данный способ на основе карты гликанов представляет собой количественный анализ чистоты в отношении распределения N-связанных гликанов антитела. Вкратце, N-связанные гликаны ферментативно высвобождают с применением N-гликозидазы F (PNGазы F) и концевой N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) дериватизируют с помощью флуорофора. Затем меченые гликаны отделяют с применением колонки для хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC). Аналитический способ состоит из данных стадий: (1) высвобождение и мечение N-связанных гликанов из эталонных и исследуемых образцов с применением PNGазы F и флуорофора, который может специфически дериватизировать свободный гликан, (2) загрузка образцов, находящихся в пределах валидированного линейного диапазона, в колонку для HILIC, при этом меченые N-связанные гликаны отделяют с применением снижающегося градиента органического растворителя, и (3) отслеживание элюирования соединений гликанов с помощью детектора флуоресценции.

[00190] Стандартные и исследуемые образцы получают посредством осуществления следующих стадий: (1) разбавляют образцы и контроли водой, (2) добавляют PNGазу F и инкубируют образцы и контроли с высвобождением N-связанных гликанов, (3) смешивают с раствором для мечения флуорофором с применением флуорофора, такого как 2-аминобензойная кислота. Перемешивают вихревым способом и инкубируют образцы и контроли, (4) центрифугируют с осаждением белка и удаляют надосадочную жидкость, и (5) высушивают и восстанавливают меченые гликаны в растворе для инъекции.

[00191] Реагенты, применяемые в данном анализе, представляют собой подвижную фазу А (100 mM формиат аммония, целевое значение pH 3,0) и подвижную фазу В

(ацетонитрил). Оборудование, применяемое для осуществления стадий способа, обладает следующими возможностями:

Возможности оборудования:
Система HPLC
Детектор флуоресценции, установленный на соответствующую длину волны возбуждения/эмиссии, оптимизированную для мечения флуорофором
Система сбора данных
Терморегулируемый автоматический пробоотборник
Колонка для хроматографии гидрофильных взаимодействий

[00192] Настройки прибора для HPLC с применением аналитической колонки для хроматографии гидрофильных взаимодействий 1,7 мкм, 2,1 мм ID X 150 мм приведены ниже:

Целевая загрузка образца	2 мкл
Заданное значение для нагревателя колонки	35°C
Заданное значение для автоматического пробоотборника	10°C
Выявление	Возбуждение 360 нм
	Эмиссия 425 нм

[00193] Рекомендуемый градиент приведен ниже:

Время (минуты)	Скорость потока (мл/минута)	Подвижная фаза А (%)	Подвижная фаза В (%)
0,0	0,25	22,0	78,0
111,2	0,25	40,1	59,9
117,9	0,20	90,0	10,0
124,5	0,20	90,0	10,0
129,1	0,25	22,0	78,0
155	0,25	22,0	78,0

[00194] Критерии пригодности системы приведены ниже:

Критерии пригодности системы

% RSD общей интегрированной площади пиков для всех инъекций эталонного стандарта должен составлять $\leq 10\%$ % RSD времени удерживания пика A2G0F для всех эталонных стандартов должен составлять $\leq 2\%$ % RSD площади пика A2G0F, M5 и A2G2F в процентах для всех инъекций эталонного стандарта должен составлять $\leq 5\%$ Отношение сигнал-шум для пика A2G0F для всех инъекций эталонного стандарта должно составлять $\geq$ порогового значения для предела количественного определения
Критерии приемлемости образца
Общая площадь пиков на основании общей интегрированной площади пиков для образца должна составлять от 50% до 150% от средней общей площади пиков для инъекций эталонного стандарта. Разница во времени удерживания для пика A2G0F между образцом и средним значением для всех инъекций эталонного стандарта должна составлять $\leq 0,5$ минуты

[00195] Результаты показаны следующим образом:

Показан % площади для общего афукозилирования, афукозилирования, высокого содержания маннозы и галактозилирования Примеры расчетов: % общего афукозилирования (% общего Afuc) = % A1G0 + % A2G0 + % A2G1(a) + % A2G1(b) + % A2G2 + % A1G1M5 + % M5 + % M6 + % M7
% высокого содержания маннозы (% HM) = % M5 + % M6 + % M7
% афукозилирования (% Afuc) = % A1G0 + % A2G0 + % A2G1(a) + % A2G1(b) + % A2G2 + % A1G1M5
% галактозилирования (% Gal) = % A2G1(a) + % A1G1F + % A2G1(b) + % A2G1F(a) + % A2G1F(b) + % A2G2 + % A3G1F + % A1G1M5 + % A2G2F + % A1G1M5F + % A3G2F(a) + % A3G2F(b) + % A2G2S1F(a) + % A2G2S1F(b)

[00196] Репрезентативная хроматограмма с картой гликанов показана на фигуре 2A (вид в натуральную величину) и фигуре 2B (вид в увеличенном масштабе).

ПРИМЕР 2

[00197] В данном примере описан иллюстративный анализ для оценки ADCC-активности антитела к CD20 с применением сконструированных эффекторных клеток.

[00198] Цель данного аналитического способа состоит в определении уровня антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) антитела, выраженного в виде %. Данный биоанализ ADCC представляет собой количественный клеточный анализ, с помощью которого измеряют способность антитела к CD20 дозозависимым образом опосредовать клеточную цитотоксичность в отношении экспрессирующих CD20 В-

лимфоцитов посредством связывания с CD20-антигеном на WIL2-S (В-лимфоците человека) и вовлечения рецепторов FcγRIIIA (158V) на эффекторных клетках NK92-M1 посредством Fc-домена антитела. Это приводит к активации эффекторной клетки и разрушению опухолевой клетки посредством экзоцитоза комплекса цитолитических гранул, содержащих перфорин/гранзим. Схема анализа ADCC представлена на фигуре 3, и репрезентативная кривая доза-ответ для анализа ADCC показана на фигуре 4. На фигуре 4 каждая дозовая точка представляет собой среднее±стандартное отклонение для 3 повторностей и сигнал при анализе=флуоресценция.

[00199] Способ состоит из данных стадий

Стадия	Действие
1	Мечение целевых клеток WIL2-S с помощью Calcein-AM
2	Добавление меченой суспензии клеток WIL2-S в планшет
3	Добавление разбавлений эталонного стандарта, контроля и исследуемого образца в планшет
4	Инкубирование при 37°C в увлажненном инкубаторе в течение 45-50 минут
5	Добавление эффекторных клеток NK92-M1 в соотношении 25:1 (эффектор: мишень)
6	Инкубирование при 37°C в увлажненном инкубаторе в течение 55-65 минут
7	Извлечение планшетов из инкубатора и центрифугирование при 750-850 об./мин. в течение 5 минут
8	Фильтрация 100 мкл надосадочной жидкости в аналитический планшет
9	Считывание аналитических планшетов с применением считывающего устройства для планшетов и анализ данных

[00200] Стандарт и исследуемые образцы получают посредством разбавления эталонного стандарта, аналитического контроля и образца с покрытием валидированного диапазона доз.

[00201] Реагенты, применяемые в ходе данного анализа, включают следующие реагенты, и приведена композиция каждого из них:

Реагент	Композиция
Среда для выращивания клеток WIL2-S	Среда RPMI 1640
Фетальная бычья сыворотка (FBS)	10% FBS в среде для выращивания
PSG	1 X пенициллин-стрептомицин-глутамин
Линия лимфобластных В-клеток человека (WIL2-S)	Культивирование

Среда для выращивания клеток NK92-M1	МЕМ-альфа
Лошадиная сыворотка	8% лошадиной сыворотки в среде для выращивания
Фетальная бычья сыворотка (FBS)	8% FBS в среде для выращивания
Миоинозитол	Коммерчески доступен
Фолиевая кислота	Коммерчески доступна
β -меркаптоэтанол	Коммерчески доступен
Бластицидин	Коммерчески доступен
Клетки NK92-M1	Культивирование
PSG	1 X пенициллин-стрептомицин-глутамин
Calcein-AM [®]	Коммерчески доступный реагент для флуоресцентного мечения клеток

[00202] На определенных стадиях способа требуется считывающего устройства для микропланшетов с возможностью работы с флуоресценцией.

[00203] Критерии пригодности системы являются следующими:

Анализ данных осуществляют с применением 4-параметрической логистической (4PL) аппроксимации кривой для каждой установки из трех планшетов. Анализ осуществляют с применением 2 аппроксимаций модельной кривой на основании данных для кривой доза-ответ. Полную модель аппроксимируют для определения, являются ли исследуемый образец и эталонный стандарт параллельными (формы кривой являются достаточно схожими).
Критерии приемлемости анализа
R^2 кривой для эталонного стандарта $\geq 0,95$ Соотношение макс. - мин. для эталонного стандарта должно превышать или быть эквивалентным 2 Относительная активность контроля должна быть в пределах 80-120% % CV для всех повторностей всех концентраций эталонного стандарта должен составлять $<15\%$ Контрольный образец должен отвечать всем критериям приемлемости образца
Критерии приемлемости образца

R^2 кривой для образца $\geq 0,95$

F-значение вероятности для исследуемого образца должно составлять $\geq 0,01$

% CV для всех повторностей всех концентраций исследуемого(-ых) образца(-ов) должен составлять $<15\%$

Три результата определения для образца должны находиться в пределах $\pm 25\%$ от среднего арифметического

[00204] Результаты показаны в виде % относительной ADCC.

ПРИМЕР 3

[00205] В данном примере описано исследование, которое привело к установлению модели, показывающей связь ADCC с уровнями гликанов.

[00206] Репрезентативные образцы (N= 41) антитела к CD20, полученные в мелкомасштабных биореакторах, оценивали в отношении уровней следующих гликоформ: гликоформ с высоким содержанием маннозы, афукозилированием и галактозилированием, с применением иллюстративного способа, описанного в примере 1. % общего афукозилирования (%TAF) представляет собой сумму % гликоформ с высоким содержанием маннозы и % афукозилирования. Уровни ADCC для каждого репрезентативного образца антитела к CD20 определяли посредством анализа, описанного в примере 2. Результаты приведены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

Образец	Высокое содержание маннозы (%)	Афукозилирование (%)	Общее афукозилирование (%)	Галактозилирование (%)	ADCC (%)
Образец А	1,656	2,470	4,126	60,017	110
Образец В	3,165	2,884	6,049	54,611	169
Образец С	2,057	1,326	3,383	58,090	86
Образец D	2,054	2,510	4,564	55,992	105
Образец E	2,028	2,383	4,411	57,525	102
Образец F	2,134	2,144	4,278	55,973	106
Образец G	2,865	2,698	5,563	56,957	143
Образец H	2,960	3,022	5,982	58,036	143
Образец I	2,185	1,596	3,781	56,888	92
Образец J	1,574	1,349	2,923	58,433	75
Образец K	1,941	2,059	4,000	53,868	94
Образец L	1,610	2,478	4,088	60,385	104
Образец M	1,496	2,034	3,530	60,419	81
Образец N	1,995	1,352	3,348	58,638	83

Образец O	2,121	1,842	3,962	54,106	102
Образец P	2,187	1,794	3,981	51,431	84
Образец Q	1,527	1,144	2,671	58,953	61
Образец R	1,749	1,914	3,663	56,991	84
Образец S	2,244	2,035	4,279	52,025	95
Образец T	1,814	1,689	3,504	54,068	76
Образец U	1,677	0,996	2,672	58,941	64
Образец V	1,573	1,221	2,794	59,691	67
Образец W	2,073	1,900	3,973	53,687	92
Образец X	1,615	1,181	2,796	57,400	67
Образец Y	1,597	1,028	2,626	58,113	67
Образец Z	2,551	2,380	4,931	57,280	122
Образец AA	1,940	1,216	3,156	55,795	88
Образец BB	1,877	1,307	3,184	54,237	86
Образец CC	1,737	1,260	2,997	59,487	82
Образец DD	2,085	2,158	4,243	58,090	108
Образец EE	2,102	2,034	4,136	54,150	97
Образец FF	1,363	1,045	2,408	62,542	75
Образец GG	1,838	1,641	3,479	51,823	80
Образец HH	2,133	2,044	4,178	57,188	92
Образец II	1,907	1,876	3,783	55,337	95
Образец JJ	2,030	2,104	4,134	54,992	105
Образец KK	2,235	1,318	3,554	52,830	85
Образец LL	2,016	1,144	3,161	54,867	75
Образец MM	1,844	1,294	3,138	55,187	87
Образец NN	1,835	1,764	3,599	56,959	101
Образец OO	1,529	1,184	2,714	59,766	78

[00207] Данные из таблицы 1 анализировали с применением набора компьютерных программ JMP для статистического анализа (SAS Institute, Кэри, Северная Каролина). График регрессии на основе данных представлен на фигуре 5А. На данной фигуре показана линия наилучшего соответствия для данных в виде графика, и ее можно описать с помощью следующего линейного уравнения, уравнения 1:

$$\%ADCC = 2,6129696497 + 24,071940292 * \%TAF$$

[уравнение 1].

