

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391228** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.06.23

(51) Int. Cl. *A61P 19/08* (2006.01)  
*C12N 9/16* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.10.21

---

(54) **СПОСОБ КОНТРОЛЯ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ СИАЛОВОЙ КИСЛОТЫ (TSAC) В  
ХОДЕ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ**

---

(31) 63/105,052

(32) 2020.10.23

(33) US

(86) PCT/US2021/055991

(87) WO 2022/087229 2022.04.28

(71) Заявитель:

**АЛЕКСИОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Дьюитт Меган, Суй Сыгуан, Годават  
Рахул, Берендес Сара (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Предусмотрены способы изготовления рекомбинантных щелочных фосфатаз, таких как асфотаза альфа, которые обеспечивают более точный контроль качества в отношении общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в виде концентрации в конечном продукте путем измерения концентрации TSAC в ходе ферментации и корректировки последующих стадий получения в соответствии с ней.

---

**202391228**

**A1**

**A1**

**202391228**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577961EA/019

### СПОСОБ КОНТРОЛЯ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ СИАЛОВОЙ КИСЛОТЫ (TSAC) В ХОДЕ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США № 63/105052, поданной 23 октября 2020 года, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 19 октября 2021 года, имеет название 0608WO\_SL.txt и размер 15286 байтов.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Гипофосфатазия (HPP) представляет собой опасное для жизни генетическое и крайне редкое нарушение метаболизма, которое приводит к неспособности вырабатывать функциональную нетканеспецифическую щелочную фосфатазу (TNSALP). Она приводит к накоплению неминерализованного костного матрикса (например, при рахите, остеомалации), характеризующегося гипоминерализацией костей и зубов. Если растущая кость не минерализуется должным образом, нарушение роста обезображивает суставы и кости. Этот результат в свою очередь влияет на двигательную активность, дыхательную функцию и может даже привести к смерти. HPP включает перинатальную, младенческую, ювенильную (или детскую) и взрослую HPP. Исторически было определено шесть клинических форм, большинство из которых выделены на основании возраста появления симптомов, включая перинатальную, доброкачественную пренатальную, младенческую, ювенильную, взрослую и одонто-HPP.

Асфотаза альфа (STRENSIQ<sup>®</sup>, Alexion Pharmaceuticals, Inc.) является одобренным наилучшим в своем классе средством направленной ферментозаместительной терапии, предназначенным для решения проблем с дефектами уровней эндогенной TNSALP. Асфотаза альфа представляет собой растворимый слитый гликопротеин, состоящий из каталитического домена TNSALP человека, Fc-домена иммуноглобулина G1 человека и пептида декааспартата (например, D10) (SEQ ID NO: 2), используемого в качестве домена, нацеливающегося на кость. *In vitro* асфотаза альфа связывается с гидроксипатитом с большей аффинностью, чем растворимая TNSALP, не имеющая пептида декааспартата, что дает возможность компоненту TNSALP асфотазы альфа эффективно расщеплять избыток локального неорганического пирофосфата (PPi) и восстанавливать нормальную минерализацию в костях. Гидролиз пирофосфата способствует минерализации костей, и его эффекты были сходными у видов, оцениваемых в неклинических исследованиях.

Асфотаза альфа представляет собой эукариотический белок, который содержит посттрансляционные модификации, например, гликозилирование (например,

сиалилирование). Получение в промышленном масштабе количеств терапевтически эффективных щелочных фосфатаз, таких как асфотаза альфа, включает многостадийный процесс изготовления, условия которого могут существенно влиять на конечный продукт. В ходе данного процесса продукты с посттрансляционными модификациями могут подвергаться воздействию гликозидаз или других гидролитических условий в ходе одной или нескольких стадий процесса изготовления, что отрицательно влияет на посттрансляционные модификации. Например, могут быть утрачены добавленные компоненты, представляющие собой сиаловую кислоту. Эти изменения могут приводить к уменьшению периода полужизни и ферментативной активности больших количеств продукта в партиях. Соответственно, необходимы усовершенствованные способы изготовления щелочных фосфатаз для улучшения контроля качества конечного белкового продукта и его характеристик гликозилирования.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе раскрыты процессы изготовления, которые можно применять для улучшения контроля качества гликозилирования при получении щелочных фосфатаз (например, асфотазы альфа). Способы также можно применять для поддержания, сохранения, модулирования и/или улучшения ферментативной активности и, в частности, поддержания, контроля и/или улучшения периода полужизни рекомбинантного белка, такого как щелочная фосфатаза (например, асфотаза альфа), продуцируемого культивируемыми клетками млекопитающих, в частности культивируемыми клетками яичника китайского хомячка (СНО). Такие щелочные фосфатазы (например, асфотаза альфа) подходят для применения в терапии, например, для лечения состояний, ассоциированных с уменьшением уровней и/или функции белка щелочной фосфатазы (например, НРР) (например, недостаточного расщепления неорганического пирофосфата (PPi) и т. д.) у субъекта, например, у субъекта-человека.

В одном аспекте предусмотрен способ получения рекомбинантной щелочной фосфатазы. Способ включает стадии: инокуляции в биореактор клетки (например, клетки млекопитающего, например, клетки яичника китайского хомячка (СНО)), экспрессирующей рекомбинантную щелочную фосфатазу; получения водной среды для культивирования, которая содержит рекомбинантную щелочную фосфатазу; получения аликвоты из водной среды для культивирования в период от приблизительно дня 6 до приблизительно дня 10, в частности от приблизительно дня 6 до приблизительно дня 8 (например, в приблизительно день 6, приблизительно день 7, приблизительно день 8, приблизительно день 9, приблизительно день 10, например, в приблизительно день 7) после инокуляции; количественного определения общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в виде молярной концентрации на моль рекомбинантной щелочной фосфатазы в аликвоте; сбора водной среды для культивирования и осуществления стадии фильтрации (например, ультрафильтрации, диафильтрации или их комбинации) с получением в конечном итоге нерасфасованного лекарственного вещества (BDS). Способ может дополнительно включать дополнительные стадии последующей очистки между стадией фильтрации и получением

BDS (фиг. 1).

Аликвоту среды для культивирования из стадии ферментации используют для определения количества времени, в течение которого поддерживается фильтрационный пул. Например, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,5 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение менее чем приблизительно девяти часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,5 моль/моль до приблизительно 2,7 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение от приблизительно 10 часов до приблизительно 14 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,8 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение от приблизительно 23 часов до приблизительно 27 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,0 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение от приблизительно 38 часов до приблизительно 42 часов.

В одном варианте осуществления, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,5 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 7 +/- 2 часов или меньше (например, в пределах приблизительно 5-9 часов). Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,5 моль/моль до приблизительно 2,7 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 18 +/- 2 часов или меньше (например, в пределах приблизительно 16-20 часов). Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 2,7 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 32 +/- 2 часов или меньше (например, в пределах приблизительно 30-34 часов).

В другом варианте осуществления, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,3 моль/моль или равную этому значению, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 18 +/- 4 часов или меньше (например, в пределах приблизительно 14-22 часов). Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от более чем приблизительно 2,3 моль/моль до приблизительно 3,1 моль/моль (например, от приблизительно 2,4 моль/моль до приблизительно 3,1 моль/моль), то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 32 +/- 4 часов или меньше (например, в пределах приблизительно 28-36 часов). Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,1 моль/моль (например, составляющую более чем 3,2 моль/моль или равную этому значению), то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 44 +/- 4 часов или меньше (например, в пределах приблизительно 40-48 часов).

В другом варианте осуществления, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,4 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 17 +/- 3 часов или меньше (например, в пределах

приблизительно 14-20 часов). Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,4 моль/моль до приблизительно 3,6 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 31 +/- 3 часов или меньше (например, в пределах приблизительно 28-34 часов). Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,6 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 45 +/- 3 часов (например, в пределах приблизительно 42-48 часов). Концентрация щелочной фосфатазы в ходе стадии фильтрации может составлять от приблизительно  $3,7 \pm 0,4$  г/л.

Концентрация щелочной фосфатазы в ходе стадии фильтрации может составлять от приблизительно 1,8 г/л до приблизительно 5,0 г/л (например, от приблизительно 1,8 до приблизительно 4,3 г/л, например, приблизительно 2,3 г/л, приблизительно 3,1 г/л, приблизительно 3,7 г/л). Концентрация TSAC в BDS может составлять от приблизительно 1,2 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль (например, от приблизительно 1,6 моль/моль до приблизительно 2,4 моль/моль).

Стадию фильтрации можно поддерживать при постоянной температуре, при этом постоянной температурой является любая температура в пределах определенного диапазона. Например, температура может поддерживаться на уровне от приблизительно 15°C до приблизительно 25°C (например, от приблизительно 19°C до приблизительно 25°C, например, приблизительно 22°C).

Аликвоту можно получить асептически из биореактора для предотвращения загрязнения. Объем аликвоты может составлять от приблизительно 1 мл до приблизительно 1000 мл (например, от приблизительно 25 мл до приблизительно 500 мл, например, от приблизительно 50 мл до приблизительно 300 мл, например, приблизительно 100 мл или приблизительно 200 мл).

Получение аликвоты может дополнительно включать центрифугирование аликвоты и необязательно удаление надосадочной жидкости из аликвоты. Данная стадия может также включать очистку щелочной фосфатазы из надосадочной жидкости с помощью хроматографической колонки (например, колонки с белком А, например, колонки HiTrap с белком А объемом 1 мл; RoboColumn с белком А объемом 600 мкл или колонки для твердофазной хроматографии MabSelect Sure с белком А). В некоторых вариантах осуществления щелочную фосфатазу можно подвергать замене буфера. Щелочную фосфатазу также можно концентрировать, например, перед определением в анализе TSAC. Анализ TSAC, который включает количественное определение концентрации TSAC, может включать осуществление кислотного гидролиза с высвобождением TSAC.

После очистки щелочной фосфатазы щелочную фосфатазу можно лиофилизировать и/или помещать во флакон.

Биореактор может быть любого подходящего размера, например, для получения щелочной фосфатазы в промышленном масштабе. Например, биореактор может иметь объем, составляющий по меньшей мере 2 л, по меньшей мере 10 л, по меньшей мере 1000 л, по меньшей мере 10000 л или по меньшей мере 20000 л. Объем может составлять

приблизительно 10000 л или приблизительно 20000 л.

Можно использовать любую подходящую среду для культивирования клеток, такую как бессывороточная среда. Некоторые подходящие примеры включают, например, бессывороточную среду EX-CELL<sup>®</sup> 302; среду CD DG44; среду BD SELECT<sup>™</sup>; среду SFM4CHO и их комбинации.

Щелочная фосфатаза может содержать структуру W-sALP-X-Fc-Y-Dn-Z, где:

W отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты;

X отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты;

Y отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты;

Z отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты;

Fc представляет собой область, являющуюся кристаллизующимся фрагментом;

Dn представляет собой полиаспартат, полиглутамат или их комбинацию, где n=10 или 16; и

sALP представляет собой растворимую щелочную фосфатазу.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная щелочная фосфатаза содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1. Например, рекомбинантная щелочная фосфатаза может содержать аминокислотную последовательность или состоять из аминокислотной последовательности, которая представлена под SEQ ID NO: 1.

### **Определения**

Как используется в данном документе, термины "приблизительно" и "примерно" применительно к одному или нескольким конкретным условиям культивирования клеток или числовым значениям относятся к диапазону значений, которые составляют +/- 10% от рассматриваемого значения.

Термин "аминокислота", используемый в данном документе, относится к любой из двадцати встречающихся в природе аминокислот, которые обычно используются при образовании полипептидов, или аналогам или производным этих аминокислот. Аминокислоты согласно настоящему изобретению могут предоставляться в среде для культур клеток. Аминокислоты, предоставляемые в среде, могут быть представлены в виде солей или в форме гидратов.

Термин "периодическое культивирование", используемый в данном документе, относится к способу культивирования клеток, в котором все компоненты, которые в конечном итоге будут использоваться при культивировании клеток, включая среду (см. определение "среды" ниже), а также сами клетки, предоставляются в начале процесса

культивирования. Периодическое культивирование обычно останавливают в некоторый момент, а клетки и/или компоненты в среде собирают и необязательно очищают. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, применяются в периодическом культивировании.

Термин "биореактор", используемый в данном документе, относится к любому сосуду, используемому для выращивания культуры клеток (например, культуры клеток млекопитающих). Биореактор может быть любого размера, при условии, что он является подходящим для культивирования клеток. Обычно биореактор будет иметь объем по меньшей мере 1 литр и может иметь объем 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000, 20000, 22000, 25000, 30000 литров или больше или любой объем в промежутке между указанными значениями. В некоторых вариантах осуществления биореактор имеет объем от 100 литров до 30000 литров, от 500 литров до 22000 литров, от 1000 литров до 22000 литров, от 2000 литров до 22000 литров, от 5000 литров до 22000 литров или от 10000 литров до 22000 литров. Максимальный рабочий объем биореактора может варьироваться от приблизительно 1% до 5%, например, может достигать значения вплоть до приблизительно 22250 литров или 33000 литров. Внутренние условия биореактора, включая без ограничения рН и температуру, обычно контролируют в ходе периода культивирования. Биореактор может состоять из любого материала, подходящего для поддержания культур клеток млекопитающих или других клеток, суспендированных в средах в условиях культивирования согласно настоящему изобретению, включая стекло, пластик или металл. Термин "производственный биореактор", используемый в данном документе, относится к конечному биореактору, используемому для получения полипептида или белка, представляющего интерес. Объем крупномасштабного производственного биореактора для культивирования клеток обычно составляет по меньшей мере 500 литров и может составлять 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000, 20000 литров или больше или любой объем в промежутке между указанными значениями. Специалист средней квалификации в данной области будет осведомлен о подходящих биореакторах и сможет выбрать их для применения в практическом осуществлении настоящего изобретения.

Термин "плотность клеток", используемый в данном документе, относится к количеству клеток, присутствующих в данном объеме среды.

Термин "жизнеспособность клеток", используемый в данном документе, относится к способности клеток в культуре выживать при заданном наборе условий культивирования или экспериментальных видоизменениях. Термин, используемый в данном документе, также относится к той части клеток, которые являются живыми в определенное время, относительно общего количества клеток, живых и мертвых, в культуре в указанное время.