[00208] Дополнительные статистические параметры приведены на фигуре 5В. Как

показано на данной фигуре, значимость связи между ADCC и TAF демонстрировали с помощью r^2 -значения ($r^2=0,88$) и p -значения ($p < 0,0001$).

[00209] С применением уравнения 1 и значений TAF из таблицы 1 рассчитывали прогнозируемое значение % ADCC для каждого образца в таблице 1. Фактический % ADCC (перечисленный в таблице 1) наносили на график в зависимости от прогнозируемого % ADCC на фигуре 5C. Результаты подтверждали существование прямой корреляции между общим афукозилированием и ADCC, где более высокий уровень общего афукозилирования приводил к более высокой ADCC-активности.

[00210] На фигуре 5D представлен тот же график, что и на фигуре 5A, но с графическим изображением 95% доверительного интервала (показан с помощью области светло-голубого цвета). Как показано на фигуре 5D, большинство точек данных попадали в пределы 95% доверительного интервала. На фигуре 5E представлен график, с помощью которого показан 95% доверительный интервал как для пересечения по оси y , так и наклона для уравнения 1.

[00211] Данные из таблицы 1 с использованием отдельных компонентов TAF (афукозилированных гликанов (AF) и гликанов с высоким содержанием маннозы (HM)) также анализировали с применением набора JMP и демонстрировали схожую корреляцию с ADCC. На фигурах 6A и 6B представлен график регрессии для этих данных в отношении гликанов с высоким содержанием маннозы и афукозилированных гликанов. На каждой из фигур 6A и 6B показана линия наилучшего соответствия для данных в виде графика, и ее можно описать с помощью следующего линейного уравнения, уравнения 2:

$$\%ADCC = 0,2358435425 + 27,030822634 * \%HM + 22,12397042 * \%AF$$

[уравнение 2].

[00212] Дополнительные статистические параметры приведены на фигуре 6C. Как показано на данной фигуре, значимость связи между ADCC и TAF демонстрировали с помощью r^2 -значений ($r^2=0,88$) и p -значений ($p < 0,0001$).

[00213] С применением уравнения 2 и значений для гликанов с высоким содержанием маннозы и афукозилированных гликанов из таблицы 1 рассчитывали прогнозируемое значение % ADCC для каждого образца в таблице 1. Фактический % ADCC (перечисленный в таблице 1) наносили на график в зависимости от прогнозируемого % ADCC на фигуре 6D. Результаты подтверждали существование прямой корреляции между афукозилированными гликанами, гликанами с высоким содержанием маннозы и ADCC, при этом более высокие уровни афукозилированных гликанов и гликанов с высоким содержанием маннозы приводили к более высокой ADCC-активности. Афукозилированные гликаны и гликаны с высоким содержанием маннозы оказывали схожее влияние на активность ADCC.

[00214] Связь ADCC с HM и AF (или TAF) являлась специфической по отношению к данным гликанам, так как галактозилирование не демонстрировало наличия статистически значимой связи. На фигуре 7A представлен график регрессии для ADCC и уровней галактозилирования. Отсутствие статистической значимости демонстрировали с

помощью r^2 -значений ($r^2=0,02$) и p -значения ($p < 0,3715$). На фигуре 7В представлен график для фактического % ADCC (перечисленного в таблице 1), построенного в виде функции от прогнозируемой ADCC. Как показано на данных фигурах, наблюдали только весьма слабую связь между ADCC и галактозилированием.

[00215] Как подтверждалось посредством статистического анализа, уровень TAF оказывал наиболее значимое влияние на активность ADCC. Связь уровней TAF с активностью ADCC очень отличалась от взаимосвязи % ADCC и других гликанов.

ПРИМЕР 4

[00216] В данном примере описано исследование для валидирования модели, показывающей связь ADCC и TAF.

[00217] Модель, описанная в примере 3, связывающая ADCC с TAF, валидировали с применением полученных при крупномасштабном изготовлении образцов того же антитела, образцы которого, упоминаемые в таблице 1, получали с помощью крупномасштабного реактора. Каждый образец, полученный при крупномасштабном изготовлении ($N=13$), характеризовали в отношении уровней TAF посредством измерения уровней гликанов с высоким содержанием маннозы и афукозилированных гликанов согласно способу, описанному в примере 1, и последующего суммирования % с получением уровней % TAF. Экспериментальный уровень ADCC для каждого образца, полученного при крупномасштабном изготовлении, определяли посредством осуществления анализа, описанного в примере 2, в двух повторностях с получением 3 значений на образец и последующего документирования среднего для 3 значений. Прогнозируемую ADCC рассчитывали с применением уравнения 1. Результаты приведены в таблице 2 ниже.

ТАБЛИЦА 2

№ образца	Общее афукозилирование	Экспериментальная ADCC*	Прогнозируемая ADCC
Образец 1	3,7	93	92
Образец 2	3,3	78	82
Образец 3	3,7	92	92
Образец 4	3,5	93	87
Образец 5	3,2	83	79
Образец 6	3,0	88	76
Образец 7	3,6	88	89
Образец 8	3,2	79	80
Образец 9	3,8	95	93

Образец 10	3,7	90	92
Образец 11	3,9	92	97
Образец 12	3,8	93	94
Образец 13	3,8	87	94

*среднее для трех значений

[00218] Как показано с помощью данных в таблице 2, результаты в виде прогнозируемой ADCC, полученные с помощью уравнения 1, показывают стойкое соответствие представленным экспериментальным результатам. Таким образом, была установлена надежная и точная модель, связанная с ADCC и TAF.

ПРИМЕР 5

[00219] В данном примере описана новая гликановая модель, служащая в качестве основы для прогнозирования ADCC для антитела к CD20.

[00220] Антитело к CD20 разрабатывали в виде биоаналога ритуксимаба. Оно представляет собой рекомбинантное химерное мышиное/человеческое моноклональное антитело IgG1, которое специфически связывается с антигеном CD20, экспрессирующимся на В-клетках, и способствует уничтожению В-клеток посредством множества механизмов, где ADCC является одним из важных механизмов действия. Точно установлено, что отсутствие фукозы при остове приводит к повышению ADCC-активности, в то время как галактозилирование и высокое содержание маннозы может также играть роль. Систематическую оценку влияния N-гликанов на ADCC-активность антитела к CD20 осуществляли с помощью исследований с использованием гликоинженерии, и было подтверждено существование прямой корреляции между афукозилированными гликанами, высоким содержанием маннозы и ADCC, при этом более высокие уровни афукозилированных гликанов и гликанов с высоким содержанием маннозы приводили к более высокой ADCC-активности. Однако профиль гликанов для образцов, полученных посредством гликоинженерии, может не являться полностью репрезентативным в отношении диапазона характеристик гликанов для антитела к CD20, осуществляли статистическую оценку наборов данных для антитела к CD20, полученных в мелкомасштабном биореакторе, для установления репрезентативной гликановой модели ADCC посредством захвата полного диапазона в процессе изготовления антитела к CD20. С применением данного подхода было показано, что афукозилирование и высокое содержание маннозы демонстрировали схожую корреляцию с ADCC. В отношении гликановой модели применяли новую методологию, состоящую в том, что уровень общего афукозилирования (сумму уровня афукозилирования и высокого содержания маннозы) применяли для прогнозирования ADCC антитела к CD20. Прогностическое выражение ($ADCC = 2,6 + 24,1 \times \text{уровень общего афукозилирования}$) устанавливали и валидировали с применением данных для крупномасштабного изготовления. Прогнозируемый результат для ADCC, полученный с помощью выражения, показал

стойкое соответствие представленным результатам анализа ADCC. Таким образом, устанавливали корреляцию уровня общего афукозилирования и ADCC в виде модели гликан-ADCC и обеспечивали способ отслеживания ADCC с применением измерения уровня гликанов в виде ортогонального подхода.

[00221] Результат данной работы определил основу для корреляции уровня гликанов с результатами для ADCC в функциональных анализах между антителом к CD20 и ортогональным способом (способом анализа гликанов на основе HPLC). Данные позволили Amgen продолжить использование направленного на качество подхода к разработке и установленного механизма, обусловившего результаты, а также обеспечить новый качественный анализ для применения в коммерческих целях.

[00222] Используемые подходы включали HPLC, анализ ADCC и кросс-функциональное сотрудничество

ПРИМЕР 6

[00223] В данном примере показано исследование, которое привело к установлению модели, показывающей связь ADCC и уровней гликанов для второго антитела.

[00224] В примере 3 описано исследование, которое привело к установлению модели, показывающей связь ADCC и уровней гликанов для IgG1, который связывается с CD20. В данном исследовании осуществляется оценка связи между ADCC и уровнями гликанов для химерного моноклонального антитела IgG1 с каппа-цепью, состоящего из человеческого константного участка и мышиного вариабельного участка и связывающегося с антигеном TNF α .

[00225] Репрезентативные образцы второго антитела (антитела к TNF α), полученные в мелкомасштабных биореакторах, оценивали в отношении уровней следующих гликоформ: гликоформ с высоким содержанием маннозы, афукозилированных гликоформ, с применением иллюстративного способа, описанного в примере 1. Процентная доля общих афукозилированных гликоформ (%TAF) представляет собой сумму % гликоформ с высоким содержанием маннозы и % афукозилированных гликоформ. Уровни ADCC для каждого репрезентативного образца антитела к TNF α определяли посредством анализа, описанного в примере 2. Данные анализировали с применением набора компьютерных программ JMP для статистического анализа (SAS Institute, Кэри, штат Северная Каролина, США). График регрессии на основе данных представлен на фигуре 8A. На данной фигуре показана линия наилучшего соответствия для данных в виде графика, и ее можно описать с помощью следующего линейного уравнения, уравнения 3:

$$\%ADCC=9,3+12,47 * \%TAF$$

[уравнение 3].

[00226] Дополнительные статистические параметры приведены на фигуре 8B. Как показано на данной фигуре, значимость связи между ADCC и TAF демонстрировали с помощью r^2 -значения ($r^2=0,80$) и p -значения ($p < 0,0001$).

[00227] С применением уравнения 3 и измеренных значений TAF рассчитывали прогнозируемое значение % ADCC для каждого образца. Фактический % ADCC (измеренный, как описано в примере 2) наносили на график в зависимости от прогнозируемого % ADCC на фигуре 8C. Результаты подтверждали существование прямой корреляции между общим афукозилированием и ADCC, где более высокий уровень общего афукозилирования приводил к более высокой ADCC-активности.

[00228] На фигуре 8D представлен тот же график, что и на фигуре 8A, но с графическим изображением 95% доверительного интервала (показан с помощью области, выделенной серым цветом). Как показано на фигуре 8D, большинство точек данных попадали в пределы 95% доверительного интервала. На фигуре 8E представлен график, с помощью которого показан 95% доверительный интервал как для пересечения по оси y, так и наклона для уравнения 3.

[00229] Данные с использованием отдельных компонентов TAF (афукозилированных гликанов (AF) и гликанов с высоким содержанием маннозы (HM)) также анализировали с применением набора JMP и демонстрировали схожую корреляцию с ADCC. На фигурах 9A и 9B представлен график регрессии для этих данных в отношении гликанов с высоким содержанием маннозы и афукозилированных гликанов соответственно. На каждой из фигур 9A и 9B показана линия наилучшего соответствия для данных в виде графика, и ее можно описать с помощью следующего линейного уравнения, уравнения 4:

$$\%ADCC=8,66+12,86 * \%HM+12,37 * \%AF$$

[уравнение 4].

[00230] Дополнительные статистические параметры приведены на фигуре 9C. Как показано на данной фигуре, значимость связи между ADCC и TAF демонстрировали с помощью r^2 -значений ($r^2=0,8$) и p-значений ($p < 0,0001$).

[00231] С применением уравнения 4 и измеренных значений для гликанов с высоким содержанием маннозы и афукозилированных гликанов рассчитывали прогнозируемое значение % ADCC для каждого образца. Фактический % ADCC (измеренный, как описано в примере 2) наносили на график в зависимости от прогнозируемого % ADCC на фигуре 9D. Результаты подтверждали существование прямой корреляции между афукозилированными гликанами, гликанами с высоким содержанием маннозы и ADCC, при этом более высокие уровни афукозилированных гликанов и гликанов с высоким содержанием маннозы приводили к более высокой ADCC-активности. Афукозилированные гликаны и гликаны с высоким содержанием маннозы оказывали схожее влияние на активность ADCC.