Термины "культура" и "культура клеток", используемые в данном документе, относятся к популяции клеток, которая суспендирована в среде (см. определение "среды" ниже) в условиях, подходящих для выживания и/или роста популяции клеток. Как будет очевидно специалистам средней квалификации в данной области, эти термины,

используемые в данном документе, могут относиться к комбинации, включающей популяцию клеток и среду, в которой популяция суспендирована.

Термин "периодическое культивирование с подпиткой", используемый в данном документе, относится к способу культивирования клеток, в котором дополнительные компоненты предоставляют в культуру через некоторое время после начала процесса культивирования. Предоставляемые компоненты обычно содержат питательные добавки для клеток, запасы которых были истощены в процессе культивирования. Периодическое культивирование с подпиткой обычно останавливают в некоторый момент, а клетки и/или компоненты в среде собирают и необязательно очищают. Периодическое культивирование с подпиткой можно осуществлять в соответствующем биореакторе периодического действия с подпиткой. В некоторых вариантах осуществления способ включает периодическое культивирование с подпиткой.

Термин "фрагмент", используемый в данном документе, относится к полипептиду и определяется как любая отдельная часть данного полипептида, которая является уникальной или характерной для данного полипептида. Термин, используемый в данном документе, также относится к любой отдельной части данного полипептида, которая сохраняет по меньшей мере часть активности полноразмерного полипептида. В некоторых вариантах осуществления доля сохраняемой активности составляет по меньшей мере 10% от активности полноразмерного полипептида. В различных вариантах осуществления доля сохраняемой активности составляет по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% от активности полноразмерного полипептида. В других вариантах осуществления доля сохраняемой активности составляет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от активности полноразмерного полипептида. В одном варианте осуществления доля сохраняемой активности составляет 100% от активности полноразмерного полипептида. Термин, используемый в данном документе, также относится к любой части данного полипептида, которая содержит по меньшей мере определенный элемент последовательности, обнаруживаемый в полноразмерном полипептиде. В некоторых вариантах осуществления элемент последовательности охватывает по меньшей мере 4-5 аминокислот полноразмерного полипептида. В некоторых вариантах осуществления элемент последовательности охватывает по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или больше аминокислот полноразмерного полипептида.

Термины "гликопротеин" или "гликопротеины", используемые в данном документе, относятся к белку или полипептиду с углеводными группами (такими как сиаловая кислота), присоединенными к полипептидной цепи.

Термины "среда", "среды", "среда для культивирования клеток" и "среда для культивирования", используемые в данном документе, относятся к раствору, содержащему питательные вещества, которые подпитывают растущие клетки млекопитающих. Обычно эти растворы содержат незаменимые и заменимые аминокислоты, витамины, источники энергии, липиды и микроэлементы, необходимые клетке для минимального роста и/или выживания. Раствор также может содержать компоненты, которые усиливают рост и/или



выживаемость выше минимального показателя, включая гормоны и факторы роста. Раствор может быть, например, составлен с рН и концентрацией солей, оптимальными для выживания и пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования может представлять собой "среду определенного состава" - бессывороточную среду, которая не содержит белков, гидролизатов или компонентов неизвестного состава. Среда определенного состава не содержит компонентов животного происхождения, и все компоненты имеют известную химическую структуру. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования представляет собой базовую среду, например, среду неопределенного состава, содержащую источник углерода, воду, соли, источник аминокислот и азота (например, животный, например, говядину, или дрожжевые экстракты). Различные среды являются коммерчески доступными и известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования выбрана из бессывороточной среды EX-CELL<sup>®</sup> 302 (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури), среды CD DG44 (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс), среды BD Select (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) или их смеси или смеси среды BD Select со средой SFM4CHO (HYCLONE<sup>™</sup>, Логан, Юта). В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит комбинацию среды SFM4CHO и среды BD SELECT<sup>™</sup>. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит комбинацию среды SFM4CHO и среды BD SELECT<sup>™</sup> в соотношении, выбранном из 90/10, 80/20, 75/25, 70/30, 60/40 или 50/50, которое включает любое промежуточное соотношение в промежутке между указанными значениями. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит комбинацию среды SFM4CHO и среды BD SELECT<sup>™</sup> в соотношении от 70/30 до 90/10. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит комбинацию среды SFM4CHO и среды BD SELECT<sup>™</sup> в соотношении 75/25. Бессывороточная среда EX-CELL<sup>®</sup> 302 содержит 0,1% PLURONIC<sup>®</sup> F68, 3,42 г/л глюкозы, 7,5 мМ HEPES и 1,6 г/л бикарбоната натрия. Среда BD SELECT<sup>™</sup> содержит человеческий рекомбинантный инсулин, гипоксантин, тимидин и эндотоксины на низком уровне ( $\leq 5,0$  EU/мл) при рН  $7,1 \pm 0,2$ . Среда CD DG44 представляет собой среду определенного химического состава, не содержащую белков и не содержащую гидролизатов, которая содержит гипоксантин, тимидин и L-глутамин без PLURONIC<sup>®</sup> F-68. В некоторых вариантах осуществления щелочную фосфатазу (например, асфотазу альфа) получают посредством процесса, в котором дополнительные болюсные дозы среды для культивирования добавляют в производственный биореактор. Например, можно добавлять одну, две, три, четыре, пять, шесть или больше болюсных доз среды для культивирования. В одном конкретном варианте добавляют три болюсные дозы среды для культивирования. В различных вариантах осуществления такие дополнительные болюсные дозы среды для культивирования можно добавлять в различных количествах. Например, такие болюсные дозы среды для культивирования можно добавлять в количестве, составляющем приблизительно 20%, 25%, 30%, 33%, 40%, 45%, 50%, 60%, 67%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 125%, 130%, 133%, 140%, 150%, 160%, 167%, 170%, 175%,

180%, 190%, 200% или больше от исходного объема среды для культивирования в производственном биореакторе. В одном конкретном варианте осуществления такие болюсные дозы среды для культивирования можно добавлять в количестве, составляющем приблизительно 33%, 67%, 100% или 133% от исходного объема. В различных вариантах осуществления такое добавление дополнительных болюсных доз может происходить в различные моменты времени в ходе периода роста клеток или продуцирования белка. Например, болюсные дозы можно добавлять в день 1, день 2, день 3, день 4, день 5, день 6, день 7, день 8, день 9, день 10, день 11, день 12 или позже в ходе процесса. В одном конкретном варианте осуществления такие болюсные дозы среды для культивирования могут добавляться через день (например, (1) в день 3, день 5 и день 7; (2) в день 4, день 6 и день 8 или (3) в день 5, день 7 и день 9). На практике частота, количество, момент времени и другие параметры добавления болюсных доз среды для культивирования могут свободно использоваться в комбинации в соответствии с вышеуказанным ограничением и определяться экспериментальной практикой.

Термины "осмоляльность" и "осмолярность", используемые в данном документе, относятся к показателю осмотического давления растворенных частиц растворенного вещества в водном растворе. Частицы растворенного вещества включают как ионы, так и неионизированные молекулы. Осмоляльность выражается в виде концентрации осмотически активных частиц (например, осмолей), растворенных в 1 кг раствора (1 мОсм/кг H<sub>2</sub>O при 38°C является эквивалентным осмотическому давлению 19 мм рт. ст.). "Осмолярность", напротив, относится к количеству частиц растворенного вещества, растворенных в 1 литре раствора. При использовании в данном документе, сокращение "мОсм" означает "миллиосмоли/кг раствора".

Термин "перфузионное культивирование", используемый в данном документе, относится к способу культивирования клеток, в котором дополнительные компоненты предоставляют в культуру непрерывно или полунепрерывно после начала процесса культивирования. Предоставляемые компоненты обычно содержат питательные добавки для клеток, запасы которых были истощены в процессе культивирования. Часть клеток и/или компонентов в среде обычно собирают непрерывно или полунепрерывно и необязательно очищают. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе питательные добавки добавляют в перфузионную культуру, например, их предоставляют непрерывно в течение определенного периода времени.

Термин "полипептид", используемый в данном документе, относится к последовательной цепи аминокислот, связанных друг с другом посредством пептидных связей. Данный термин используется для обозначения аминокислотной цепи любой длины, однако специалисту средней квалификации в данной области будет понятно, что данный термин не ограничивается длинными цепями и может относиться к цепи минимальной длины, содержащей две аминокислоты, связанные друг с другом посредством пептидной связи.

Термин "белок", используемый в данном документе, относится к одному или

нескольким полипептидам, которые функционируют как отдельная единица. Если один полипептид представляет собой отдельную функциональную единицу и не требует постоянной физической ассоциации с другими полипептидами для образования отдельной функциональной единицы, то термины "полипептид" и "белок", используемые в данном документе, используются взаимозаменяемо.

Термины "рекомбинантно экспрессируемый полипептид" и "рекомбинантный полипептид", используемые в данном документе, относятся к полипептиду, экспрессируемому из клетки-хозяина, которая была генетически сконструирована для экспрессии данного полипептида. Рекомбинантно экспрессируемый полипептид может являться идентичным полипептиду или сходным с полипептидом, который в норме экспрессируется в клетке-хозяине, являющейся клеткой млекопитающего. Рекомбинантно экспрессируемый полипептид может также являться чужеродным для клетки-хозяина, например, гетерологичным по отношению к пептидам, в норме экспрессируемым в клетке-хозяине. В качестве альтернативы рекомбинантно экспрессируемый полипептид может являться химерным в тех частях полипептида, которые содержат аминокислотные последовательности, являющиеся идентичными полипептидам или сходными с полипептидами, которые в норме экспрессируются в клетке-хозяине, являющейся клеткой млекопитающего, тогда как другие части являются чужеродными для клетки-хозяина.

Термин "посев", используемый в данном документе, относится к процессу доставки клеточной культуры в биореактор или другой сосуд. Клетки могли быть предварительно размножены в другом биореакторе или сосуде. В качестве альтернативы клетки могли быть заморожены и разморожены непосредственно перед их доставкой в биореактор или сосуд. Данный термин относится к любому количеству клеток, включая одну клетку. В различных вариантах осуществления щелочную фосфатазу (например, асфотазу альфа) получают посредством процесса, в котором клетки высевают при плотности, составляющей приблизительно  $1,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $1,5 \times 10^5$  клеток/мл,  $2,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл,  $3,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $3,5 \times 10^5$  клеток/мл,  $4,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $4,5 \times 10^5$  клеток/мл,  $5,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $5,5 \times 10^5$  клеток/мл,  $6,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $6,5 \times 10^5$  клеток/мл,  $7,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $7,5 \times 10^5$  клеток/мл,  $8,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $8,5 \times 10^5$  клеток/мл,  $9,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $9,5 \times 10^5$  клеток/мл,  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл, или при более высокой плотности. В одном конкретном варианте осуществления в таком процессе клетки высевают при плотности, составляющей приблизительно  $4,0 \times 10^5$  клеток/мл,  $5,5 \times 10^5$  клеток/мл или  $8,0 \times 10^5$  клеток/мл.

Термины "общее содержание сиаловой кислоты" или "TSAC", используемые в данном документе, относятся к количеству сиаловой кислоты (углевода) в конкретной молекуле белка. Оно выражается в молях TSAC на моль белка или "моль/моль". Концентрацию TSAC измеряют в ходе процесса очистки. Например, один из способов количественного определения TSAC заключается в том, что TSAC высвобождается из асфотазы альфа с помощью кислотного гидролиза, и высвободившуюся TSAC впоследствии выявляют посредством электрохимического выявления с помощью

высокоэффективной анионообменной хроматографии с применением методики импульсного амперометрического выявления ("HPLC-PAD").

Термин "титр", используемый в данном документе, относится к общему количеству рекомбинантно экспрессируемого полипептида или белка, продуцируемого культурой клеток, деленному на данное количество объема среды. Титр обычно выражается в единицах миллиграммов полипептида или белка на миллилитр среды.

Используемые в данном документе сокращения включают, например, HSCF: собранная осветленная культуральная жидкость; UF: ультрафильтрация, DF: диафильтрация; VCD: плотность жизнеспособных клеток; IVCC: интеграл концентрации жизнеспособных клеток; TSAC: общее содержание сиаловой кислоты; HPLC-PAD: высокоэффективная анионообменная хроматография с импульсным амперометрическим выявлением; SEC: эксклюзионная хроматография; AEX: анионообменная хроматография; LoC: лаборатория на чипе; и MALDI-TOF: матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией.

Как используется в данном документе, термин "колонка для хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC)" относится к колонке, содержащей неподвижную фазу или смолу и подвижную фазу или фазу раствора, в которой гидрофобное взаимодействие между белком и гидрофобными группами в неподвижной фазе или смоле обеспечивает отделение белка от примесей, включая фрагменты и агрегаты исследуемого белка, другие белки или белковые фрагменты и другие загрязняющие вещества, такие как клеточный дебрис или остаточные примеси после других стадий очистки. Неподвижная фаза или смола содержит базовую матрицу или подложку, такую как сшитая агароза, диоксид кремния или синтетический сополимерный материал, к которой присоединены гидрофобные лиганды. Примеры такой неподвижной фазы или смол включают фенил-, бутил-, октил-, гексил- и другие алкилзамещенные агарозы, диоксид кремния или другие синтетические полимеры. Колонки, содержащие стационарную фазу, могут быть любого размера или могут быть открытыми и обрабатываться периодически. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантную щелочную фосфатазу выделяют из культуры клеток с помощью HIC.

Как используется в данном документе, термин "препарат" относится к раствору, содержащему белок, представляющий интерес (например, рекомбинантную щелочную фосфатазу, описанную в данном документе), и по меньшей мере одну примесь из культуры клеток, продуцирующей такой белок, представляющий интерес, и/или раствора, используемого для экстрагирования, концентрирования и/или очистки такого белка, представляющего интерес, из культуры клеток. Например, препарат белка, представляющего интерес (например, рекомбинантной щелочной фосфатазы, описанной в данном документе), можно получать путем гомогенизации клеток, которые растут в культуре клеток и продуцируют такой белок, представляющий интерес, в гомогенизирующем растворе. В некоторых вариантах осуществления препарат затем подвергают одному или нескольким процессам очистки/выделения, например, стадии хроматографии.

Как используется в данном документе, термин "раствор" относится к гомогенной молекулярной смеси из двух или более веществ в жидкой форме. В частности, в некоторых вариантах осуществления подлежащие очистке белки, такие как рекомбинантные щелочные фосфатазы, или слитые белки на их основе (например, асфотаза альфа) в настоящем изобретении представляют собой одно вещество в растворе. Термины "буфер" или "буферный раствор" относятся к растворам, которые устойчивы к изменениям рН под действием сопряженного кислотно-щелочного диапазона. Примеры буферов, которые контролируют рН в диапазоне от приблизительно рН 5 до приблизительно рН 7, включают HEPES, цитратный, фосфатный, ацетатный и другие буферы на основе минеральных кислот или органических кислот и их комбинации. Катионы солей включают натрий, аммоний и калий. Как используется в данном документе, термины "загрузочный буфер/раствор" или "уравновешивающий буфер/раствор" относятся к буферу/раствору, содержащему соль или соли, которые смешивают с белковым препаратом для загрузки белкового препарата в хроматографическую колонку, например, колонку для ИС. Этот буфер/раствор также используется для уравновешивания колонки перед загрузкой и для промывки колонки после загрузки белка. "Элюирующий буфер/раствор" относится к буферу/раствору, используемому для элюирования белка из колонки. Как используется в данном документе, термин "раствор" относится к буферному либо к небуферному раствору, включая воду.

Термин "сиаловая кислота" относится в целом к N- или O-замещенным производным нейраминовой кислоты - моносахарида с девятиуглеродным остовом. Сиаловая кислота может также, в частности, относиться к соединению N-ацетилнейраминовой кислоты и иногда обозначается сокращением Neu5Ac или NANA. Присутствие сиаловой кислоты может влиять на поглощение, период полужизни в сыворотке крови и клиренс гликопротеинов из сыворотки крови, а также на физические, химические и иммуногенные свойства гликопротеина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сиаловая кислота, ассоциированная со щелочными фосфатазами, например, с асфотазой альфа, влияет на период полувыведения молекулы в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления точный и предсказуемый контроль общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в асфотазе альфа служит критической характеристикой качества рекомбинантной асфотазы альфа. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от 1,2 до 3,0 моль/моль мономера асфотазы альфа. В некоторых вариантах осуществления TSAC образуется в процессе получения рекомбинантного белка в биореакторе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ контроля общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в рекомбинантном белке, содержащем TSAC, посредством культивирования клеток млекопитающих, включающий по меньшей мере одну стадию очистки и по меньшей мере одну стадию хроматографии. В некоторых вариантах осуществления стадии очистки и хроматографии приводят к уменьшению активности гликозидазы и, таким образом, к увеличению общего содержания сиаловой кислоты в рекомбинантном белке.

Термин "сиалирование" относится к конкретному типу гликозилирования,

например, добавлению одной или нескольких молекул сиаловой кислоты к биомолекулам, в частности к добавлению одной или нескольких молекул сиаловой кислоты к белкам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сиалилирование осуществляется с помощью фермента сиалилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления сиалилтрансферазы осуществляют добавление сиаловой кислоты к образующимся олигосахаридам и/или к N- или O-связанным сахарным цепям гликопротеинов. В некоторых вариантах осуществления сиалилтрансферазы изначально присутствуют в клетках, продуцирующих рекомбинантную щелочную фосфатазу. В некоторых вариантах осуществления сиалилтрансферазы присутствуют в среде для культивирования клеток и/или в питательной добавке, применяемых при культивировании клеток, продуцирующих рекомбинантную щелочную фосфатазу. В некоторых вариантах осуществления сиалилтрансферазы получают рекомбинантным путем с применением способов экспрессии рекомбинантных белков, известных из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные сиалилтрансферазы, получаемые отдельно от рекомбинантных щелочных фосфатаз, добавляют экзогенно к культуре клеток, собранной осветленной культуральной жидкости (HCCF) и/или фильтрационному пулу.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения группы сиаловой кислоты удаляют из гликопротеинов (например, осуществляя "десиалилирование") путем гидролиза. В некоторых вариантах осуществления десиалилирование осуществляется ферментом гликозидазой. Как используется в данном документе, "гликозидаза", также называемая "гликозидгидролазой", представляет собой фермент, который катализирует гидролиз связи, соединяющей сахар гликозида со спиртом или другим сахарным звеном. Примеры гликозидаз включают амилазу, ксиланазу, целлюлазу и сиалидазу. В некоторых вариантах осуществления десиалилирование осуществляется ферментом сиалидазой. В некоторых вариантах осуществления сиалидазы гидролизуют гликозидные связи концевых остатков сиаловой кислоты в гликопротеинах, гликолипидах, олигосахаридах, коломиновой кислоте и/или синтетических субстратах. В некоторых вариантах осуществления сиалидазы присутствуют в среде для культивирования клеток, продуцирующей рекомбинантную щелочную фосфатазу. В некоторых вариантах осуществления активность сиалидазы зависит от концентрации общего белка и/или коррелирует с ней. В некоторых вариантах осуществления сиалидазы являются практически неактивными до достижения критически высокой концентрации белка, после чего сиалидаза активируется. В некоторых вариантах осуществления сиалидазы присутствуют в HCCF или фильтрационном пуле культуры клеток, продуцирующей рекомбинантную щелочную фосфатазу. В некоторых вариантах осуществления сиалидазы удаляют компоненты, представляющие собой сиаловую кислоту, из сайтов гликозилирования рекомбинантной щелочной фосфатазы, например, асфатазы альфа, эффективно снижая TSAC рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления сиалидазы избирательно удаляют из культуры клеток, HCCF и/или фильтрационного пула. Сиалидазы могут быть избирательно удалены, например, с

помощью одного или комбинации из специфичных в отношении сиалидазы ингибиторов, антител, ионообменной и/или аффинной хроматографии, иммунопреципитации и т. п. В отношении обзора того, как условия биопроцесса влияют на содержание сиаловой кислоты в белках, см. Gramer et al., *Biotechnol. Prog.* 9(4):366-373 (1993), раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ контроля активности гликозидазы в культуре клеток млекопитающих, продуцирующих рекомбинантный белок, включающий по меньшей мере одну стадию очистки и по меньшей мере одну стадию хроматографии. В некоторых вариантах осуществления стадии очистки и хроматографии приводят к уменьшению активности гликозидазы и, таким образом, к увеличению общего содержания сиаловой кислоты в рекомбинантном белке.

Термин "собранная осветленная культуральная жидкость", сокращенно НССФ, относится к осветленной отфильтрованной жидкости, полученной из культуры клеток, например, культуры клеток в биореакторе. НССФ обычно не содержит клеток и клеточного дебриса (такого как, например, нерастворимые биомолекулы), которые могут присутствовать в культуре клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения НССФ получают посредством центрифугирования, глубинной фильтрации, стерилизующей фильтрации и/или хроматографии. В некоторых вариантах осуществления жидкость культуры клеток из биореактора вначале центрифугируют и/или фильтруют, а затем подвергают по меньшей мере одной стадии хроматографии для получения НССФ. В некоторых вариантах осуществления НССФ концентрируют до и/или после по меньшей мере одной стадии хроматографии. В некоторых вариантах осуществления НССФ разбавляют после по меньшей мере одной стадии хроматографии. В некоторых вариантах осуществления НССФ из культуры клеток, продуцирующей рекомбинантную щелочную фосфатазу, содержит рекомбинантную щелочную фосфатазу и загрязняющие белки. В некоторых вариантах осуществления загрязняющие белки в НССФ включают ферменты сиалидазы.

Термины "фильтрация" и "поточная фильтрация" относятся к процессу, обусловленному давлением, в котором используются мембраны для разделения компонентов в жидком растворе или суспензии в зависимости от их размера и различий зарядов. Поточная фильтрация может являться нормальной поточной фильтрацией или "тангенциальной поточной фильтрацией", также известной как TFF или фильтрация в перекрестном потоке. TFF обычно применяют для осветления, концентрирования и очистки белков. В ходе процесса TFF жидкость прокачивается тангенциально вдоль поверхности по меньшей мере одной мембраны. Приложенное давление предназначено для вытеснения части жидкости через мембрану в сторону выпуска в виде "фильтрата". Твердые частицы и макромолекулы, которые являются слишком большими, чтобы пройти через поры мембраны, задерживаются на стороне впуска в виде "ретентата". TFF можно применять в различных формах, включая, например, микрофильтрацию, ультрафильтрацию, которая включает фильтрацию вирусов и высокоэффективную TFF, обратный осмос,

нанофильтрацию и диафильтрацию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одну или несколько форм TFF применяют в комбинации для обработки и/или очистки белка. В некоторых вариантах осуществления ультрафильтрацию и диафильтрацию применяют в комбинации для очистки рекомбинантной щелочной фосфатазы. В данном документе описаны ультрафильтрация и диафильтрация.

"Ультрафильтрация" или "UF" представляет собой процесс очистки, применяемый для отделения белков от компонентов буфера для замены буфера, обессоливания или концентрирования. В зависимости от белка, который должен задерживаться, используются пределы молекулярной массы для мембраны в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 1000 кДа. В некоторых вариантах осуществления UF представляет собой процесс TFF.

"Диафильтрация" или "DF" представляет собой процесс очистки, при котором более мелкие молекулы вымываются через мембрану, а более крупные молекулы остаются в ретентате без существенного изменения концентрации. Обычно DF применяют в комбинации с другими процессами очистки для повышения выхода и/или чистоты продукта. В ходе DF раствор (например, воду или буфер) вводят в резервуар для образцов, тогда как фильтрат удаляют из технологической операции. В процессах, где требуемый продукт находится в ретентате, в ходе диафильтрации компоненты вымываются из пула продукта в фильтрат, за счет чего обеспечивается замена буферов и снижение концентрации нежелательных соединений. Если продукт находится в фильтрате, то в ходе диафильтрации он вымывается через мембрану в сосуд для сбора. В некоторых вариантах осуществления DF представляет собой процесс TFF.

Термин "фильтрационный пул", иногда также называемый "пулом UFDF" или "UFDF", относится к общему объему жидкости после процесса фильтрации, обычно после комбинированного процесса ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF). Применительно к очистке белка UFDF относится к ретентату после процесса ультрафильтрации/диафильтрации.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На фиг. 1 представлена блок-схема, демонстрирующая процесс получения рекомбинантной щелочной фосфатазы, такой как асфотаза альфа.

На фиг. 2 представлен график, демонстрирующий содержание TSAC в асфотазе альфа при сборе, на стадии пула после воздействия белка А и в конечном BDS для нескольких партий.

На фиг. 3 представлен график, демонстрирующий содержание TSAC в асфотазе альфа в день 7 после инокуляции, на стадии сбора и в конечном BDS для нескольких партий.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

В настоящем изобретении предусмотрены усовершенствованные способы изготовления рекомбинантных гликопротеинов, таких как щелочные фосфатазы (например, асфотаза альфа), которые обеспечивают улучшенный контроль качества в отношении общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в виде концентрации в конечном продукте



путем измерения концентрации TSAC в ходе ферментации и корректировки последующих стадий получения в соответствии с измеренными значениями концентрации TSAC. Способы дают возможность модулировать TSAC конечного продукта с использованием стратегии динамического контроля, чтобы реагировать на потенциально изменчивые диапазоны уровней TSAC на выходе из биореактора для культивирования клеток. В конечном итоге данный способ обеспечивает унифицированные свойства рекомбинантной щелочной фосфатазы для промышленного получения. Способы, описанные в данном документе, предусматривают получение конечного продукта, в котором TSAC конечного продукта строго контролируется в диапазоне уровней TSAC в водной среде для культивирования на входе в биореактор.

### **Способы изготовления**

Способы, описанные в данном документе, включают стадии: инокуляции в биореактор клетки (например, клетки млекопитающего, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO)), экспрессирующей рекомбинантную щелочную фосфатазу; получения водной среды для культивирования, которая содержит рекомбинантную щелочную фосфатазу; получения аликвоты из водной среды для культивирования в период от приблизительно дня 6 до приблизительно дня 10, в частности от приблизительно дня 6 до приблизительно дня 8 (например, в приблизительно день 6, приблизительно день 7, приблизительно день 8, приблизительно день 9, приблизительно день 10, например, в приблизительно день 7) после инокуляции; количественного определения общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в виде молярной концентрации на моль рекомбинантной щелочной фосфатазы в аликвоте; сбора водной среды для культивирования и осуществления стадии фильтрации (например, ультрафильтрации, диафильтрации или их комбинации) с получением нерасфасованного раствора лекарственного средства (BDS).

В ходе ферментации аликвоту среды для культивирования используют для определения количества времени, в течение которого поддерживается стадия фильтрации. Например, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,5 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение менее чем приблизительно девяти часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,5 моль/моль до приблизительно 2,7 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение от приблизительно 10 часов до приблизительно 14 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,8 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение от приблизительно 23 часов до приблизительно 27 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,0 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение от приблизительно 38 часов до приблизительно 42 часов.

В одном варианте осуществления, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,3 моль/моль или равную этому значению, то

стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 18 +/- 4 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,4 моль/моль до приблизительно 3,1 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 32 +/- 4 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,2 моль/моль или равную этому значению, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 44 +/- 4 часов.

В другом альтернативном варианте осуществления, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,4 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 17 +/- 3 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,4 моль/моль до приблизительно 3,6 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 31 +/- 3 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,6 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 45 +/- 3 часов.

Посредством способов можно получать BDS, в котором концентрация TSAC контролируется в диапазоне от приблизительно 1,2 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль (например, от приблизительно 1,6 моль/моль до приблизительно 2,4 моль/моль). Данный диапазон концентрации TSAC обеспечивает получение нерасфасованного образца рекомбинантной щелочной фосфатазы в промышленно приемлемых масштабах, который является стабильным (например, с терапевтически эффективным периодом полувыведения) и ферментативно активным для применения у пациентов-людей.

Белок щелочная фосфатаза, описанный в данном документе (например, асфотаза альфа), может продуцироваться клетками млекопитающих или другими клетками, в частности клетками CHO, с применением способов, известных из уровня техники. Такие клетки можно выращивать в чашках, стеклянных колбах или биореакторах для культивирования. Конкретные процессы для культивирования клеток и получения рекомбинантных белков известны из уровня техники, как, например, описанные в Nelson and Geyer, 1991 *Bioprocess Technol.* 13:112-143, и Rea et al., *Supplement to BioPharm International March 2008*, 20-25. Иллюстративные биореакторы включают реакторы периодического действия, периодического действия с подпиткой и непрерывного действия. В некоторых вариантах осуществления белок щелочную фосфатазу получают в биореакторе периодического действия с подпиткой.