[00232] В данном примере продемонстрировано, что для второго антитела (антитела к TNF α) с помощью статистического анализа было подтверждено весьма значительное влияние TAF на активность ADCC.

ПРИМЕР 7

[00233] В данном примере демонстрируется второй набор моделей, показывающих

связь ADCC с TAF-, HM- и/или AF-гликанами.

[00234] В каждом из примеров 3 и 6 устанавливали линейную регрессионную модель, показывающую связь ADCC с содержанием TAF-гликанов или ADCC с HM и содержанием AF-гликанов для двух антител: антитела к CD20 и антитела к TNF-альфа. Модели математически описаны в уравнениях 1-4. Для каждого из данных уравнений значимость пересечения по оси у оценивали посредством анализа р-значения для пересечения по оси у для каждого уравнения. В таблице 3 приведены р-значения для пересечений по оси у для каждого из уравнений 1-4.

ТАБЛИЦА 3

Уравнение	Р-значение
1	0,6331
2	0,9705
3	0,3399
4	0,4426

[00235] Поскольку каждое из р-значений составляло более чем 0,05, каждое пересечение по оси у для уравнений 1-4 было принято как близкое к нулю и могло быть исключено из уравнения.

[00236] С учетом всего вышеуказанного измеренные данные для ADCC и измеренные данные для гликанов были повторно аппроксимированы в отношении "модели без пересечения по оси у" и оценивали статистическую значимость данных моделей. В таблице 4 приведены уравнения для модели без пересечения по оси у, описывающие взаимосвязь между ADCC и TAF-гликанами или ADCC и HM- и AF-гликанами для двух антител.

ТАБЛИЦА 4

Антитело	Экв. №	Модель без пересечения по оси у	Статистические параметры
Антитело к CD20	5	$ADCC = 24,73579 * TAF$	$r^2 = 0,9938$ р-значение <0,0001
	6	$ADCC = 27,14941 * HM + 22,12018 * AF$	$r^2 = 0,9939$ р-значение <0,0001
Антитело к TNF α	7	$ADCC = 13,47790 * TAF$	$r^2 = 0,9898$ р-значение <0,0001
	8	$ADCC = 14,84841 * HM + 12,78827 * AF$	$r^2 = 0,9899$ р-значение <0,0001

[00237] Как показано в таблице 4, модели без пересечения по оси у являются статистически значимыми и представляют собой альтернативные модели, которые демонстрируют корреляцию ADCC с содержанием TAF-гликанов или ADCC с HM и

содержанием AF-гликанов.

[00238] В таблице 5 приведены наклоны для каждой из линейных регрессионных моделей и моделей без пересечения по оси у.

ТАБЛИЦА 5

		Наклон для линейной регрессионной модели для указанного гликана	Наклон для модели без пересечения по оси у для указанного гликана
Антитело к CD20	TAF	24,07070 (0,93857)	24,73579 (0,99690)
	HM	27,03082 (0,47699)	27,14941 (0, 57227)
	AF	22,12397 (0,55327)	22,12018 (0,43068)
Антитело к TNF-альфа	TAF	12,46779 (0,89445)	13,47790 (0,99489)
	HM	12,86320 (0,29957)	14,84841 (0,37364)
	AF	12,37266 (0,75188)	12,78827 (0,63092)

Стандартизированные расчетные данные приведены в ().

[00239] Как показано в таблице 5, две модели в высокой степени согласуются друг с другом. Пересечения по оси х для TAF (24,07070 по сравнению с 24,73579) в каждой из линейных регрессионных моделей и модели без пересечения по оси у являлись очень близкими по значению. То же самое наблюдали для каждого из HM- (27,03082 по сравнению с 27,14941) и AF-гликанов (22,12397 по сравнению с 22,12018).

ПРИМЕР 8

[00240] В данном примере демонстрируется, что модели ADCC-TAF и модели ADCC-HM/AF являются взаимозаменяемыми.

[00241] Уравнение 6 из таблицы 4, показывающее корреляцию ADCC с HM и содержанием AF-гликанов, применяли для расчета прогнозируемой ADCC. Прогнозируемую ADCC наносили на график по сравнению с прогнозируемой ADCC, рассчитанной согласно уравнению 5 из таблицы 4, которое показывает корреляцию ADCC с содержанием TAF-гликанов. Результаты представлены в виде графика на фигуре 10A. Такие же стадии осуществляли для уравнений 7 и 8 из таблицы 4 и представляли в виде графика на фигуре 10B. Уравнение для линии наилучшего соответствия приведено под каждым графиком. Как показано на данных фигурах и в уравнениях, модели в высокой

степени согласуются друг с другом ($p < 0,0001$). Наклоны составляют около 1,0 (0,97 или 0,98). Эти данные подтверждают, что ADCC композиции на основе антитела можно прогнозировать исходя из одного типа гликанов (TAF-гликанов) по сравнению с двумя типами гликанов (HM и AF). Кроме того, эти данные позволяют предположить, что для композиции на основе антитела с целевой ADCC можно рассчитать целевой уровень TAF, и либо уровень HM, либо уровень AF можно модифицировать для достижения целевого уровня TAF. Способы модифицирования уровня HM или AF в композиции на основе антитела являются более простыми по сравнению с комбинированием способов модифицирования обоих из уровней HM и AF.

[00242] Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждый документ был отдельно и конкретно указан как включенный посредством ссылки и был представлен во всей своей полноте в данном документе.

[00243] Использование терминов в единственном числе, множественном числе и подобных определений в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) должны толковаться как охватывающие как единственное число, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Термины "состоящий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует понимать, как открытые термины (т. е. означающие "включающий без ограничения"), если не указано иное.

[00244] Предусматривается, что приведение диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения индивидуального указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон, и каждой конечной точки, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение и конечная точка включены в настоящее описание, как если бы они были индивидуально упомянуты в данном документе.

[00245] Все способы, описанные в данном документе, можно выполнять в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе, или иное явно не противоречит контексту. Применение любых видов примеров или иллюстративных формулировок (например, "такой как"), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения и не накладывает ограничений на объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна толковаться как указывающая на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации настоящего изобретения.

[00246] В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, включая наилучший способ, известный авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Вариации этих

предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения вышеуказанного описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в данной области техники будут использовать такие вариации соответствующим образом, и авторы настоящего изобретения предполагают, что настоящее изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, упомянутого в прилагаемой к данному документу формуле изобретения, в установленных применимым законом пределах. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариациях охватывается настоящим изобретением, если в данном документе не указано иное, или иное явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения качества продукта для композиции на основе антитела, где уровень ADCC-активности композиции на основе антитела представляет собой критерий, на котором основано качество продукта для композиции на основе антитела, при этом указанный способ включает

i. определение содержания общих афукозилированных (TAF) гликанов в образце композиции на основе антитела,

ii. определение качества продукта для композиции на основе антитела как приемлемого и/или достигающего критерия уровня ADCC-активности, если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), находится в пределах целевого диапазона,

где целевой диапазон содержания TAF-гликанов основан на (1) целевом диапазоне уровней ADCC-активности для эталонного антитела и (2) первой модели, которая демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием TAF-гликанов в композиции на основе антитела,

где ADCC, прогнозируемая с помощью первой модели, составляет от приблизительно 95% до приблизительно 105% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели, где вторая модель демонстрирует корреляцию уровня ADCC-активности композиции на основе антитела с содержанием гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) и содержанием афукозилированных (AF) гликанов в композиции на основе антитела.

2. Способ по п. 1, где ADCC, прогнозируемая с помощью первой модели, составляет приблизительно 100% от ADCC, прогнозируемой с помощью второй модели.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где р-значение для первой модели составляет менее чем 0,0001 и/или р-значение для второй модели составляет менее чем 0,0001.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 12Q * \% \text{ TAF}$, где Q представляет собой число сайтов связывания с антителом на антигене, с которыми связывается антитело, и $\% \text{ TAF}$ представляет собой содержание TAF-гликанов в композиции на основе антитела.

5. Способ по п. 4, где Q равняется 2.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 24 * \% \text{ TAF}$.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью второй модели, составляет $\sim 27 * \% \text{ НМ} + \sim 22 * \% \text{ AF}$, где $\% \text{ AF}$ представляет собой содержание AF-гликанов в композиции на основе антитела, и $\% \text{ НМ}$ представляет собой содержание НМ-гликанов в композиции на основе антитела.

8. Способ по п. 4, где Q равняется 1.

9. Способ по любому из пп. 1-4 и п. 8, где уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью первой модели, составляет $\sim 12 * \% \text{ TAF}$.

10. Способ по пп. 1-3, п. 7 и п. 8, где уровень ADCC-активности, прогнозируемый с помощью второй модели, составляет $\sim 14,8 * \% \text{ НМ} + \sim 12,8 * \% \text{ AF}$.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, где эталонное антитело представляет собой ритуксимаб.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где эталонное антитело представляет собой инфликсимаб.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ представляет собой анализ в рамках контроля качества (QC).

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ представляет собой анализ в рамках внутрипроизводственного QC.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, где образец представляет собой образец материала, полученного в процессе производства.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, где содержание TAF-гликанов определяют до сбора или после сбора.

17. Способ по любому из предыдущих пунктов, где содержание TAF-гликанов определяют после стадии с применением хроматографии.

18. Способ по п. 17, где стадия с применением хроматографии предусматривает осуществление хроматографии на основе захвата, промежуточной хроматографии и/или хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку.

19. Способ по п. 17 или п. 18, где содержание TAF-гликанов определяют после инактивации и нейтрализации вирусов, фильтрации для удаления вирусов или замены буфера.

20. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ представляет собой анализ при выпуске партий.

21. Способ по любому из предыдущих пунктов, где образец получают из производственной партии.

22. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий осуществление выбора композиции на основе антитела для последующей обработки, если содержание TAF-гликанов находится в пределах целевого диапазона.

23. Способ по любому из предыдущих пунктов, где если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то одно или более условий культивирования клеток подвергают модификации с получением модифицированной культуры клеток.

24. Способ по п. 23, дополнительно включающий определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела, полученной после того, как одно или более условий культивирования клеток были модифицированы.

25. Способ по любому из предыдущих пунктов, где если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то способ дополнительно включает (iii) модифицирование одного или более условий культивирования клеток с получением модифицированной культуры клеток и (iv) определение содержания TAF-гликанов в образце композиции на основе антитела, полученной из модифицированной культуры клеток.

26. Способ по п. 25, где если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то способ дополнительно включает осуществление стадий (iii) и (iv) до тех пор, пока содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (iv), не будет находиться в пределах целевого диапазона.

27. Способ по любому из предыдущих пунктов, где анализ, посредством которого непосредственно измеряют значение ADCC-активности композиции на основе антитела, выполняют в отношении композиции на основе антитела только в случае, если содержание TAF-гликанов находится за пределами целевого диапазона.

28. Способ по любому из предыдущих пунктов, где анализ, посредством которого непосредственно измеряют значение ADCC-активности композиции на основе антитела, не выполняют в отношении композиции на основе антитела, если содержание TAF-гликанов находится в пределах целевого диапазона.

29. Способ по п. 23 или п. 24, где анализ, посредством которого непосредственно измеряют значение ADCC-активности, представляет собой клеточный анализ, посредством которого измеряют высвобождение выявляемого реагента после лизиса экспрессирующих антиген клеток, содержащих выявляемое средство, с помощью эффекторных клеток, которые связаны с антителом, связывающимся как с клетками, экспрессирующими антиген, так и с эффекторными клетками.

30. Способ отслеживания качества продукта для композиции на основе антитела, включающий определение качества продукта для композиции на основе антитела в соответствии со способом по любому из предыдущих пунктов, при этом первый образец получают в первый момент времени и второй образец получают во второй момент времени, который отличается от первого момента времени.

31. Способ по п. 30, где каждый из первого образца и второго образца представляет собой образец материала, полученного в процессе производства.

32. Способ по п. 30, где первый образец представляет собой образец материала, полученного в процессе производства, и второй образец представляет собой образец из производственной партии.

33. Способ по п. 30, где первый образец представляет собой образец, полученный до того, как одно или более условий культивирования клеток были модифицированы, и второй образец представляет собой образец, полученный после того, как одно или более условий культивирования клеток были модифицированы.