Процессы культивирования клеток характеризуются изменчивостью, обусловленной, например, изменчивой физико-химической средой, включая без ограничения изменения pH, температуру, изменения температуры, временные рамки изменений температуры, состав среды для культивирования клеток, питательные добавки для культивирования клеток, изменчивость сырьевого материала от партии к партии, материал для фильтрации среды, различие масштабов биореакторов, стратегию насыщения газом (воздух, кислород и диоксид углерода) и т. д. Как раскрыто в данном документе, может оказываться влияние на выход, профиль относительной активности и профиль

гликозилирования изготавливаемого белка щелочной фосфатазы, и при этом они могут контролироваться в пределах конкретных значений путем изменения одного или нескольких из этих параметров.

Для продуцирования рекомбинантного белка в культуре клеток рекомбинантный ген с необходимыми элементами регуляции транскрипции вначале переносят в клетку-хозяина посредством способов, известных в области биотехнологии. Необязательно переносится второй ген, который придает получающим его клеткам селективное преимущество. В присутствии селективного средства, которое можно применять через несколько дней после переноса гена, выживают только те клетки, которые экспрессируют ген-селектор. Двумя иллюстративными генами для такой селекции являются гены дигидрофолатредуктазы (DHFR) - фермента, участвующего в метаболизме нуклеотидов - и глутаминсинтетазы (GS). В обоих случаях селекция происходит при отсутствии соответствующего метаболита (гипоксантина и тимидина в случае DHFR и глутамин в случае GS), в результате чего предотвращается рост любых нетрансформированных клеток. В целом для эффективной экспрессии рекомбинантного белка не важно, находятся ли ген, кодирующий биофармацевтический препарат, и гены-селекторы в одной и той же плазмиде или нет.

После селекции выжившие клетки могут быть перенесены в виде отдельных клеток во второй сосуд для культивирования, и при этом культуры размножаются с получением клональных популяций. В конечном счете отдельные клоны оценивают в отношении экспрессии рекомбинантного белка, при этом наиболее высокоактивных продуцентов сохраняют для дальнейшего культивирования и анализа. Из этих кандидатов выбирают одну линию клеток с подходящими характеристиками роста и продуктивности для продуцирования рекомбинантного белка. Затем разрабатывается процесс культивирования, который определяется производственными потребностями и требованиями к конечному продукту.

### **Клетки**

Любой тип клеток млекопитающих или клеток, отличных от клеток млекопитающих, которые можно культивировать для получения полипептида, может использоваться в соответствии с настоящим изобретением. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих, которые можно использовать, включают, например, клетки яичника китайского хомячка +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216); линию клеток миеломы мыши BALB/c (NSO/1, номер доступа в ECACC: 85110503); ретинобласты человека (PER.C6 (CruCell, Лейден, Нидерланды)); линию клеток почки обезьяны CV1, трансформированную с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию клеток эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., 1977, J. Gen Virol., 36:59); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1, ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-I 587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки

печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68); клетки MRC 5; клетки FS4 и линию клеток гепатомы человека (Hep G2). В конкретном варианте осуществления культивирование и экспрессия полипептидов и белков происходят в линии клеток яичника китайского хомячка (CHO).

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением можно использовать любое количество коммерчески доступных и коммерчески недоступных гибридных линий клеток, которые экспрессируют полипептиды или белки. Специалисту в данной области будет понятно, что гибридные линии клеток могут иметь различные потребности в питании и/или им могут быть необходимы различные условия культивирования для оптимального роста и экспрессии полипептида или белка, и он сможет модифицировать условия при необходимости.

#### **Плотность посева**

В настоящем изобретении клетки яичника китайского хомячка (CHO) инокулируют, например, высевают, в среду для культивирования. Могут использоваться различные значения плотности посева. В некоторых вариантах осуществления может использоваться плотность посева от  $1,0 \times 10^2$  клеток/мл до  $1,0 \times 10^9$  клеток/мл (например, от  $1,0 \times 10^3$  до  $1,0 \times 10^8$  клеток/мл, например, от  $1,0 \times 10^4$  до  $1,0 \times 10^7$  клеток/мл). В некоторых вариантах осуществления может использоваться плотность посева от  $1,0 \times 10^5$  клеток/мл до  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления может использоваться плотность посева от  $4,0 \times 10^5$  клеток/мл до  $8,0 \times 10^5$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления увеличенная плотность посева может влиять на качество фрагментации асфотазы альфа, измеренное посредством SEC. В некоторых вариантах осуществления плотность посева контролируют при инокуляции с целью снижения риска образования фрагментов.

#### **Температура**

Температура может оказывать влияние на несколько параметров, включая скорость роста, агрегацию, фрагментацию и TSAC. В некоторых вариантах осуществления температура остается постоянной при культивировании клеток CHO в среде для культивирования. В некоторых вариантах осуществления температура составляет от приблизительно  $30^\circ\text{C}$  до приблизительно  $40^\circ\text{C}$ , или от приблизительно  $35^\circ\text{C}$  до приблизительно  $40^\circ\text{C}$ , или от приблизительно  $37^\circ\text{C}$  до приблизительно  $39^\circ\text{C}$  при культивировании клеток CHO в среде для культивирования. В некоторых вариантах осуществления температура составляет приблизительно  $30^\circ\text{C}$ , приблизительно  $30,5^\circ\text{C}$ , приблизительно  $31^\circ\text{C}$ , приблизительно  $31,5^\circ\text{C}$ , приблизительно  $32^\circ\text{C}$ , приблизительно  $32,5^\circ\text{C}$ , приблизительно  $33^\circ\text{C}$ , приблизительно  $33,5^\circ\text{C}$ , приблизительно  $34^\circ\text{C}$ , приблизительно  $34,5^\circ\text{C}$ , приблизительно  $35^\circ\text{C}$ , приблизительно  $35,5^\circ\text{C}$ , приблизительно  $36^\circ\text{C}$ , приблизительно  $36,5^\circ\text{C}$ , приблизительно  $37^\circ\text{C}$ , приблизительно  $37,5^\circ\text{C}$ , приблизительно  $38^\circ\text{C}$ , приблизительно  $38,5^\circ\text{C}$ , приблизительно  $39^\circ\text{C}$ , приблизительно  $39,5^\circ\text{C}$  или приблизительно  $40^\circ\text{C}$  при культивировании клеток CHO в среде для

культивирования. В некоторых вариантах осуществления температура является постоянной в течение от 40 до 200 часов после инокуляции. В некоторых вариантах осуществления температура является постоянной в течение от 50 до 150 часов, или от 60 до 140 часов, или от 70 до 130 часов, или от 80 до 120 часов, или от 90 до 110 часов после инокуляции. В некоторых вариантах осуществления температура является постоянной в течение от 80 до 120 часов после инокуляции. В некоторых вариантах осуществления температура является постоянной в течение 90 часов, 92 часов, 94 часов, 96 часов, 98 часов, 100 часов, 102 часов, 104 часов, 106 часов, 108 часов или 110 часов после инокуляции.

### **Смещение температуры**

Продолжительность цикла в процессах культивирования клеток, особенно непрерывных процессах (например, процессах с периодической подпиткой в биореакторах), обычно ограничивается остаточной жизнеспособностью клеток, которая обычно снижается на протяжении цикла. Следовательно, увеличение периода жизнеспособности клеток требуется для улучшения продуцирования рекомбинантного белка. Проблемы с качеством продукта также побуждают минимизировать уменьшение плотности жизнеспособных клеток и поддерживать высокую жизнеспособность клеток, поскольку гибель клеток может привести к высвобождению сиалидаз в надосадочную жидкость культуры, в результате чего может снижаться содержание сиаловой кислоты в экспрессируемом белке. Соображения очистки белка являются еще одним фактором, побуждающим минимизировать уменьшение плотности жизнеспособных клеток и поддерживать высокую жизнеспособности клеток. Клеточный дебрис и содержание мертвых клеток в культуре могут отрицательно влиять на способность выделять и/или очищать белковый продукт в конце цикла культивирования. Таким образом, при сохранении жизнеспособности клеток в течение более длительного периода времени в культуре снижается загрязнение среды для культивирования клеточными белками и ферментами (например, клеточными протеазами и сиалидазами), которые могут вызывать разрушение и в конечном итоге снижение качества требуемого гликопротеина, продуцируемого клетками.

Для достижения высокой жизнеспособности клеток в культурах клеток можно применять многие способы. Один включает снижение температуры культивирования после первоначального культивирования при нормальной температуре. Например, см. Ressler et al., 1996, *Enzyme and Microbial Technology* 18:423-427. Как правило, клетки млекопитающих или другие типы клеток, способные экспрессировать белок, представляющий интерес, вначале выращивают при нормальной температуре для увеличения показателей количества клеток. Такие "нормальные" температуры для каждого типа клеток обычно составляют около 37°C (например, от приблизительно 35°C до приблизительно 39°C, включая, например, 35,0°C, 35,5°C, 36,0°C, 36,5°C, 37,0°C, 37,5°C, 38,0°C, 38,5°C и/или 39,0°C). В одном конкретном варианте температуру для получения асфотазы альфа вначале устанавливают на приблизительно 37°C. Когда достигается достаточно высокая плотность клеток, температура культивирования целой культуры клеток может затем быть смещена

(например, уменьшена) для способствования продуцированию белка. В большинстве случаев при снижении температуры клетки смещаются в сторону неростовой части G1 клеточного цикла, в результате чего может увеличиваться плотность и жизнеспособность клеток по сравнению с предыдущей окружающей средой с более высокой температурой. Кроме того, более низкая температура может также способствовать продуцированию рекомбинантных белков благодаря увеличению скорости продуцирования клеточных белков, облегчению посттрансляционной модификации белков (например, гликозилирования), уменьшению фрагментации или агрегации свежепродуцированных белков, облегчению сворачивания белков и образования 3D-структуры (за счет чего поддерживается активность) и/или уменьшению разрушения свежепродуцированных белков. В некоторых вариантах осуществления температура уменьшается на 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C или 10°C. В некоторых вариантах осуществления температура уменьшается до приблизительно 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C или 35°C. В некоторых вариантах осуществления более низкая температура составляет от приблизительно 30°C до приблизительно 35°C (например, 30,0°C, 30,5°C, 31,0°C, 31,5°C, 32,0°C, 32,5°C, 33,0°C, 33,5°C, 34,0°C, 34,5°C и/или 35,0°C). В других вариантах осуществления температуру для получения асфотазы альфа вначале устанавливают на значение от приблизительно 35,0°C до приблизительно 39,0°C, а затем смещают до значения от приблизительно 30,0°C до приблизительно 35,0°C. В одном варианте осуществления температуру для получения асфотазы альфа вначале устанавливают на приблизительно 37,0°C, а затем смещают до приблизительно 30°C. В другом варианте осуществления температуру для получения асфотазы альфа вначале устанавливают на приблизительно 36,5°C, а затем смещают до приблизительно 33°C. В еще одном варианте осуществления температуру для получения асфотазы альфа вначале устанавливают на приблизительно 37,0°C, а затем смещают до приблизительно 33°C. В еще одном дополнительном варианте осуществления температуру для получения асфотазы альфа вначале устанавливают на приблизительно 36,5°C, а затем смещают до приблизительно 30°C. В других вариантах осуществления может использоваться несколько (например, более чем одна) стадий смещения температуры.

Время поддержания культуры при конкретной температуре перед смещением к другой температуре может быть определено для достижения достаточной (или требуемой) плотности клеток при поддержании жизнеспособности клеток и способности продуцировать белок, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления культуру клеток выращивают при первой температуре до тех пор, пока плотность жизнеспособных клеток не достигнет от приблизительно  $10^5$  клеток/мл до приблизительно  $10^7$  клеток/мл (например,  $1 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^5$ ,  $2,0 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $3,0 \times 10^5$ ,  $3,5 \times 10^5$ ,  $4,0 \times 10^5$ ,  $4,5 \times 10^5$ ,  $5,0 \times 10^5$ ,  $5,5 \times 10^5$ ,  $6,0 \times 10^5$ ,  $6,5 \times 10^5$ ,  $7,0 \times 10^5$ ,  $7,5 \times 10^5$ ,  $8,0 \times 10^5$ ,  $8,5 \times 10^5$ ,  $9,0 \times 10^5$ ,  $9,5 \times 10^5$ ,  $1,0 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $2,0 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $3,0 \times 10^6$ ,  $3,5 \times 10^6$ ,  $4,0 \times 10^6$ ,  $4,5 \times 10^6$ ,  $5,0 \times 10^6$ ,  $5,5 \times 10^6$ ,  $6,0 \times 10^6$ ,  $6,5 \times 10^6$ ,  $7,0 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$ ,  $8,0 \times 10^6$ ,  $8,5 \times 10^6$ ,  $9,0 \times 10^6$ ,  $9,5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  клеток/мл или больше) перед смещением к другой температуре. В одном варианте осуществления

культуру клеток выращивают при первой температуре до тех пор, пока плотность жизнеспособных клеток не достигнет от приблизительно  $2,5$  до приблизительно  $3,4 \times 10^6$  клеток/мл перед смещением к другой температуре. В другом варианте осуществления культуру клеток выращивают при первой температуре до тех пор, пока плотность жизнеспособных клеток не достигнет от приблизительно  $2,5$  до приблизительно  $3,2 \times 10^6$  клеток/мл перед смещением к другой температуре. В еще одном варианте осуществления культуру клеток выращивают при первой температуре до тех пор, пока плотность жизнеспособных клеток не достигнет от приблизительно  $2,5$  до приблизительно  $2,8 \times 10^6$  клеток/мл перед смещением к другой температуре.