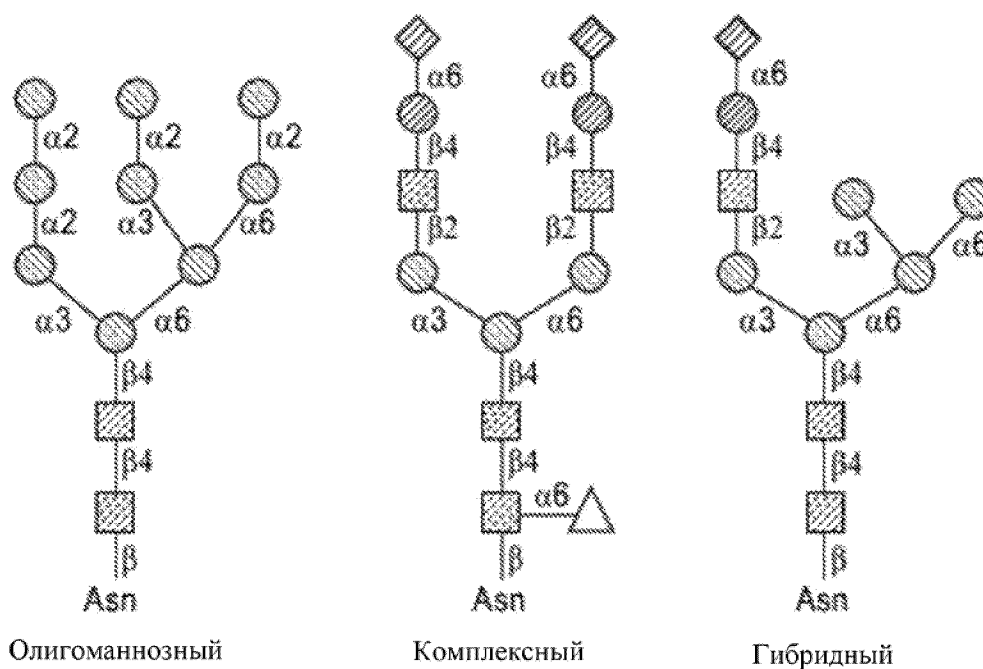
34. Способ получения композиции на основе антитела, включающий определение качества продукта для композиции на основе антитела, где качество продукта для композиции на основе антитела определяют в соответствии со способом по любому из предыдущих пунктов, где образец представляет собой образец материала, полученного в процессе производства, где если содержание TAF-гликанов, определенное на стадии (i), не находится в пределах целевого диапазона, то способ дополнительно включает (iii) модифицирование одного или более условий культивирования клеток с получением модифицированной культуры клеток и (iv) определение содержания TAF-гликанов в

образце композиции на основе антитела, полученной из модифицированной культуры клеток, необязательно повторение стадий (ii) и (iii) до тех пор, пока содержание TAF-гликанов не будет находиться в пределах целевого диапазона.

35. Способ по п. 34, где одно или более условий культивирования клеток модифицируют для преимущественного изменения содержания НМ-гликанов с достижением целевого диапазона содержания TAF-гликанов.

36. Способ по п. 34, где одно или более условий культивирования клеток модифицируют для преимущественного изменения содержания AF-гликанов с достижением целевого диапазона содержания TAF-гликанов.

По доверенности



Условные обозначения распространенных моносахаридов и связей

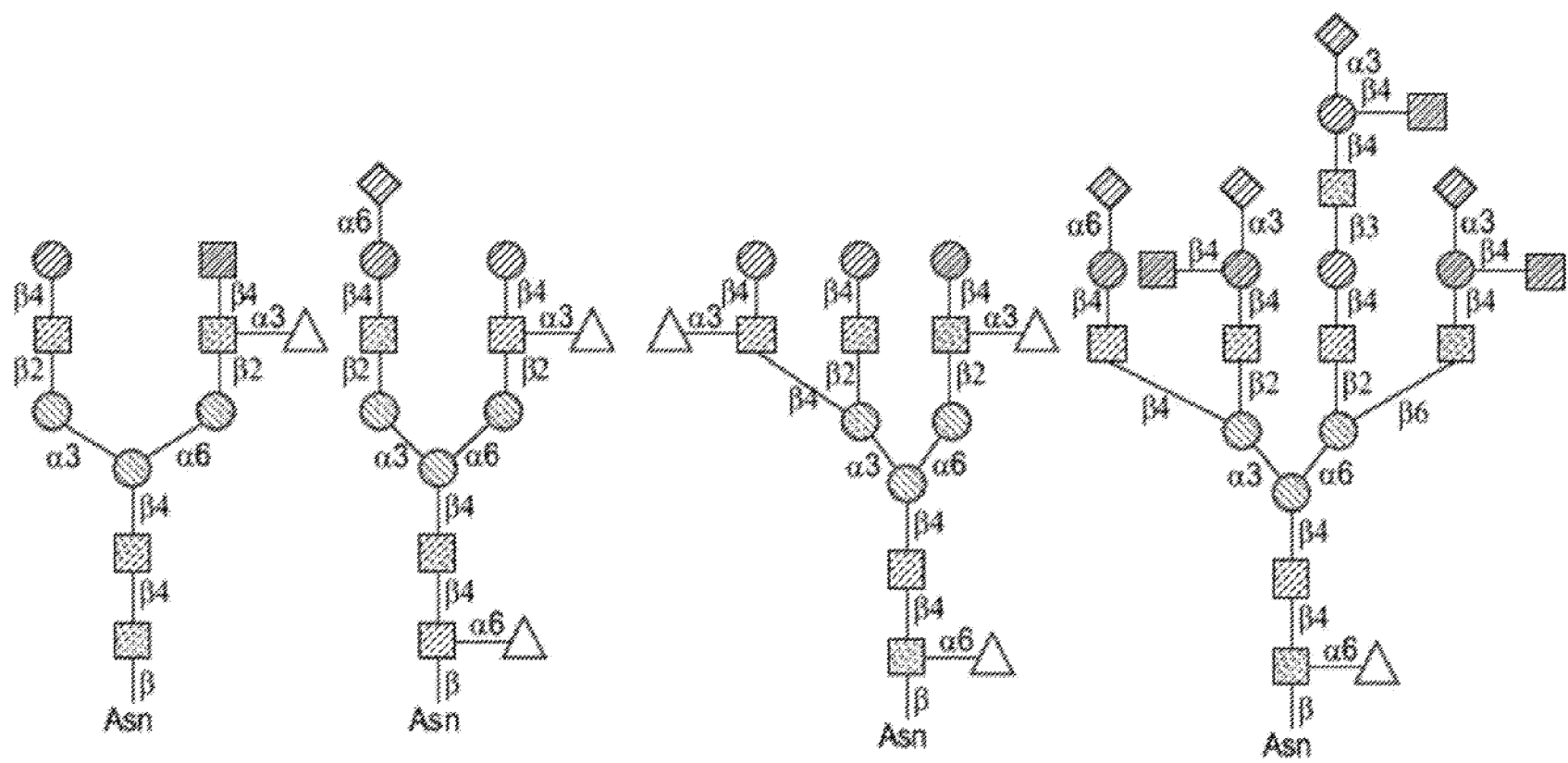
● Галактоза (Gal)	☆ Ксилоза (Xyl)
■ N-Ацетилгалактозамин (GalNAc)	◆ N-Ацетилнейраминовая кислота (Neu5Ac)
▨ Галактозамин (GalN)	◆ N-Гликолилнейраминовая кислота (Neu5Gc)
● Глюкоза (Glc)	◆ 2-Кето-3-дезоксинановая кислота (Kdn)
■ N-Ацетилглюкозамин (GlcNAc)	△ Фукоза (Fuc)
▨ Глюкозамин (GlcN)	◆ Глюкуроновая кислота (GlcA)
● Манноза (Man)	◆ Идуоновая кислота (IdoA)
■ N-Ацетилманнозамин (ManNAc)	◆ Галактуроновая кислота (GalA)
▨ Маннозамин (ManN)	◆ Маннуоновая кислота (ManA)

Другие моносахариды

При необходимости буквенное обозначения пользователя
внутри символа для уточнения