В некоторых вариантах осуществления в способе согласно настоящему изобретению предусматривается, что смещение температуры происходит через 50-150 часов, или 60-140 часов, или 70-130 часов, или 80-120 часов, или 90-110 часов после инокуляции. В некоторых вариантах осуществления в способе согласно настоящему изобретению предусматривается, что температура уменьшается через от приблизительно 80 часов до 150 часов после инокуляции, от приблизительно 90 часов до 100 часов после инокуляции или приблизительно 96 часов после инокуляции. В некоторых вариантах осуществления смещение температуры происходит через 80-120 часов после инокуляции. В некоторых вариантах осуществления смещение температуры происходит через 90 часов, 92 часа, 94 часа, 96 часов, 98 часов, 100 часов, 102 часа, 104 часа, 106 часов, 108 часов или 110 часов после инокуляции. В некоторых вариантах осуществления температуру после смещения температуры поддерживают до тех пор, пока не будут собраны клетки СНО.

### **pH**

Изменение pH среды для выращивания в культуре клеток может влиять на клеточную протеолитическую активность, секрецию и уровни продуцирования белка. Большинство линий клеток хорошо растут при pH приблизительно 7-8. Хотя оптимальный pH для роста клеток относительно незначительно варьируется среди различных клеточных линий, некоторые линии нормальных клеток-фибробластов демонстрируют наилучшие результаты при pH 7,0-7,7, а трансформированные клетки обычно демонстрируют наилучшие результаты при pH 7,0-7,4 (Eagle J Cell Physiol 82:1-8, 1973). В некоторых вариантах осуществления pH среды для культивирования для получения асфотазы альфа составляет приблизительно pH 6,5-7,7 (например, 6,50, 6,55, 6,60, 6,65, 6,70, 6,75, 6,80, 6,85, 6,90, 6,95, 7,00, 7,05, 7,10, 7,15, 7,20, 7,25, 7,30, 7,35, 7,39, 7,40, 7,45, 7,50, 7,55, 7,60, 7,65 или 7,70).

### **Среда для культивирования**

В некоторых вариантах осуществления применяют периодическое культивирование, при котором после инокуляции не добавляют какого-либо дополнительного количества среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления применяют периодическое культивирование с подпиткой, при котором после инокуляции добавляют одну или несколько болюсных доз среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления после инокуляции добавляют две, три, четыре, пять или шесть болюсных

доз среды для культивирования.

В различных вариантах осуществления щелочную фосфатазу (например, асфотазу альфа) получают посредством процесса, в котором дополнительные болюсные дозы среды для культивирования добавляют в производственный биореактор. Например, можно добавлять одну, две, три, четыре, пять, шесть или больше болюсных доз среды для культивирования. В одном конкретном варианте добавляют три болюсные дозы среды для культивирования. В различных вариантах осуществления такие дополнительные болюсные дозы среды для культивирования можно добавлять в различных количествах. Например, такие болюсные дозы среды для культивирования можно добавлять в количестве, составляющем приблизительно 20%, 25%, 30%, 33%, 40%, 45%, 50%, 60%, 67%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 125%, 130%, 133%, 140%, 150%, 160%, 167%, 170%, 175%, 180%, 190%, 200% или больше от исходного объема среды для культивирования в производственном биореакторе. В одном конкретном варианте осуществления такие болюсные дозы среды для культивирования можно добавлять в количестве, составляющем приблизительно 33%, 67%, 100% или 133% от исходного объема. В различных вариантах осуществления такое добавление дополнительных болюсных доз может происходить в различные моменты времени в ходе периода роста клеток или продуцирования белка. Например, болюсные дозы можно добавлять в день 1, день 2, день 3, день 4, день 5, день 6, день 7, день 8, день 9, день 10, день 11, день 12 или позже в ходе процесса. В одном конкретном варианте осуществления такие болюсные дозы среды для культивирования могут добавляться через день (например, (1) в день 3, день 5 и день 7; (2) в день 4, день 6 и день 8 или (3) в день 5, день 7 и день 9). На практике частота, количество, момент времени и другие параметры добавления болюсных доз среды для культивирования могут свободно использоваться в комбинации в соответствии с вышеуказанным ограничением и определяться экспериментальной практикой.

Коммерчески доступными являются различные среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования выбрана из группы, состоящей из бессывороточной среды EX-CELL<sup>®</sup> 302; среды CD DG44; среды BD SELECT<sup>™</sup>; среды SFM4CHO или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит комбинацию коммерчески доступных сред, например, среды SFM4CHO и среды BD SELECT<sup>™</sup>. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования содержит комбинацию коммерчески доступных сред, например, среды SFM4CHO и среды BD SELECT<sup>™</sup> в соотношении, выбранном из 90/10, 80/20, 75/25, 70/30, 60/40 или 50/50.

#### **Питательные добавки**

Различные питательные добавки, также называемые "питательными средами", являются коммерчески доступными и известны специалистам в данной области. Питательные добавки включают среды (отличные от сред для культивирования), добавляемые к культуре клеток после того, как произошла инокуляция. В некоторых случаях питательную добавку можно использовать для замены питательных веществ,



потребляемых растущими клетками в культуре. В некоторых вариантах осуществления питательную добавку добавляют для оптимизации продуцирования требуемого белка или для оптимизации активности требуемого белка. Разработаны и являются коммерчески доступными многочисленные питательные добавки. Хотя заявленная цель питательных добавок состоит в том, чтобы увеличить аспект разработки процесса, не существует универсальной питательной добавки, которая действует для всех клеток и/или всех продуцируемых белков. Выбор масштабируемой и подходящей питательной добавки для культуры клеток, которая может действовать в комбинации с требуемой линией клеток, продуцируемым белком и заданной базовой средой для достижения требуемого титра и характеристик роста, не является общепринятым. Типичный подход со скринингом нескольких коммерчески доступных питательных добавок и определением наиболее подходящей добавки для комбинации конкретной линии клеток, конкретного продуцируемого белка и базовой среды может оказаться неудачным из-за множества переменных, присутствующих в процессе культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления питательная добавка выбрана из группы, состоящей из добавки EfficientFeed C+ AGT™ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс), комбинации CELL BOOST™ 2+CELL BOOST™ 4 (GE Healthcare, Швеция), комбинации CELL BOOST™ 2+CELL BOOST™ 5 (GE Healthcare, Швеция), CELL BOOST™ 6 (GE Healthcare, Швеция) и CELL BOOST™ 7a+CELL BOOST™ 7b (GE Healthcare, Швеция), подпитки для клеток СНО в биореакторе (Sigma-Aldrich; например, № продукта по каталогу C1615) или их комбинаций.

CELL BOOST™ 7a может быть описана как первая питательная добавка, не содержащая компонентов животного происхождения (ADCF), содержащая одну или несколько аминокислот, витаминов, солей, микроэлементов, полоксамер и глюкозу, при этом первая питательная добавка ADCF не содержит гипоксантин, тимидин, инсулин, L-глутамин, факторы роста, пептиды, белки, гидролизаты, феноловый красный и 2-меркаптоэтанол. CELL BOOST™ 7a представляет собой добавку с определенным химическим составом. Фраза "не содержащая компонентов животного происхождения" или "ADCF" относится к добавке, никакие ингредиенты которой не получены непосредственно из животного источника, например, они получены не из источника, относящегося к крупному рогатому скоту. В некоторых вариантах осуществления питательная добавка представляет собой CELL BOOST™ 7a.

CELL BOOST™ 7b может быть описана как вторая питательная добавка ADCF, содержащая одну или несколько аминокислот, при этом вторая питательная добавка ADCF не содержит гипоксантин, тимидин, инсулин, L-глутамин, факторы роста, пептиды, белки, гидролизаты, феноловый красный, 2-меркаптоэтанол и полоксамер. CELL BOOST™ 7b представляет собой добавку с определенным химическим составом. В некоторых вариантах осуществления питательная добавка представляет собой CELL BOOST™ 7b.

В некоторых вариантах осуществления используются комбинации коммерчески доступных питательных добавок. Термин "питательная добавка" относится как к отдельной

питательной добавке, так и к комбинациям питательных добавок. Например, в некоторых вариантах осуществления комбинация питательных добавок включает комбинацию CELL BOOST™ 7a и CELL BOOST™ 7b.

В различных вариантах осуществления щелочную фосфатазу (например, асфотазу альфа) получают посредством процесса, в котором дополнительные добавляемые количества питательной добавки добавляют в производственный биореактор. В некоторых вариантах осуществления питательную добавку добавляют в течение определенного периода времени, например, в течение периода времени, находящегося в диапазоне от 1 минуты до 2 часов. В некоторых вариантах осуществления питательную добавку добавляют в виде болюсной дозы. Например, можно добавлять одну, две, три, четыре, пять, шесть или больше болюсных доз питательной добавки. В некоторых вариантах осуществления питательную добавку добавляют более чем 2 отдельных раза, например, 2-6 отдельных раз. В различных вариантах осуществления такие дополнительные болюсные дозы питательной добавки можно добавлять в различных количествах. Например, такие болюсные дозы питательной добавки можно добавлять в количестве от приблизительно 1% до 20%, от 1% до 10% или от 1% до 5% (вес/об.) от исходного объема среды для культивирования в производственном биореакторе. В одном конкретном варианте осуществления такие болюсные дозы питательной добавки можно добавлять в количестве от 1% до 20%, от 1% до 10% или от 1% до 5% (вес/об.) от исходного объема.

В некоторых вариантах осуществления используют комбинацию питательных добавок, и при этом первую питательную добавку, например, CELL BOOST™ 7a, добавляют в концентрации от 0,5% до 4% (вес/об.) среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления используют комбинацию питательных добавок, и при этом вторую питательную добавку, например, CELL BOOST™ 7b, добавляют в концентрации от 0,05% до 0,8% (вес/об.) среды для культивирования. В конкретных вариантах осуществления, в которых комбинация питательных добавок включает CELL BOOST™ 7a и CELL BOOST™ 7b, болюсные дозы питательной добавки можно добавлять в количестве от 1% до 20%, от 1% до 10% или от 1% до 5% (вес/об.) от исходного объема.

В различных вариантах осуществления такое добавление дополнительных болюсных доз может происходить в различные моменты времени после инокуляции. Например, болюсные дозы можно добавлять в день 1, день 2, день 3, день 4, день 5, день 6, день 7, день 8, день 9, день 10, день 11, день 12 или позже после инокуляции. На практике частота, количество, момент времени и другие параметры добавления болюсных доз питательной добавки могут свободно использоваться в комбинации в соответствии с вышеуказанным ограничением и определяться экспериментальной практикой.

В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в данном документе, дополнительно включает добавление цинка в указанную среду для культивирования в ходе получения рекомбинантного полипептида. В некоторых вариантах осуществления можно добавлять цинк для обеспечения концентрации цинка, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 300 мкМ, в указанной среде для культивирования. В одном варианте

осуществления можно добавлять цинк для обеспечения концентрации цинка, составляющей от приблизительно 10 до приблизительно 200 мкМ (например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 мкМ), в среде для культивирования. В некоторых вариантах осуществления цинк добавляют для обеспечения концентрации цинка в среде для культивирования, составляющей от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 150 мкМ или от приблизительно 60 мкМ до приблизительно 150 мкМ. В одном варианте осуществления цинк добавляют для обеспечения концентрации цинка в среде для культивирования, составляющей от приблизительно 30, 60 или 90 мкМ цинка. В некоторых вариантах осуществления цинк добавляют в указанную среду для культивирования в виде болюсной дозы, непрерывно, полунепрерывно или в виде их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления цинк добавляют через один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней, десять дней, одиннадцать дней, двенадцать дней и/или тринадцать дней после инокуляции.

### **Сбор**

Преыдушие исследования позволили предположить, что задержка сроков сбора образцов была связана с жизнеспособностью и снижением TSAC, поэтому сроки сбора могут иметь потенциальное влияние на другие CQA. В различных вариантах осуществления щелочную фосфатазу (например, асфотазу альфа) собирают в момент времени приблизительно 200 ч., 210 ч., 220 ч., 230 ч., 240 ч., 250 ч., 260 ч., 264 ч., 270 ч., 280 ч., 288 ч. (например, 12 дней) или более чем 12 дней.

### **Последующие процессы**

Термин "последующий(последующие) процесс(процессы)", используемый в данном документе, обычно относится к полным процессам или части(частям) процессов извлечения и очистки щелочных фосфатаз (например, асфотазы альфа), полученных из таких источников, как клетки культуры или ферментационный бульон.

Как правило, при последующей обработке продукт извлекают из его естественного состояния в качестве компонента ткани, клетки или ферментационного бульона за счет постепенных улучшений чистоты и концентрации. Например, удаление нерастворимого материала может являться первой стадией, которая включает захват продукта в виде растворенного вещества в жидкости, не содержащей твердых частиц (например, отделение клеток, клеточного дебриса или другого материала в виде твердых частиц из ферментационного бульона). Иллюстративные операции для достижения этого включают, например, фильтрацию, центрифугирование, седиментацию, осаждение, флокуляцию, электроосаждение, гравитационное отделение и т. д. Дополнительные операции могут включать, например, измельчение, гомогенизацию или выщелачивание для извлечения продуктов из твердых источников, таких как растительные и животные ткани. Второй стадией может являться стадия "выделения продукта", на которой удаляются компоненты, свойства которых заметно отличаются от свойств требуемого продукта. Для большинства продуктов вода является основной примесью, и стадии выделения предназначены для удаления большей ее части, уменьшения объема материала, подлежащего обработке, и

концентрирования продукта. Для данной стадии может использоваться экстракция растворителем, адсорбция, ультрафильтрация и осаждение в отдельности или в комбинации. Следующая стадия включает очистку продукта, в ходе которой отделяются загрязнители, очень близко напоминающие продукт по физическим и химическим свойствам. Возможные способы очистки включают, например, аффинную, ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействий, хроматографию со смешанным режимом, эксклюзионную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию, ультрафильтрацию/диафильтрацию, кристаллизацию и фракционное осаждение. В некоторых вариантах осуществления последующие процессы включают по меньшей мере одно из осветления собранного материала, ультрафильтрации, диафильтрации, инактивации вирусов, аффинного захвата и их комбинаций. В данном документе описаны последующие процессы.

### **Определение общего содержания сиаловой кислоты**

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, дополнительно включают измерение общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в рекомбинантной щелочной фосфатазе из аликвоты, извлеченной из среды для культивирования, например, в период от приблизительно дня 6 до приблизительно дня 10, в частности от приблизительно дня 6 до приблизительно дня 8 (например, в приблизительно день 6, приблизительно день 7, приблизительно день 8, приблизительно день 9, приблизительно день 10, например, в приблизительно день 7). Аликвоту можно получить асептически из биореактора для предотвращения загрязнения. Объем аликвоты может составлять от приблизительно 1 мл до приблизительно 1000 мл (например, от приблизительно 25 мл до приблизительно 500 мл, например, от приблизительно 50 мл до приблизительно 300 мл, например, приблизительно 100 мл или приблизительно 200 мл). Получение аликвоты может дополнительно включать центрифугирование аликвоты и/или удаление надосадочной жидкости из аликвоты. Данная стадия может также включать очистку щелочной фосфатазы из надосадочной жидкости с помощью хроматографической колонки (например, колонки с белком А, колонки с белком А длиной 1 см, например, колонки HiTrap с белком А объемом 1 мл или RoboColumn с белком А объемом 600 мкл). В некоторых вариантах осуществления щелочную фосфатазу можно подвергать замене буфера. Щелочную фосфатазу также можно концентрировать, например, перед определением концентрации TSAC.

Доступны коммерческие способы количественного определения углеводов, например, от ThermoFisher. Как правило, TSAC высвобождается из гликопротеина, например, асфотазы альфа, с помощью кислотного гидролиза, а высвободившиеся сахара/TSAC выявляют посредством электрохимического выявления с помощью колоночной хроматографии, такой как высокоэффективная анионообменная хроматография с использованием методики импульсного амперометрического выявления (HPLC-PAD). Полученные уровни количественно определяют в расчете на один моль относительно внутреннего стандарта и выражают в зависимости от общего количества

молей белка.

Как описано в данном документе, TSAC влияет на период полувыведения рекомбинантной щелочной фосфатазы в физиологических условиях и, таким образом, служит критической характеристикой качества рекомбинантно продуцируемых щелочных фосфатаз, таких как, например, асфотаза альфа. Строгий контроль диапазона TSAC важен для воспроизводимости и cGMP. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от приблизительно 0,8 моль/моль до приблизительно 4,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от приблизительно 0,9 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от приблизительно 1,0 моль/моль до приблизительно 2,8 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от приблизительно 1,2 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от приблизительно 1,2 моль/моль до приблизительно 2,4 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет приблизительно 0,9 моль/моль, приблизительно 1,0 моль/моль, приблизительно 1,1 моль/моль, приблизительно 1,2 моль/моль, приблизительно 1,3 моль/моль, приблизительно 1,4 моль/моль, приблизительно 1,5 моль/моль, приблизительно 1,6 моль/моль, приблизительно 1,7 моль/моль, приблизительно 1,8 моль/моль, приблизительно 1,9 моль/моль, приблизительно 2,0 моль/моль, приблизительно 2,1 моль/моль, приблизительно 2,2 моль/моль, приблизительно 2,3 моль/моль, приблизительно 2,4 моль /моль, приблизительно 2,5 моль/моль, приблизительно 2,6 моль/моль, приблизительно 2,7 моль/моль, приблизительно 2,8 моль/моль, приблизительно 2,9 моль/моль или приблизительно 3,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы.

В некоторых вариантах осуществления TSAC рекомбинантной щелочной фосфатазы уменьшается в ходе последующей обработки. В некоторых вариантах осуществления TSAC рекомбинантных щелочных фосфатаз уменьшается в результате действия ферментов сиалидаз, присутствующих в растворе, содержащем рекомбинантную щелочную фосфатазу, например, в культуре клеток, HCCF и/или фильтрационном пуле UFDF. В некоторых вариантах осуществления сиалидазы избирательно удаляют из культуры клеток, HCCF и/или фильтрационного пула UFDF с достижением TSAC, составляющего от приблизительно 0,9 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. Сиалидазы могут быть избирательно удалены, например, с помощью одного или комбинации из специфичных в отношении сиалидазы ингибиторов, антител, ионообменной и/или аффинной хроматографии, иммунопреципитации и т. п.

В некоторых вариантах осуществления компоненты, представляющие собой сиаловую кислоту, добавляют к рекомбинантной щелочной фосфатазе с помощью ферментов сиалилтрансфераз, присутствующих в растворе, содержащем рекомбинантную щелочную фосфатазу, например, в культуре клеток, HCCF и/или фильтрационном пуле

UFDF. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные сиалилтрансферазы экзогенно добавляют в культуру клеток, HCCF и/или фильтрационный пул UFDF с достижением TSAC, составляющего от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы.

#### **Определение активности рекомбинантной щелочной фосфатазы**

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, дополнительно включают измерение активности рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления активность выбрана из способа, выбранного из по меньшей мере одного из ферментативного анализа щелочной фосфатазы с использованием pNPP и анализа гидролиза неорганического пирофосфата (PPi). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно из значений  $K_{cat}$  и  $K_m$  рекомбинантной щелочной фосфатазы увеличивается в анализе гидролиза неорганического пирофосфата (PPi). В некоторых вариантах осуществления способ включает определение интеграла концентрации жизнеспособных клеток (IVCC).

Последняя стадия может использоваться для тонкой очистки продукта - процессов, которые завершаются упаковыванием продукта в стабильную, легко транспортируемую и удобную форму. Хранение при 2-8°C, замораживание при от -20°C до -80°C, кристаллизация, обезвоживание, лиофилизация, сублимационная сушка и распылительная сушка являются иллюстративными способами на этой заключительной стадии. В зависимости от продукта и его предполагаемого применения в ходе тонкой очистки продукта может также осуществляться стерилизация продукта и удаление или деактивация следовых загрязнителей (например, вирусов, эндотоксинов, отходов метаболизма и пирогенов), которые могут отрицательно влиять на безопасность продукта.

В способах извлечения продукта может использоваться комбинация двух или более стадий, обсуждаемых в данном документе. Например, посредством адсорбции в кипящем слое (EBA) осуществляют удаление нерастворимых веществ и выделение продукта за одну стадию. В отношении обзора EBA см. Kennedy, *Curr Protoc Protein Sci.* 2005 Jun; Chapter 8: Unit 8.8. Кроме того, посредством аффинной хроматографии часто осуществляют выделение и очистку за одну стадию.

Обзор последующих процессов очистки рекомбинантного белка, продуцируемого в клетках культуры, см. Rea, 2008 Solutions for Purification of Fc-fusion Proteins. *BioPharm Int. Supplements* March 2:20-25. Последующие процессы для щелочных фосфатаз, раскрытые в данном документе, могут включать по меньшей мере одну или любую комбинацию из иллюстративных стадий, описанных в данном документе.

#### **Процесс осветления собранного материала**

В некоторых вариантах осуществления способа рекомбинантную щелочную фосфатазу выделяют из культуры клеток с помощью по меньшей мере одной стадии очистки для образования собранной осветленной культуральной жидкости (HCCF), например, стадии "сбора" или стадии осветления собранного материала. "Сбор" культуры клеток обычно относится к процессу сбора культуры клеток из культурального контейнера,

например, биореактора. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна стадия очистки включает по меньшей мере одно из фильтрации, центрифугирования и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления стадия осветления собранного материала включает центрифугирование и/или фильтрацию собранной культуры клеток с целью удаления клеток и клеточного дебриса (например, нерастворимых биоматериалов) для извлечения продукта, например, рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления клетки и клеточный дебрис удаляют с целью получения осветленной отфильтрованной жидкости, пригодной для хроматографии. В некоторых вариантах осуществления осветленная отфильтрованная жидкость известна как собранная осветленная культуральная жидкость или НССФ. В некоторых вариантах осуществления культуру клеток подвергают комбинации центрифугирования и глубинной фильтрации для получения НССФ. Возможные используемые растворы на данной стадии могут включать буфер для извлечения (например, 50 мМ фосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 7,50). Состав подходящих буферов для извлечения может быть выбран специалистом в данной области.

В некоторых вариантах осуществления НССФ характеризуется общим содержанием сиаловой кислоты (TSAC), составляющим от приблизительно 1,9 моль/моль до приблизительно 4,3 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления НССФ характеризуется TSAC, составляющим от приблизительно 2,2 моль/моль до приблизительно 3,6 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления НССФ характеризуется TSAC, составляющим от приблизительно 2,2 моль/моль до приблизительно 3,4 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления НССФ характеризуется TSAC, составляющим от приблизительно 1,9 моль/моль до приблизительно 3,1 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления НССФ характеризуется TSAC, составляющим приблизительно 2,0, приблизительно 2,1, приблизительно 2,2, приблизительно 2,3, приблизительно 2,4, приблизительно 2,5, приблизительно 2,6, приблизительно 2,7, приблизительно 2,8, приблизительно 2,9, приблизительно 3,0, приблизительно 3,1, приблизительно 3,2, приблизительно 3,3, приблизительно 3,4, приблизительно 3,5, приблизительно 3,6, приблизительно 3,7, приблизительно 3,8, приблизительно 3,9, приблизительно 4,0, приблизительно 4,1, приблизительно 4,2, приблизительно 4,3, приблизительно 4,4 или приблизительно 4,5 моль/моль.

#### **Ультрафильтрация и/или диафильтрация после сбора**

В некоторых вариантах осуществления способа после по меньшей мере одной стадии очистки осуществляют дополнительную стадию очистки с образованием фильтрационного пула, также известного как "пул UFDF" или "UFDF". В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна стадия очистки предназначена для концентрирования и разбавления буфера. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна стадия очистки включает по меньшей мере одно из осветления собранного материала, фильтрации, ультрафильтрации, диафильтрации, инактивации вирусов, аффинного захвата и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления по

меньшей мере одна стадия очистки включает ультрафильтрацию (UF) и/или диафильтрацию (DF). Иллюстративные стадии процесса UF включают, например, очистку/хранение фильтрующей мембраны перед использованием, струйную промывку после очистки/после хранения, уравнивание (например, с помощью буфера, содержащего 50 мМ фосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 7,50), загрузку, концентрирование, диафильтрацию, разбавление/струйную промывку/извлечение (например, с помощью буфера, содержащего 50 мМ фосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 7,50) и струйную промывку/очистку/хранение фильтрующей мембраны после использования.

В некоторых вариантах осуществления после UF/DF UFDF разбавляют до концентрации белка от приблизительно 1,7 г/л до приблизительно 5,3 г/л, затем выдерживают при температуре от приблизительно 13°C до приблизительно 27°C в течение от приблизительно нуля до приблизительно 60 часов перед хранением и/или дальнейшей очисткой. "Поддержание" или "выдерживание" UFDF, как используется в данном документе, относится к хранению UFDF при одной и той же температуре (например, в пределах  $\pm$  приблизительно 1°C или в пределах определенного диапазона, такого как от 19°C до 25°C) в течение намеченного периода времени, например, "времени поддержания" (в пределах  $\pm$  приблизительно 2 часов). Подробности "поддержания" или "выдерживания" при постоянной температуре могут зависеть от масштаба изготовления и практических соображений масштаба изготовления. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают для того, чтобы он служил контрольной точкой в процессе получения рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают с целью обеспечения однородного качества продукта. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают с целью облегчения последующей обработки.

В некоторых вариантах осуществления TSAC рекомбинантной щелочной фосфатазы уменьшается в течение времени поддержания UFDF. В некоторых вариантах осуществления снижение TSAC коррелирует с концентрацией белка, периодом времени и/или температурой в течение времени поддержания UFDF.

В некоторых вариантах осуществления время поддержания UFDF начинается сразу после завершения диафильтрации. В некоторых вариантах осуществления время поддержания UFDF начинается сразу после окончания стадии фильтрации. В некоторых вариантах осуществления время поддержания UFDF начинается сразу после окончания UF/DF. В некоторых вариантах осуществления время поддержания UFDF начинается сразу после завершения рециркуляции в конце стадии UF/DF. В некоторых вариантах осуществления время поддержания UFDF начинается сразу после завершения фильтрации и переноса продукта UF/DF.

В некоторых вариантах осуществления UFDF разбавляют для достижения требуемой концентрации белка. В некоторых вариантах осуществления UFDF имеет концентрацию белка, составляющую от приблизительно 1,0 г/л до приблизительно 6,0 г/л. В некоторых вариантах осуществления UFDF имеет концентрацию белка, составляющую





35 часов. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают в течение приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов или приблизительно 20 часов. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают в течение приблизительно 29 часов, приблизительно 30 часов, приблизительно 31 часа, приблизительно 32 часов, приблизительно 33 часов, приблизительно 34 часов или приблизительно 35 часов. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают в течение приблизительно 42 часов, приблизительно 43 часов, приблизительно 44 часов, приблизительно 45 часов, приблизительно 46 часов, приблизительно 47 часов или приблизительно 48 часов. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают в течение приблизительно 14-20 часов. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают в течение приблизительно 28-34 часов. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают в течение приблизительно 42-48 часов.

Как описано выше, время поддержания в ходе стадии фильтрации (например, UFDF) зависит от концентрации TSAC, полученной во время роста клеток (например, от приблизительно дня 6 до приблизительно дня 10, например, от приблизительно дня 6 до приблизительно дня 8, например, в приблизительно день 7). Например, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,5 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение менее чем приблизительно девяти часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,5 моль/моль до приблизительно 2,7 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение от приблизительно 10 часов до приблизительно 14 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,8 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение от приблизительно 23 часов до приблизительно 27 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,0 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение от приблизительно 38 часов до приблизительно 42 часов. В некоторых вариантах осуществления концентрация TSAC в аликвоте может составлять менее чем приблизительно 2,5 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение менее чем приблизительно девяти часов. В качестве альтернативы концентрация TSAC в аликвоте может составлять от приблизительно 2,5 моль/моль до приблизительно 2,7 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно 10 часов до приблизительно 14 часов.

В одном альтернативном варианте осуществления, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,3 моль/моль или равную этому значению, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 18 +/- 4 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,4 моль/моль до приблизительно 3,1 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 32 +/- 4 часов. Если аликвота имеет концентрацию

TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,2 моль/моль или равную этому значению, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 44 +/- 4 часов.

В другом альтернативном варианте осуществления, если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,4 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 17 +/- 3 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,4 моль/моль до приблизительно 3,6 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 31 +/- 3 часов. Если аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,6 моль/моль, то стадию фильтрации можно поддерживать в течение приблизительно 45 +/- 3 часов.