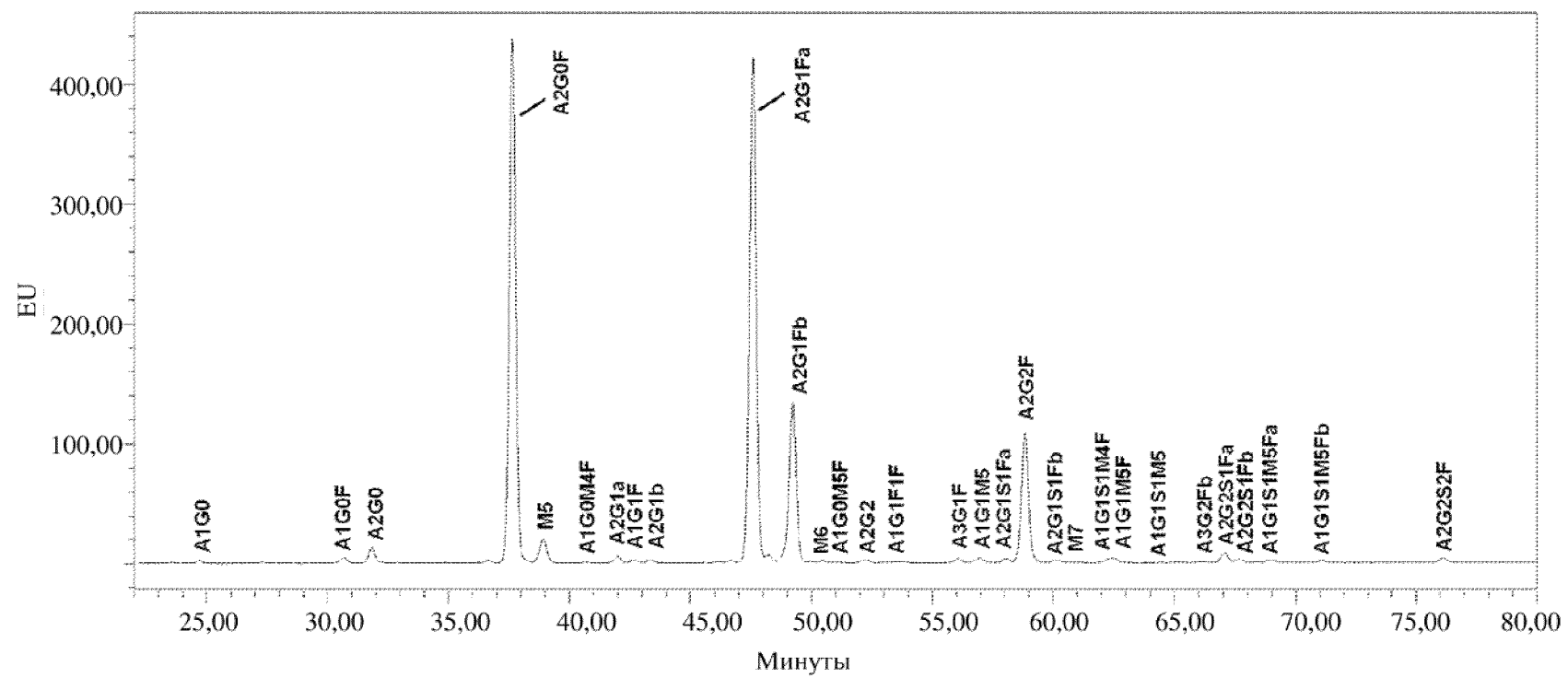


ФИГУРА 1А

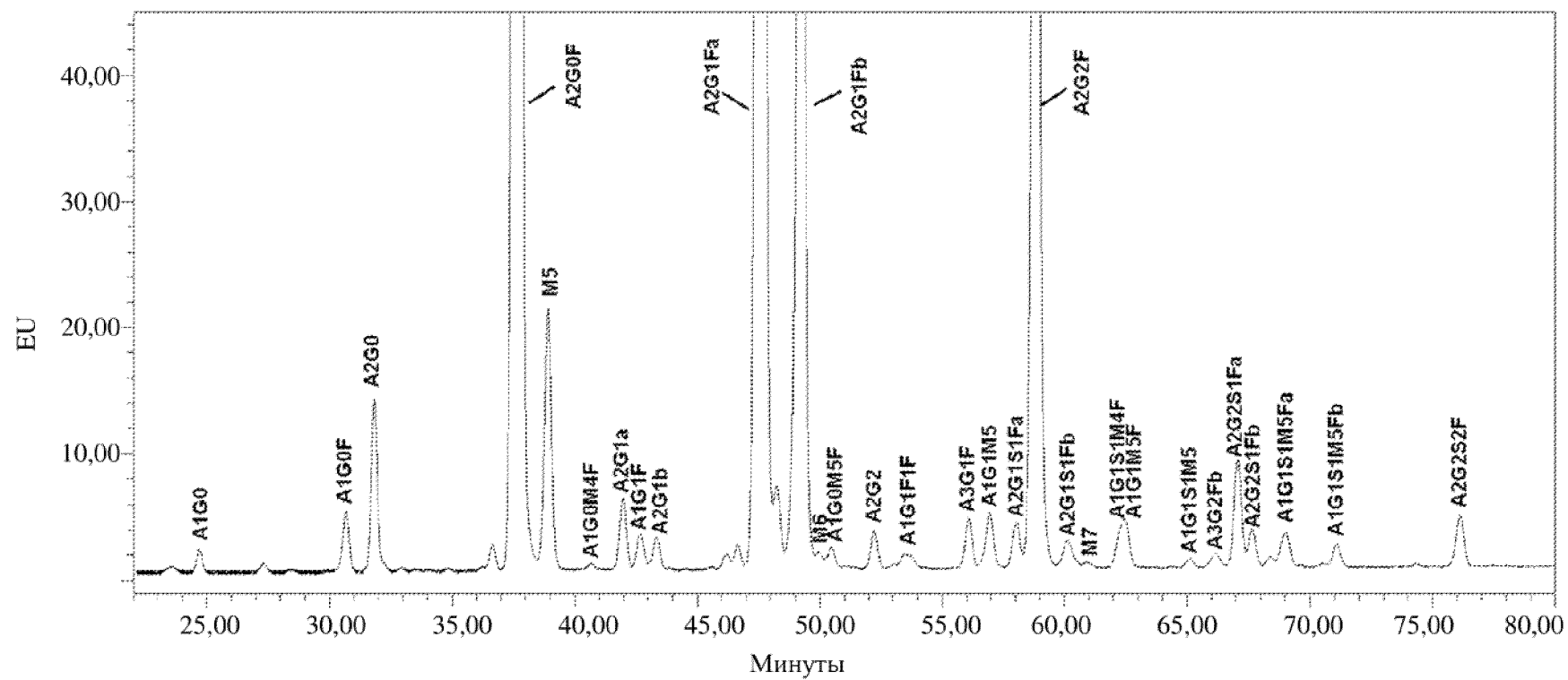


ФИГУРА 1В

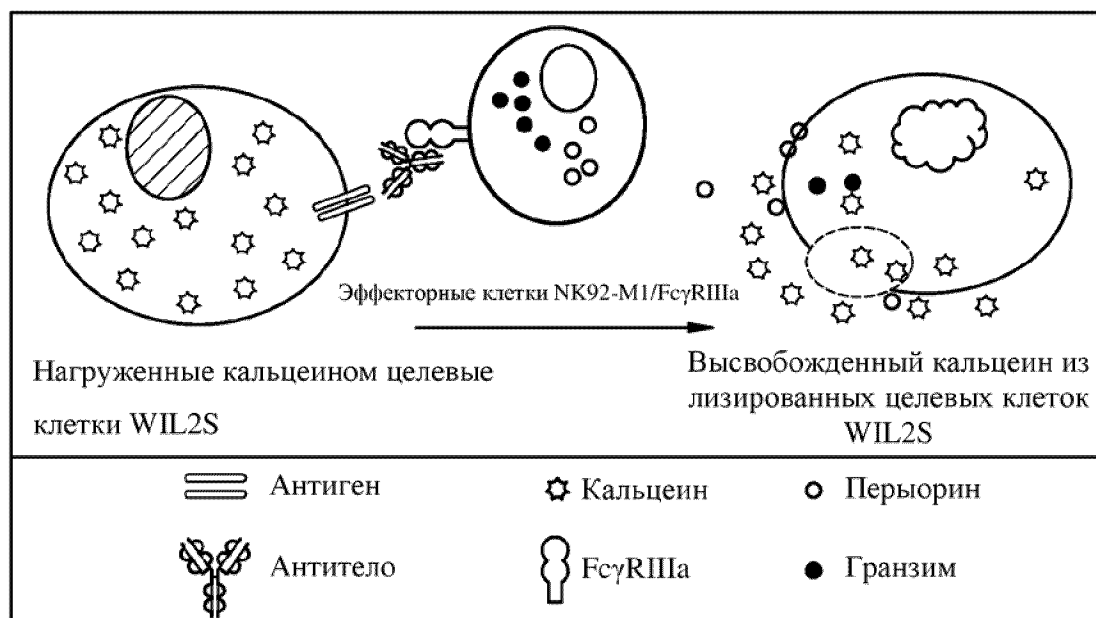
ФИГ. 2А



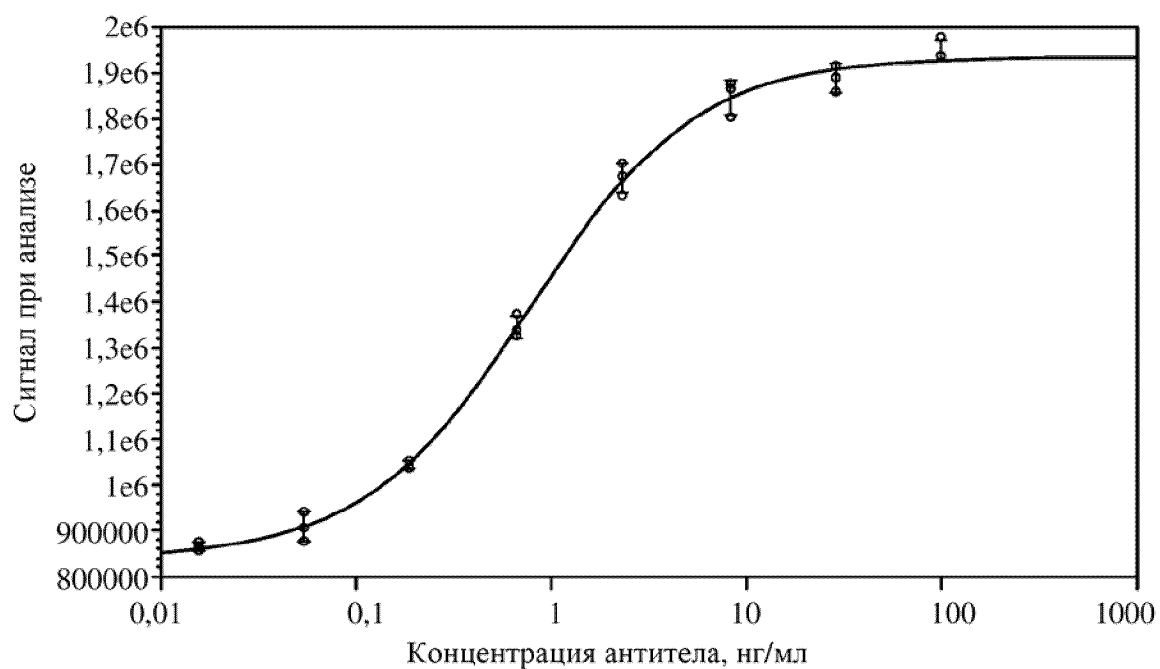
ФИГ. 2В



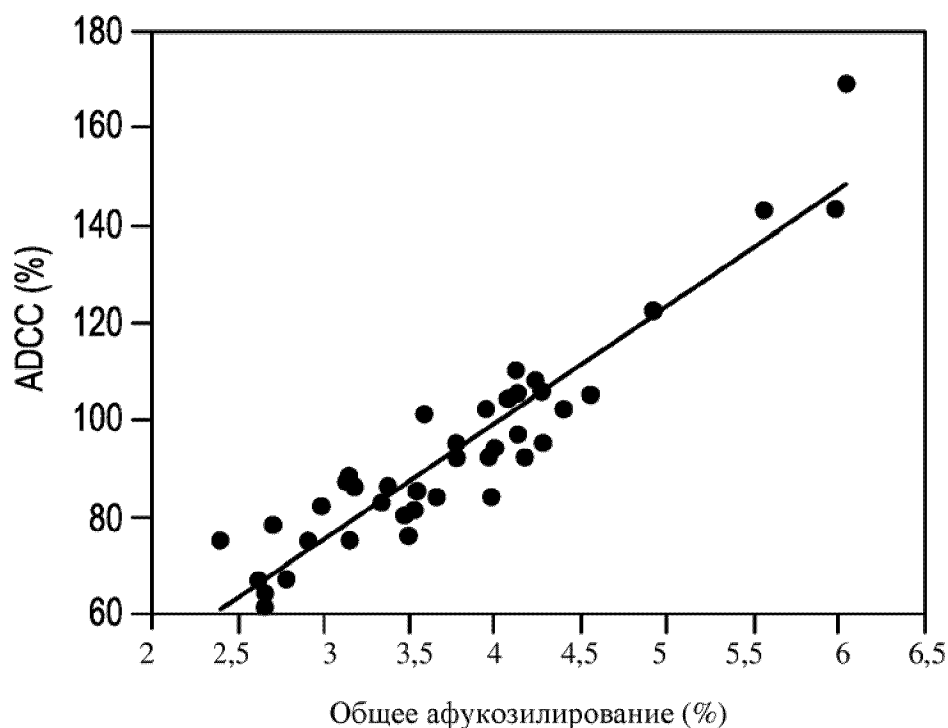
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В

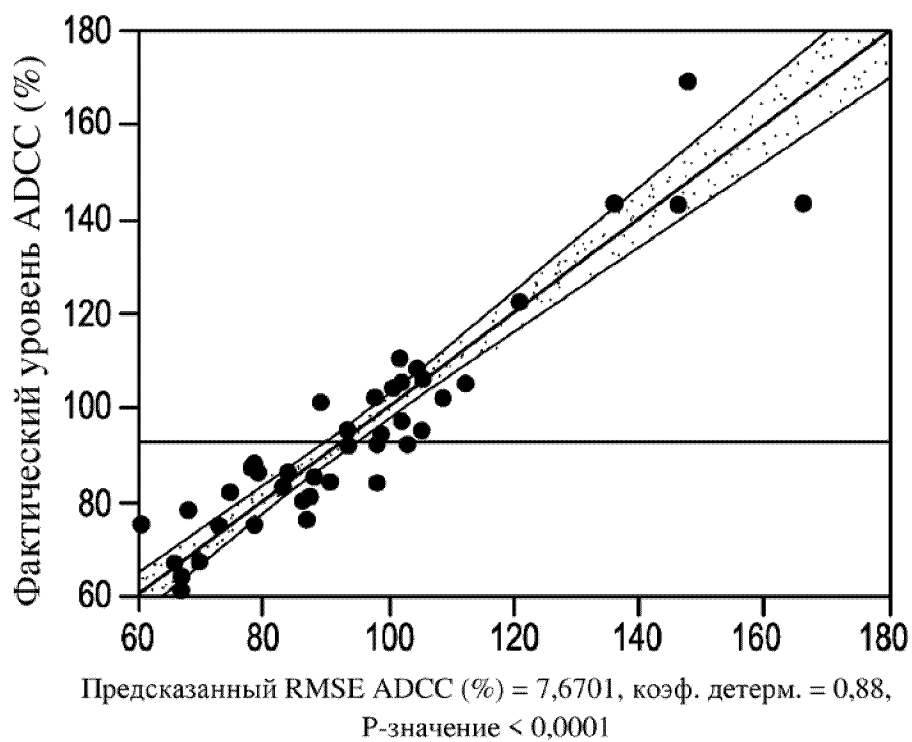
▲ Сводка соответствия	
Коэф. детерм.	0,880874
Подог. коэф. детерм.	0,877819
Среднеквадратичная ошибка	7,670145
Среднее значение ответа	92,87805
Наблюдения (или сумма весов)	41

▲ Дисперсионный анализ				
Источник	DF	Сумма квадратов	Среднее значение квадрата	F-соотношение
Модель	1	16965,976	16966,0	288,3844
Ошибка	39	2294,414	58,8	Возм. > F
С. общее	40	19260,390		< 0,0001*

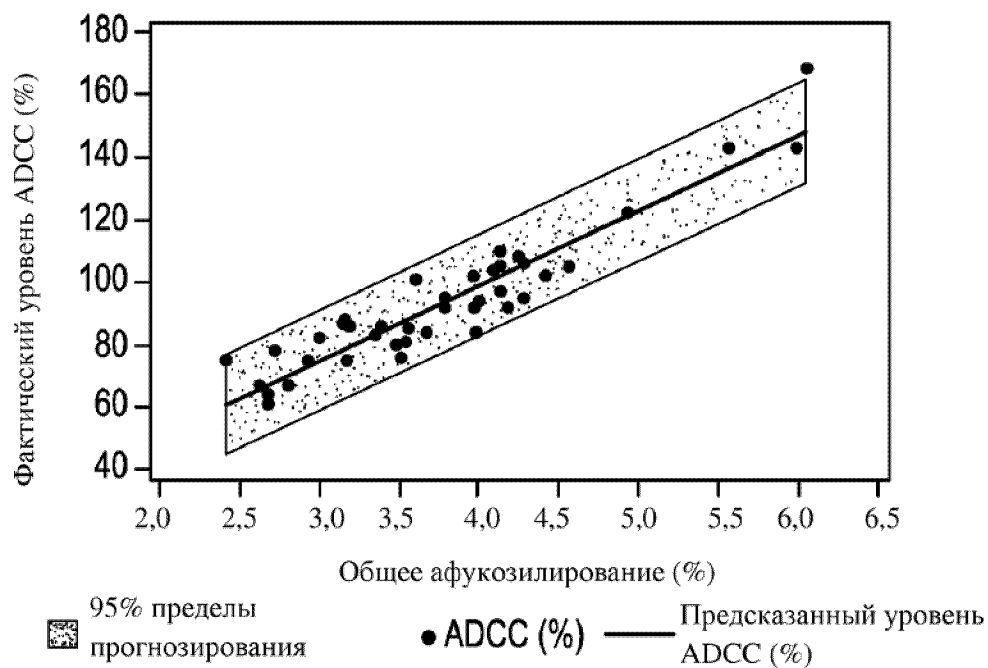
▲ Оценки параметров					
Термин		Оценка	Станд. ошибка	t-соотношение	Возм. > t
Точка пересечения		2,6129696	5,44868	0,48	0,6342
Общее афукозилирование (%)		24,07194	1,417507	16,98	< 0,0001*
▶	Эффективные тесты				
▲ Предсказанная экспрессия					

$$2,6129696497 + 24,071940292 \cdot \text{общее афукозилирование (\%)}$$

ФИГ. 5С



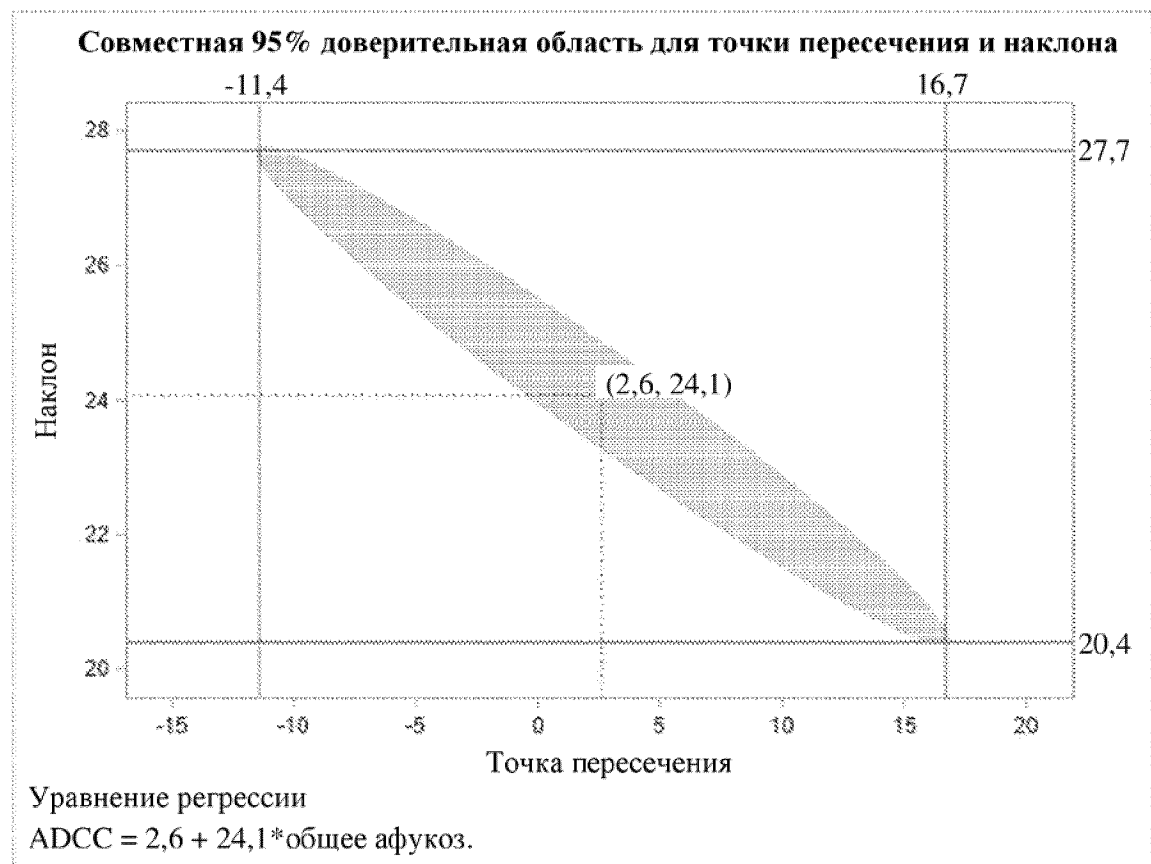
ФИГ. 5D



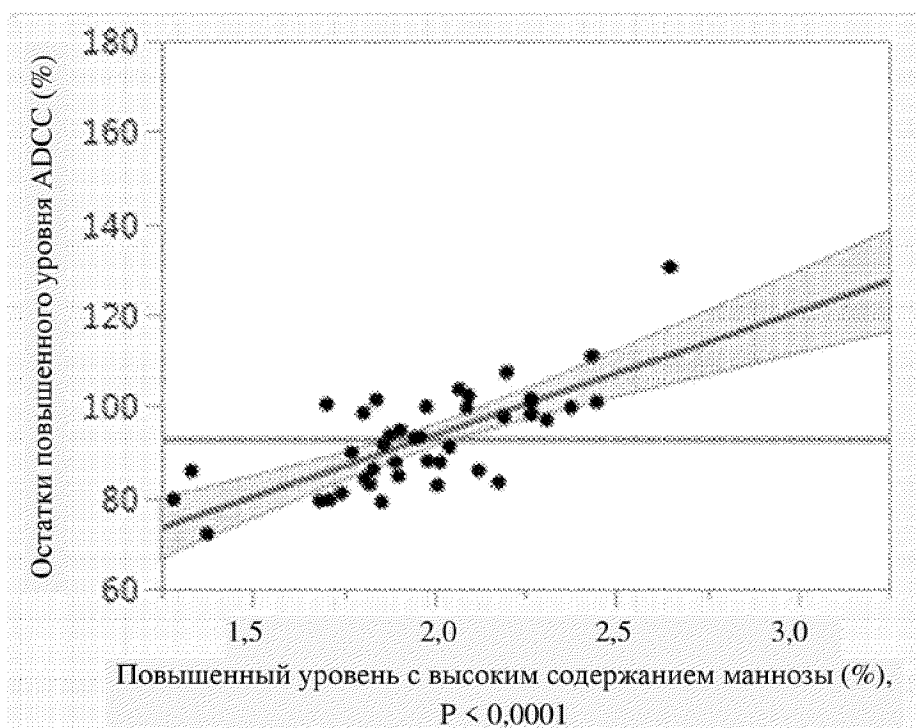
Уравнение регрессии

$$ADCC = 2,6129696497 + 24,071940292 \cdot \text{общее афукоз.}$$

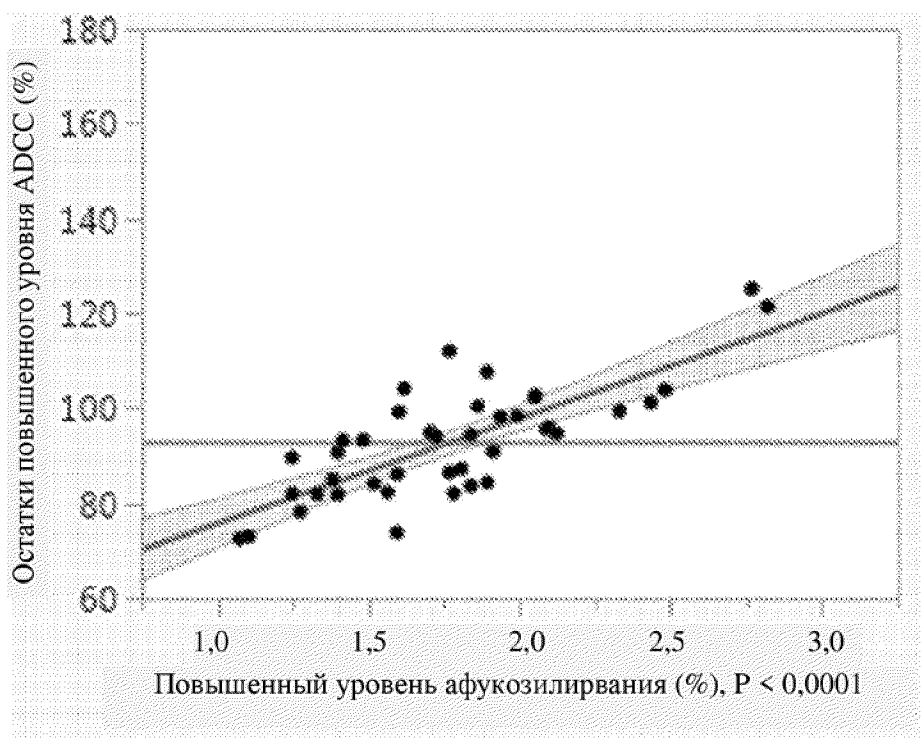
ФИГ. 5Е



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В



ФИГ. 6С

Сводка соответствия				
Козф. детерм.		0,882657		
Подог. коэф. детерм.		0,876481		
Среднеквадратичная ошибка		7,712047		
Среднее значение ответа		92,87805		
Наблюдения (или сумма весов)		41		

Дисперсионный анализ				
Источник	DF	Сумма квадратов	Среднее значение квадрата	F-соотношение
Модель	2	17000,315	8500,16	142,9182
Ошибка	38	2260,076	59,48	Возм. > F
С. общее	40	19260,390		< 0,0001*

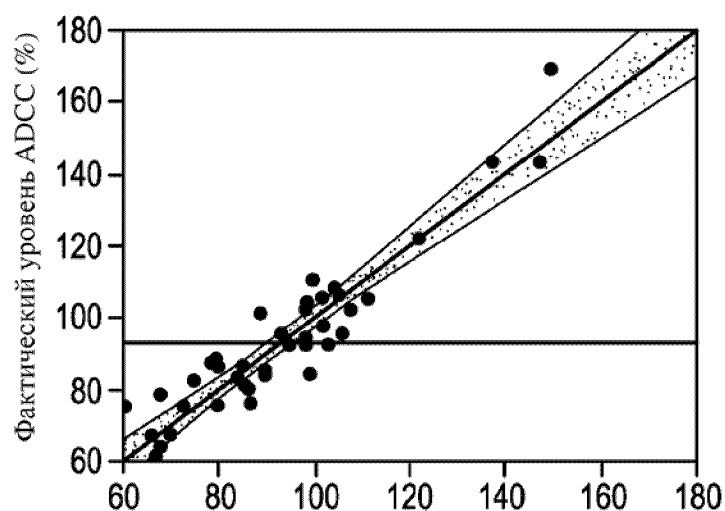
Оценки параметров				
Термин	Оценка	Станд. ошибка	t-соотношение	Возм. > t
Точка пересечения	0,2358435	6,334529	0,04	0,9705
С высоким содержанием маннозы (%)	27,030823	4,197928	6,44	< 0,0001*
Афукозилирование	22,12397	2,962164	7,47	< 0,0001*

Эффективные тесты				
-------------------	--	--	--	--

Предсказанная экспрессия				
--------------------------	--	--	--	--

$0,2358435425 + 27,030822634 \cdot \text{с высоким содержанием маннозы (\%)} + 22,12397042 \cdot \text{афукозилирование (\%)}$