В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают при температуре от приблизительно 10°C до приблизительно 30°C. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают при температуре от приблизительно 13°C до приблизительно 27°C. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают при температуре от приблизительно 14°C до приблизительно 26°C. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают при температуре от приблизительно 15°C до приблизительно 26°C. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают при температуре от приблизительно 15°C до приблизительно 25°C. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают при температуре от приблизительно 19°C до приблизительно 25°C. В некоторых вариантах осуществления UFDF поддерживают при температуре приблизительно 22°C. В некоторых вариантах осуществления UFDF сохраняют в конце времени поддержания до осуществления дополнительных стадий последующей обработки. В некоторых вариантах осуществления UFDF хранят при -80°C после мгновенного замораживания.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная стадия очистки дополнительно включает стадию инактивации вирусов. В некоторых вариантах осуществления стадия инактивации вирусов включает процесс инактивации вирусов растворителем/детергентом для химической инактивации вирусных частиц. Иллюстративный растворитель/детергент может содержать 10% полисорбата 80, 3% TNBP, 50 mM фосфата натрия и 100 mM NaCl.

### **Хроматография**

В некоторых вариантах осуществления способа UFDF подвергают по меньшей мере одной стадии хроматографии с получением частично очищенной рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления UFDF подвергают по меньшей мере одной стадии хроматографии с получением частично очищенной рекомбинантной щелочной фосфатазы, где рекомбинантная щелочная фосфатаза характеризуется общим содержанием сиаловой кислоты (TSAC), составляющим от приблизительно 0,9 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну стадию хроматографии осуществляют для

дополнительной очистки продукта и/или отделения примесей/загрязнителей. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна стадия хроматографии представляет собой хроматографию на белке. В некоторых вариантах осуществления хроматография на белке представляет собой гель-фильтрационную хроматографию, ионообменную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию (RP), аффинную хроматографию, адсорбцию в кипящем слое (EVA), хроматографию со смешанным режимом и/или хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC). В некоторых вариантах осуществления хроматография на белке представляет собой аффинную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления хроматография на белке представляет собой хроматографию с белком А. В некоторых вариантах осуществления с помощью хроматографии с белком А захватывают продукт (например, щелочную фосфатазу, такую как асфотаза альфа). Например, может применяться процесс хроматографии с белком А на колонке Mab Select SuRe от GE Healthcare. Иллюстративные буферы и растворы, используемые в хроматографии с белком А, включают, например, уравнивающий/промывочный буфер (например, 50 мМ фосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 7,50), элюирующий буфер (например, 50 мМ Трис, pH 11,0), буфер для отгонки (например, 100 мМ цитрата натрия, 300 мМ NaCl, pH 3,2), буфер для струйной промывки, очищающий раствор (например, 0,1 М NaOH) и т. д.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна стадия хроматографии включает дополнительную стадию хроматографии и/или очистки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная стадия хроматографии включает колоночную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления колоночная хроматография представляет собой гель-фильтрационную хроматографию, ионообменную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию (RP), аффинную хроматографию, адсорбцию в кипящем слое (EVA), хроматографию со смешанным режимом и/или хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC). В некоторых вариантах осуществления колоночная хроматография включает хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC). В некоторых вариантах осуществления в HIC используются колонки с бутилсефарозой или бутилагарозой CAPTO<sup>®</sup>. Иллюстративные буферы и растворы, используемые в процессе HIC с бутилагарозой CAPTO<sup>®</sup>, включают, например, загрузочный буфер для разбавления/буфер для предварительного уравнивания (например, 50 мМ фосфата натрия, 1,4 М сульфата натрия, pH 7,50), уравнивающий буфер/промывочный буфер/элюирующий буфер (например, все из которых содержат фосфат натрия и сульфат натрия), буфер для отгонки (например, содержащий фосфат натрия) и т. д. Иллюстративные буферы и растворы, используемые в процессе HIC с бутилом, включают, например, загрузочный буфер для разбавления/буфер для предварительного уравнивания (например, 10 мМ HEPES, 2,0 М сульфата аммония, pH 7,50), уравнивающий буфер/промывочный(промывочные) буфер(буферы)/элюирующий буфер(например, все из которых содержат фосфат натрия или HEPES и сульфат аммония) и буфер для отгонки (например, содержащий фосфат натрия).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная стадия очистки включает дополнительную диафильтрацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная стадия хроматографии и/или очистки включает хроматографию гидрофобных взаимодействий и/или по меньшей мере дополнительную стадию диафильтрации. В некоторых вариантах осуществления дополнительную стадию диафильтрации осуществляют после стадии хроматографии гидрофобных взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления дополнительную стадию диафильтрации осуществляют для концентрирования продукта и/или замены буфера. Иллюстративные буферы и растворы, используемые в данном процессе, включают, например, уравнивающий буфер (например, 20 мМ фосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 6,75), буфер для диафильтрации (20 мМ фосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 6,75) и т. д.

В некоторых вариантах осуществления осуществляют по меньшей мере одну дополнительную стадию хроматографии и/или очистки с получением рекомбинантной щелочной фосфатазы с TSAC, состоящим от приблизительно 0,5 моль/моль до приблизительно 4,0 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления осуществляют по меньшей мере одну дополнительную стадию хроматографии и/или очистки с получением рекомбинантной щелочной фосфатазы с TSAC, состоящим от приблизительно 0,9 моль/моль до приблизительно 3,9 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления осуществляют по меньшей мере одну дополнительную стадию хроматографии и/или очистки с получением рекомбинантной щелочной фосфатазы с TSAC, состоящим от приблизительно 1,1 моль/моль до приблизительно 3,2 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления осуществляют по меньшей мере одну дополнительную стадию хроматографии и/или очистки с получением рекомбинантной щелочной фосфатазы с TSAC, состоящим от приблизительно 1,4 моль/моль до приблизительно 2,6 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления осуществляют по меньшей мере одну дополнительную стадию хроматографии и/или очистки с получением рекомбинантной щелочной фосфатазы с TSAC, состоящим от приблизительно 1,2 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления осуществляют по меньшей мере одну дополнительную стадию хроматографии с получением рекомбинантной щелочной фосфатазы с TSAC, составляющим приблизительно 0,8 моль/моль, приблизительно 0,9 моль/моль, 1,0 моль/моль, приблизительно 1,1 моль/моль, приблизительно 1,2 моль/моль, приблизительно 1,3 моль/моль, приблизительно 1,4 моль/моль, приблизительно 1,5 моль/моль, приблизительно 1,6 моль/моль, приблизительно 1,7 моль/моль, приблизительно 1,8 моль/моль, приблизительно 1,9 моль/моль, приблизительно 2,0 моль/моль, приблизительно 2,1 моль/моль, приблизительно 2,2 моль/моль, приблизительно 2,3 моль/моль, приблизительно 2,4 моль/моль, приблизительно 2,5 моль/моль, приблизительно 2,6 моль/моль, приблизительно 2,7 моль/моль, приблизительно 2,8 моль/моль, приблизительно 2,9 моль/моль, приблизительно 3,0 моль/моль, приблизительно 3,1 моль/моль, приблизительно 3,2 моль/моль, приблизительно 3,3 моль/моль, приблизительно 3,4 моль/моль, приблизительно 3,5 моль/моль,

приблизительно 3,6 моль/моль, приблизительно 3,7 моль/моль, приблизительно 3,8 моль/моль, приблизительно 3,9 моль/моль или приблизительно 4,0 моль/моль.

#### **Дополнительные последующие процессы**

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к по меньшей мере одной стадии очистки, дополнительной стадии очистки, по меньшей мере одной стадии хроматографии и/или дополнительной стадии хроматографии осуществляют дополнительные последующие процессы. В некоторых вариантах осуществления с помощью дополнительных последующих процессов дополнительно очищают продукт, например, рекомбинантную щелочную фосфатазу.

В некоторых вариантах осуществления дополнительные последующие процессы включают процесс фильтрации для снижения вирусной нагрузки для дополнительного удаления любых вирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления процесс фильтрации для снижения вирусной нагрузки представляет собой нанофильтрацию.

В некоторых вариантах осуществления дополнительные последующие процессы включают по меньшей мере одну дополнительную стадию хроматографии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная стадия хроматографии представляет собой хроматографию на белке. В некоторых вариантах осуществления хроматография на белке представляет собой гель-фильтрационную хроматографию, ионообменную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию (RP), аффинную хроматографию, адсорбцию в кипящем слое (EVA), хроматографию со смешанным режимом и/или хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC). В некоторых вариантах осуществления третьей стадией хроматографии является хроматография со смешанным режимом, такая как хроматография на агарозе CAPTO<sup>®</sup> Adhere. Коммерчески доступные материалы для смешанного режима включают, например, смолы, содержащие гидрокарбиламиновые лиганды (например, PPA Hypercel и HEA Hypercel от Pall Corporation, Порт-Вашингтон, Нью-Йорк), которые обеспечивают связывание при нейтральном или слегка основном pH благодаря комбинации гидрофобных и электростатических сил и элюирование благодаря отталкиванию электростатических зарядов при низком pH (см. Brenac et al., 2008 J Chromatogr A. 1177:226-233); смолы, содержащие 4-меркаптоэтилпиридиновый лиганд (MEP Hypercel, Pall Corporation), который обеспечивает гидрофобное взаимодействие посредством ароматического остатка, а атом серы облегчает связывание белка-мишени посредством тиофильного взаимодействия (Lees et al., 2009 Bioprocess Int. 7:42-48); смолы, такие как CAPTO<sup>®</sup> MMC для хроматографии со смешанным режимом и CAPTO<sup>®</sup> Adhere для хроматографии на агарозе (GE Healthcare, Амершем, Великобритания), содержащие лиганды с группами, образующими водородные связи, и ароматическими остатками в непосредственной близости от ионных групп, что приводит к солеустойчивой адсорбции белков при различных значениях электропроводности (Chen et al., 2010 J Chromatogr A. 1217:216-224); и другие известные хроматографические материалы, такие как аффинные смолы с лигандами-красителями, гидроксипатит и некоторые ионообменные смолы (включая без

ограничения Amberlite CG 50 (Rohm & Haas, Филадельфия, Пенсильвания) или Lewatit CNP 105 (Lanxess, Кельн, Германия)). Для иллюстративной стадии ИС-хроматографии на агарозе иллюстративные буферы и растворы, используемые в данном процессе, включают, например, буфер для предварительного уравнивания (например, 0,5 М фосфата натрия, pH 6,00), уравнивающий/промывочный буфер (например, 20 мМ фосфата натрия, 440 мМ NaCl, pH 6,50), загрузочный буфер для титрования (например, 20 мМ фосфата натрия, 3,2 М NaCl, pH 5,75), буфер для разбавления пула (например, 25 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,40) и буфер для отгонки (0,1 М цитрата натрия, pH 3,20).

В некоторых вариантах осуществления дополнительные последующие процессы включают стадию фильтрации вирусов для очистки от вирусов. В некоторых вариантах осуществления стадию фильтрации вирусов осуществляют посредством эксклюзионной хроматографии. Иллюстративные буферы и растворы, используемые в данном процессе, включают, например, буфер для струйной промывки перед применением и после получения продукта (например, 20 мМ фосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 6,75).

В некоторых вариантах осуществления дополнительные последующие процессы включают процесс составления. В некоторых вариантах осуществления процесс составления включает по меньшей мере одну дополнительную ультрафильтрацию и/или диафильтрацию для дополнительного концентрирования и/или замены буфера. Иллюстративные буферы и растворы, используемые в данном процессе, включают, например, буфер для струйной промывки фильтра/уравнивания/диафильтрации/извлечения (например, 25 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,40).

В некоторых вариантах осуществления дополнительные последующие процессы включают процесс наполнения нерасфасованным продуктом. В некоторых вариантах осуществления процесс наполнения нерасфасованным продуктом включает стерилизующую фильтрацию. Иллюстративными фильтрами для стерилизующей фильтрации являются фильтры Millipak 60 или PVDF эквивалентного размера (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс).

В некоторых вариантах осуществления стадии, используемые для получения, очистки и/или отделения щелочной фосфатазы из клеток культуры, как раскрыто в данном документе, дополнительно включают по меньшей мере одну из стадий, выбранных из группы, состоящей из: процесса осветления собранного материала (или аналогичного процесса для удаления интактных клеток и клеточного дебриса из культуры клеток), процесса ультрафильтрации (UF) (или аналогичного процесса для концентрирования полученной щелочной фосфатазы), процесса диафильтрации (DF) (или аналогичного процесса для изменения или разбавления буфера, содержащего полученную щелочную фосфатазу после предыдущих процессов), процесса инактивации вирусов (или аналогичного процесса для инактивации или удаления вирусных частиц), процесса аффинного захвата (или любого из способов хроматографии для захвата полученной

щелочной фосфатазы и отделения ее от остальных компонентов буфера/раствора), процесса составления и процесса наполнения нерасфасованным продуктом. В одном варианте осуществления стадии получения, очистки и/или отделения щелочной фосфатазы из клеток культуры, как раскрыто в данном документе, включают по меньшей мере процесс осветления собранного материала (или аналогичный процесс удаления интактных клеток и клеточного дебриса из культуры клеток), процесс ультрафильтрации после сбора (UF) (или аналогичный процесс для концентрирования полученной щелочной фосфатазы), процесс диафильтрации после сбора (DF) (или аналогичный процесс для изменения или разбавления буфера, содержащего полученную щелочную фосфатазу после предыдущих процессов), процесс инактивации вирусов растворителем/детергентом (или аналогичный процесс для химической инактивации вирусных частиц), процесс промежуточной очистки (такой как хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC) или любой из способов хроматографии для захвата полученной щелочной фосфатазы и отделения ее от остальных компонентов буфера/раствора), процесс UF/DF после HIC (или аналогичный процесс для концентрирования и/или замены буфера для полученной щелочной фосфатазы), процесс фильтрации для снижения вирусной нагрузки (или аналогичный процесс для дополнительного удаления любых вирусных частиц или других примесей или загрязнителей); хроматография со смешанным режимом (такая как хроматография на агарозе CAPTO<sup>®</sup> Adhere или аналогичный процесс для дополнительной очистки и/или концентрирования полученной щелочной фосфатазы), процесс составления и процесс наполнения нерасфасованным продуктом. В одном варианте осуществления стадия отделения в способе, представленном в данном документе, дополнительно включает по меньшей мере одно из осветления собранного материала, ультрафильтрации, диафильтрации, инактивации вирусов, аффинного захвата, HIC-хроматографии, хроматографии со смешанным режимом и их комбинаций. На фиг. 1 представлено иллюстративное изображение варианта осуществления процесса получения рекомбинантной щелочной фосфатазы альфа.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ контроля общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в рекомбинантном белке, содержащем TSAC, посредством культивирования клеток млекопитающих, включающий по меньшей мере одну стадию очистки и по меньшей мере одну стадию хроматографии. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ контроля активности гликозидазы в культуре клеток млекопитающих, продуцирующих рекомбинантный белок, включающий по меньшей мере одну стадию очистки и по меньшей мере одну стадию хроматографии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна стадия очистки включает по меньшей мере одно из фильтрации, центрифугирования, осветления собранного материала, фильтрации, ультрафильтрации, диафильтрации, инактивации вирусов, аффинного захвата и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна стадия хроматографии включает хроматографию на белке. В некоторых вариантах осуществления хроматография на белке представляет собой



гель-фильтрационную хроматографию, ионообменную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию (RP), аффинную хроматографию, адсорбцию в кипящем слое (EVA), хроматографию со смешанным режимом и/или хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC). В некоторых вариантах осуществления стадия очистки и стадия хроматографии представляют собой ультрафильтрацию/диафильтрацию и хроматографию с белком А.