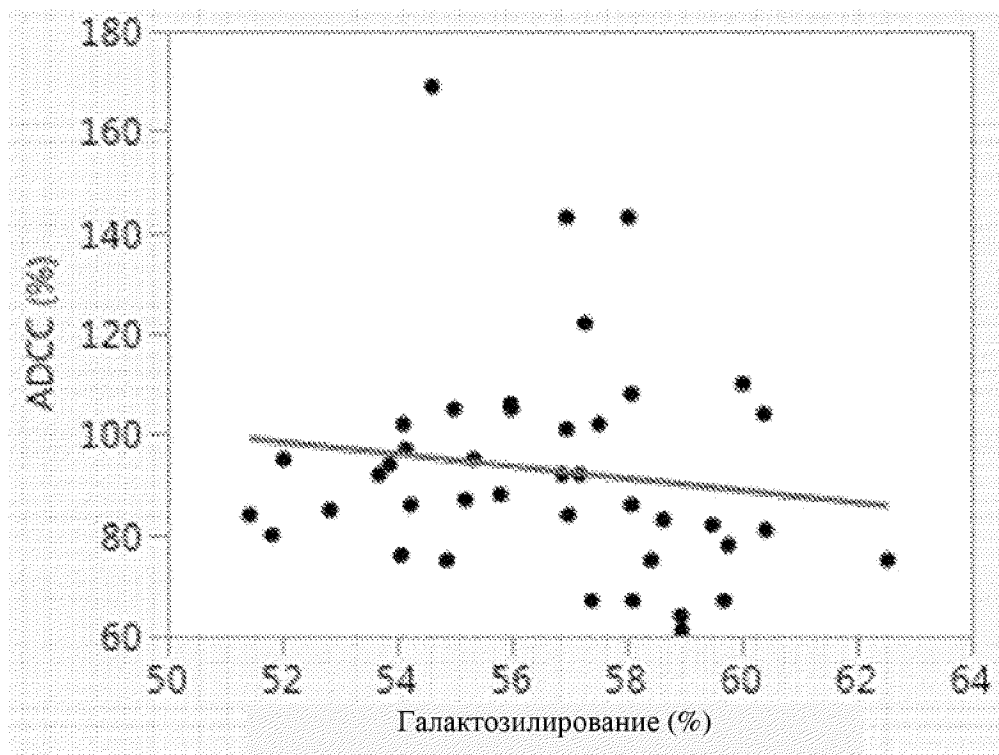
ФИГ. 6D



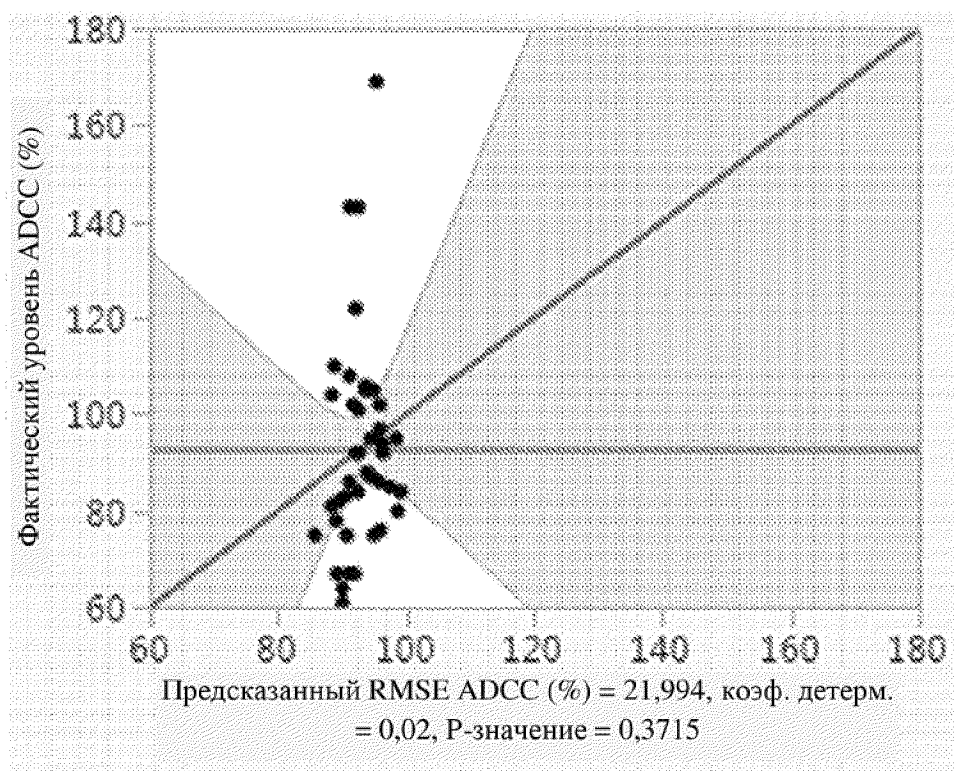
Предсказанный RMSE ADCC (%) = 7,712, коэф. детерм. = 0,88, P-значение < 0,0001

11/17

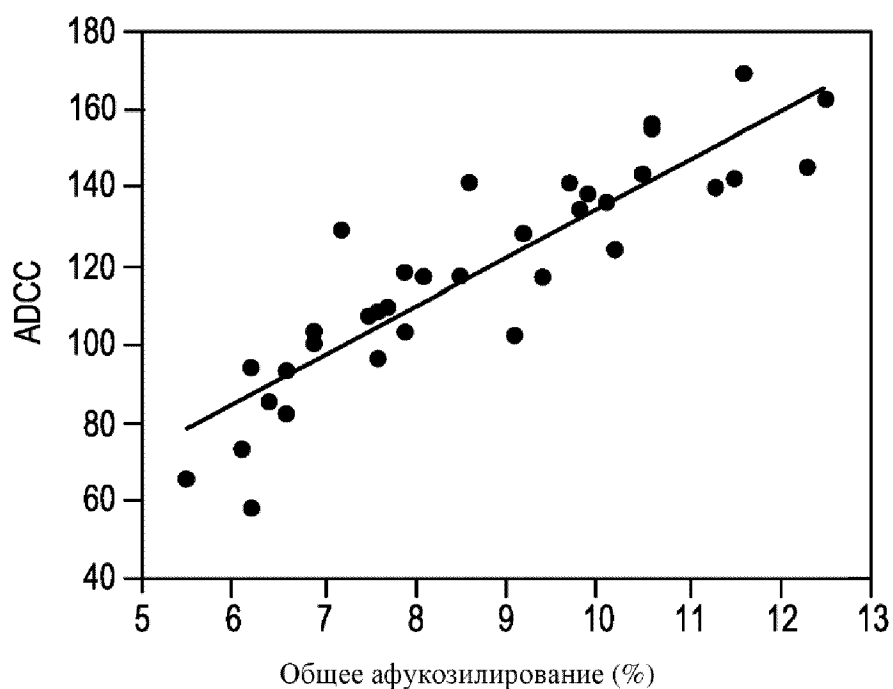
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В



ФИГ. 8А



ФИГ. 8В

Сводка соответствия	
Козф. детерм.	0,800038
Подог. коэф. детерм.	0,794156
Среднеквадратичная ошибка	12,47421
Среднее значение ответа	118,6667
Наблюдения (или сумма весов)	36

Дисперсионный анализ				
Источник	DF	Сумма квадратов	Среднее значение квадратов	F-соотношение
Модель	1	21167,398	21167,4	136,0321
Ошибка	34	5290,602	155,6	Возм. > F
С. общее	35	26458,000		< 0,0001*

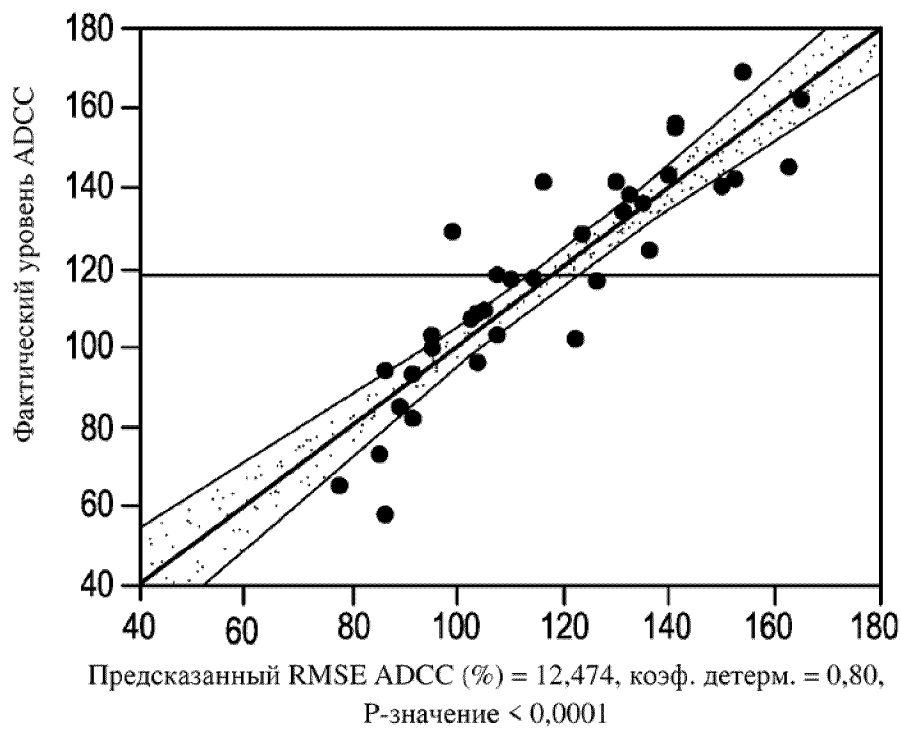
Оценки параметров				
Термин	Оценка	Станд. ошибка	t-соотношение	Возм. > t
Точка пересечения	9,2964424	9,605019	0,97	0,3399
Общее афукозилирование (%)	12,46779	1,068978	11,66	< 0,0001*

Эффективные тесты

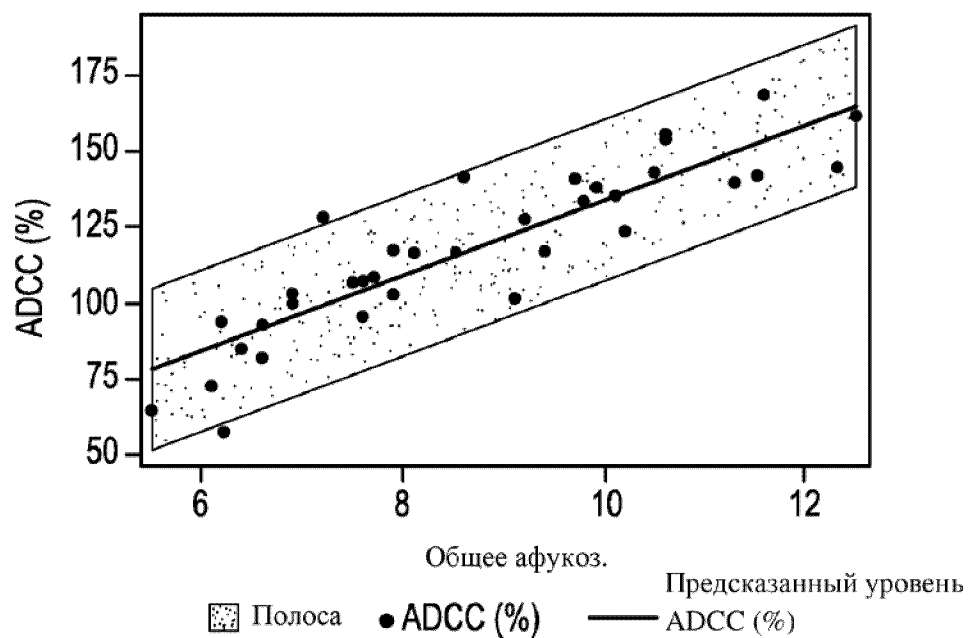
Предсказанная экспрессия

$$9,2964424136 + 12,467789972 \cdot \text{общее афукозилирование (\%)}$$

ФИГ. 8С



ФИГ. 8D

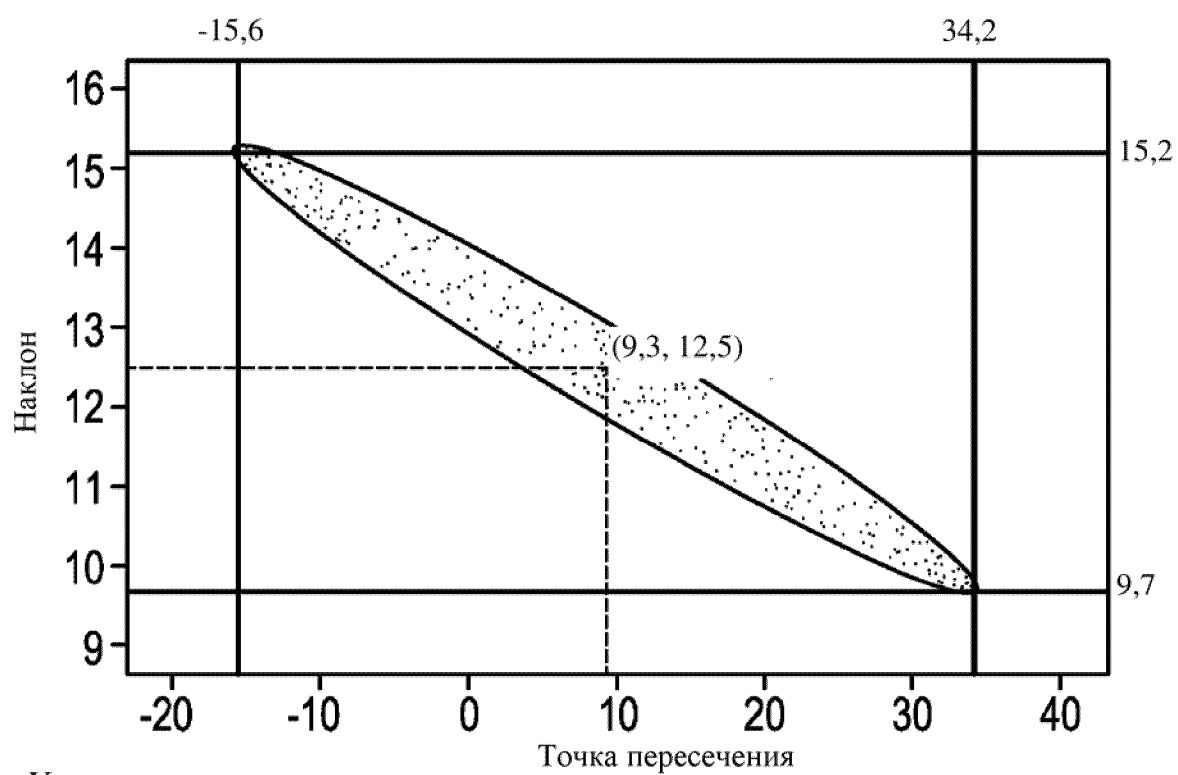


Уравнение регрессии

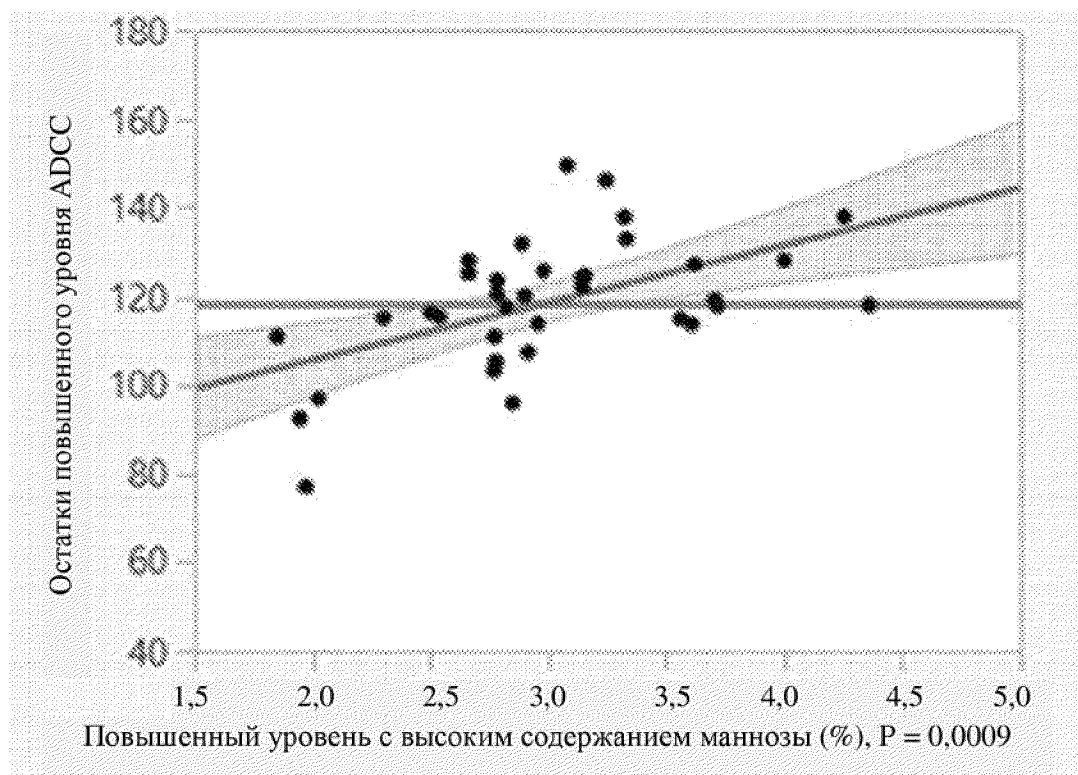
$$ADCC = 9,2964424136 + 12,467789972 \cdot \text{общее афукоз.}$$

ФИГ. 8Е

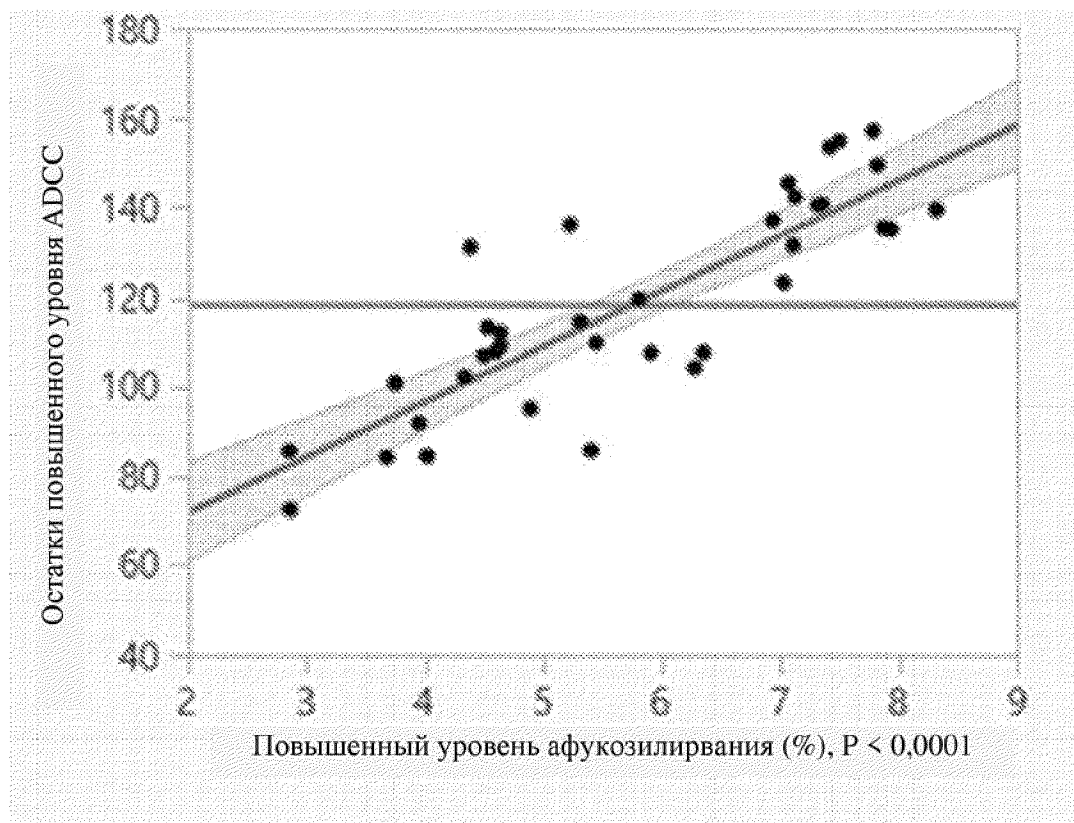
Совместная 95% доверительная область для точки пересечения и
наклона



ФИГ. 9А



ФИГ. 9В



ФИГ. 9С

▲ Сводка соответствия				
Коэф. детерм.		0,800122		
Подог. коэф. детерм.		0,788008		
Среднеквадратичная ошибка		12,65915		
Среднее значение ответа		118,6667		
Наблюдения (или сумма весов)		36		

▲ Дисперсионный анализ				
Источник	DF	Сумма квадратов	Среднее значение квадрата	F-соотношение
Модель	2	21169,619	10584,8	66,0502
Ошибка	33	5288,381	160,3	Возм. > F
С. общее	35	26458,000		< 0,0001*

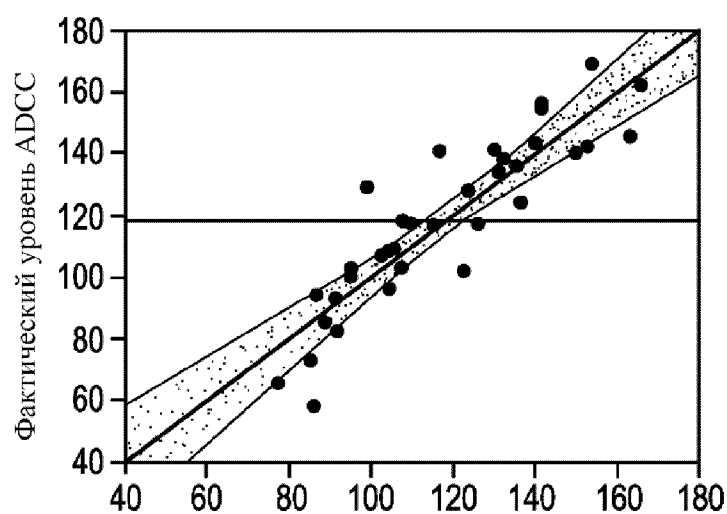
▲ Оценки параметров					
Термин	Оценка	Станд. ошибка	t-соотношение	Возм. > t	
Точка пересечения	8,6606805	11,14367	0,78	0,4426	
Афукозилирование (%)	12,372664	1,352732	9,15	< 0,0001*	
С высоким содержанием маннозы (%)	12,863195	3,529831	3,64	0,0009*	

▶ Эффективн

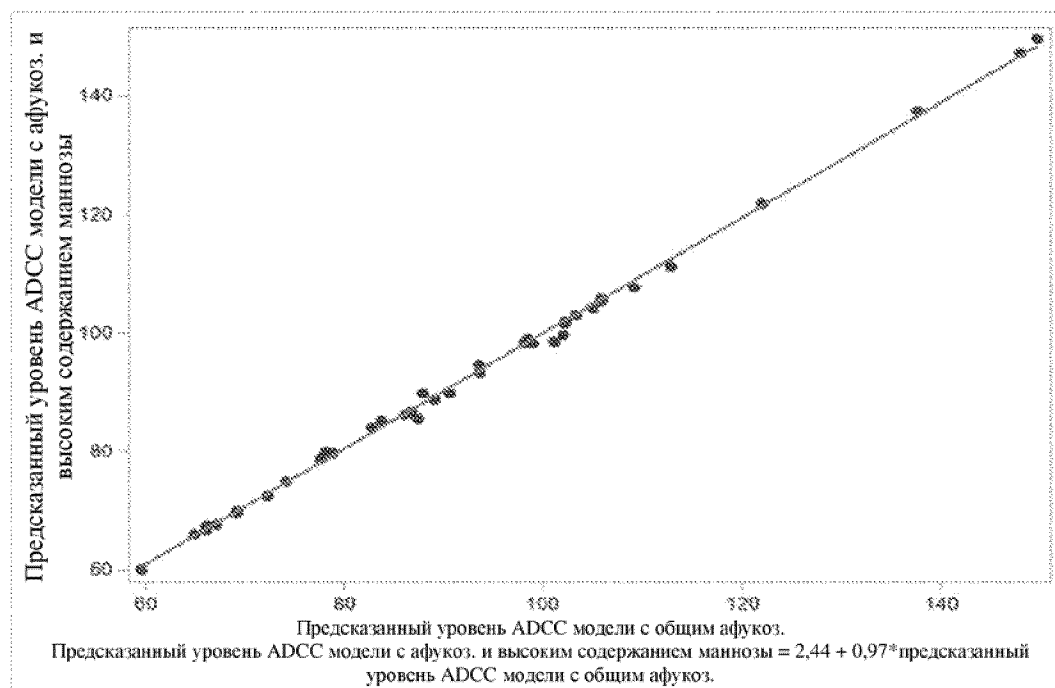
▲ Предсказанная экспрессия

$8,6606805334 + 12,372663571 \cdot \text{афукозилирование (\%)} + 12,863195036 \cdot \text{с высоким содержанием маннозы (\%)}$

ФИГ. 9D



ФИГ. 10А



ФИГ. 10В