После изготовления и очистки в ходе процесса может быть получено нерасфасованное лекарственное вещество (BDS) с контролируемым диапазоном сиалилирования. Посредством способов можно получать BDS, в котором концентрация TSAC контролируется в диапазоне от приблизительно 1,2 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль (например, от приблизительно 1,6 моль/моль до приблизительно 2,4 моль/моль). Например, BDS может иметь концентрацию TSAC, составляющую приблизительно 1,0 моль/моль, приблизительно 1,1 моль/моль, приблизительно 1,2 моль/моль, приблизительно 1,3 моль/моль, приблизительно 1,4 моль/моль, приблизительно 1,5 моль/моль, приблизительно 1,6 моль /моль, приблизительно 1,7 моль/моль, приблизительно 1,8 моль/моль, приблизительно 1,9 моль/моль, приблизительно 2,0 моль/моль, приблизительно 2,1 моль/моль, приблизительно 2,2 моль/моль, приблизительно 2,3 моль/моль, приблизительно 2,4 моль/моль, приблизительно 2,5 моль/моль, приблизительно 2,6 моль/моль, приблизительно 2,7 моль/моль, приблизительно 2,8 моль/моль, приблизительно 2,9 моль/моль или приблизительно 3,0 моль/моль.

В некоторых вариантах осуществления BDS лиофилизируют и/или помещают во флаконы, например, для распространения.

### **Щелочные фосфатазы (ALP)**

Настоящее изобретение относится к изготовлению белка щелочной фосфатазы (например, асфотазы альфа) в культуре рекомбинантных клеток. Белок щелочная фосфатаза включает в себя любые полипептиды или молекулы, содержащие полипептиды, которые обладают по меньшей мере некоторой активностью щелочной фосфатазы. В различных вариантах осуществления щелочная фосфатаза, раскрытая в данном документе, включает в себя любой полипептид, характеризующийся функциями щелочной фосфатазы, который может заключать в себе любые функции щелочной фосфатазы, известные из уровня техники, такие как ферментативная активность в отношении природных субстратов, в том числе фосфоэтаноламина (PEA), неорганического пирофосфата (PPi) и пиридоксаль-5'-фосфата (PLP).

В определенных вариантах осуществления такой белок щелочную фосфатазу после получения, а затем очистки посредством способов, раскрытых в данном документе, можно применять для лечения или предупреждения заболеваний или нарушений, связанных со щелочной фосфатазой. Например, такой белок щелочную фосфатазу можно вводить субъекту, у которого имеется уменьшенный уровень и/или нарушение функционирования эндогенной щелочной фосфатазы или имеется сверхэкспрессия (например, выше нормального уровня) субстратов щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах

осуществления белок щелочная фосфатаза в настоящем изобретении представляет собой рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления белок щелочная фосфатаза представляет собой слитый белок. В некоторых вариантах осуществления белок щелочная фосфатаза в настоящем изобретении специфично нацеливается на тип клеток, ткань (например, соединительную, мышечную, нервную или эпителиальную ткани) или орган (например, печень, сердце, почку, мышцы, кости, хрящи, связки, сухожилия и т. д.). Например, такой белок щелочная фосфатаза может содержать полноразмерную щелочную фосфатазу (ALP) или фрагмент по меньшей мере одной щелочной фосфатазы (ALP). В некоторых вариантах осуществления белок щелочная фосфатаза содержит растворимую ALP (sALP), связанную с компонентом, нацеливающимся на кость (например, отрицательно заряженным пептидом, как описано ниже). В некоторых вариантах осуществления белок щелочная фосфатаза содержит растворимую ALP (sALP), связанную с иммуноглобулиновым компонентом (полноразмерным или фрагментом). Например, такой иммуноглобулиновый компонент может содержать область, являющуюся кристаллизующимся фрагментом (Fc). В некоторых вариантах осуществления белок щелочная фосфатаза содержит растворимую ALP (sALP), связанную как с компонентом, нацеливающимся на кость, так и с иммуноглобулиновым компонентом (полноразмерным или фрагментом). Более подробное описание белка щелочной фосфатазы, раскрытого в данном документе, см. в публикациях согласно РСТ №№ WO 2005/103263 и WO 2008/138131, идеи обеих из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления белок щелочная фосфатаза, описанный в данном документе, содержит любую из структур, выбранных из группы, состоящей из: sALP-X, X-sALP, sALP-Y, Y-sALP, sALP-X-Y, sALP-Y-X, X-sALP-Y, X-Y-sALP, Y-sALP-X и Y-X-sALP, где X содержит компонент, нацеливающийся на кость, описанный в данном документе, и Y содержит иммуноглобулиновый компонент, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления белок щелочная фосфатаза содержит структуру W-sALP-X-Fc-Y-Dn/En-Z, где W отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; X отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; Y отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; Z отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; Fc представляет собой область, являющуюся кристаллизующимся фрагментом; Dn/En представляет собой полиаспартат, полиглутамат или их комбинацию, где n=8-20; и sALP представляет собой растворимую щелочную фосфатазу (ALP). В некоторых вариантах осуществления Dn/En представляет собой полиаспартатную последовательность. Например, Dn может представлять собой полиаспартатную последовательность, где n представляет собой любое число от 8 до 20 (с включением обоих значений) (например, n может равняться 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20) (SEQ

ID NO: 3). В одном варианте осуществления D<sub>n</sub> представляет собой D10 (SEQ ID NO: 2) или D16 (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления D<sub>n</sub>/E<sub>n</sub> представляет собой полиглутаматную последовательность. Например, E<sub>n</sub> может представлять собой полиглутаматную последовательность, где n представляет собой любое число от 8 до 20 (с включением обоих значений) (например, n может равняться 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) (SEQ ID NO: 5). В одном варианте осуществления E<sub>n</sub> представляет собой E10 (SEQ ID NO: 6) или E16 (SEQ ID NO: 7).

Например, такие sALP могут быть слиты с полноразмерной молекулой иммуноглобулина или ее фрагментом (например, областью, являющейся кристаллизующимся фрагментом (Fc)). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид содержит структуру W-sALP-X-Fc-Y-D<sub>n</sub>-Z, где W отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; X отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; Y отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; Z отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; Fc представляет собой область, являющуюся кристаллизующимся фрагментом; D<sub>n</sub> представляет собой полиаспарат, полиглутамат или их комбинацию, где n=10 или 16; и указанная sALP представляет собой растворимую щелочную фосфатазу. В одном варианте осуществления n=10. В другом варианте осуществления W и Z отсутствуют в указанном полипептиде. В некоторых вариантах осуществления указанный Fc содержит домен CH<sub>2</sub>, домен CH<sub>3</sub> и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления указанный Fc представляет собой константный домен иммуноглобулина, выбранного из группы, состоящей из IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 и IgG-4. В одном варианте осуществления указанный Fc представляет собой константный домен иммуноглобулина IgG-1. В одном конкретном варианте осуществления указанный Fc содержит последовательность, представленную в D488-K714 из SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления щелочная фосфатаза, раскрытая в данном документе, содержит структуру W-sALP-X-Fc-Y-D<sub>n</sub>-Z, где W отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; X отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; Y отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; Z отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты; Fc представляет собой область, являющуюся кристаллизующимся фрагментом; D<sub>n</sub> представляет собой полиаспарат, полиглутамат или их комбинацию, где n=10 или 16; и указанная sALP представляет собой растворимую щелочную фосфатазу. Такая sALP способна катализировать расщепление по меньшей мере одного из фосфоэтанолamina (PEA), неорганического пирофосфата (PPi) и пиридоксаль-5'-фосфата

(PLP). В различных вариантах осуществления sALP, раскрытая в данном документе, способна катализировать расщепление неорганического пирофосфата (PPi). Такая sALP может содержать все аминокислоты активной заякоренной формы щелочной фосфатазы (ALP) без C-концевого гликолипидного якоря (GPI). Такая ALP может являться по меньшей мере одной из нетканеспецифической щелочной фосфатазы (TNALP), плацентарной щелочной фосфатазы (PALP), щелочной фосфатазы зародышевых клеток (GCALP) и кишечной щелочной фосфатазы (IAP) или их химерных или слитых форм или вариантов, раскрытых в данном документе. В одном конкретном варианте осуществления ALP включает в себя нетканеспецифическую щелочную фосфатазу (TNALP). В другом варианте осуществления sALP, раскрытая в данном документе, кодируется полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий последовательность, представленную в L1-S485 из SEQ ID NO: 1. В еще одном варианте осуществления sALP, раскрытая в данном документе, содержит последовательность, представленную в L1-S485 из SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления белок щелочная фосфатаза содержит структуру TNALP-Fc-D10 (SEQ ID NO: 1). Остатки аспарагина (N) (например, N 123, 213, 254, 286, 413 и 564) соответствуют потенциальным сайтам гликозилирования. Аминокислотные остатки (L486-K487 и D715-I716) соответствуют линкерам между доменами sALP и Fc, а также Fc и D10 (SEQ ID NO: 2) соответственно.

В данном варианте осуществления полипептид состоит из пяти частей. Первая часть (sALP), содержащая аминокислоты L1-S485, является растворимой частью фермента человеческой нетканеспецифической щелочной фосфатазы, которая обладает каталитической функцией. Вторая часть содержит аминокислоты L486-K487 в качестве линкера. Третья часть (Fc), содержащая аминокислоты D488-K714, представляет собой Fc-часть иммуноглобулина гамма-1 (IgG1) человека, содержащую шарнирную область, домены CH2 и CH3. Четвертая часть содержит D715-I716 в качестве линкера. Пятая часть содержит аминокислоты D717-D726 (D10 (SEQ ID NO: 2)), которая представляет собой компонент, нацеливающийся на кость, который дает возможность асфотазе альфа связываться с минеральной фазой кости. Кроме того, каждая полипептидная цепь содержит шесть потенциальных сайтов гликозилирования и одиннадцать остатков цистеина (Cys). Cys102 существует в виде свободного цистеина. Каждая полипептидная цепь содержит четыре внутрицепочечные дисульфидные связи между Cys122 и Cys184, Cys472 и Cys480, Cys528 и Cys588, а также Cys634 и Cys692. Две полипептидные цепи соединены двумя межцепочечными дисульфидными связями между Cys493 в обеих цепях и между Cys496 в обеих цепях. В дополнение к этим ковалентным структурным признакам щелочные фосфатазы млекопитающих, как полагают, имеют четыре сайта связывания металлов в каждой полипептидной цепи, в том числе два сайта для цинка, один сайт для магния и один сайт для кальция.

Существует четыре известных изофермента ALP, а именно нетканеспецифическая щелочная фосфатаза (TNALP), дополнительно описанная ниже, плацентарная щелочная фосфатаза (PALP) (описанная, например, в GenBank под номерами доступа NP\_112603 и

NP\_001623), щелочная фосфатаза зародышевых клеток (GCALP) (описанная, например, в GenBank под номером доступа P10696) и кишечная щелочная фосфатаза (IAP) (описанная, например, в GenBank под номером доступа NP\_001622). Эти ферменты имеют весьма сходные трехмерные структуры. Каждый из их каталитических центров содержит четыре домена связывания металлов для ионов металлов, которые необходимы для ферментативной активности, в том числе два для Zn и один для Mg. Эти ферменты катализируют гидролиз сложных моноэфиров фосфорной кислоты, а также катализируют реакцию трансфосфорилирования в присутствии высоких концентраций акцепторов фосфата. Три известных природных субстрата для ALP (например, TNALP) включают фосфозтаноламин (PEA), неорганический пирофосфат (PPi) и пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) (Whyte et al., *J Clin Invest* 95:1440-1445, 1995). Выравнивание между этими изоферментами показано на фигуре 30 в WO 2008/138131, идеи которой включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Белок щелочная фосфатаза согласно настоящему изобретению может содержать димер или мультимеры любого белка ALP в отдельности или в комбинации. Также могут быть получены химерные белки или слитые белки на основе ALP, такие как химерный белок на основе ALP, описанный в Kiffer-Moreira et al. *PLoS One* 9:e89374, 2014, полное раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В одном конкретном варианте осуществления щелочная фосфатаза, раскрытая в данном документе, кодируется полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления щелочная фосфатаза, раскрытая в данном документе, кодируется полинуклеотидом, кодирующим полипептид, который содержит последовательность, характеризующуюся 80%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления щелочная фосфатаза, раскрытая в данном документе, кодируется полинуклеотидом, кодирующим полипептид, который содержит последовательность, характеризующуюся 95% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления щелочная фосфатаза, раскрытая в данном документе, содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1.

### **TNALP**

Как указано выше, TNALP представляет собой мембраносвязанный с белок, заякоренный посредством гликолипида на своем С-конце (в отношении TNALP человека см. UniProtKB/Swiss-Prot, номер доступа P05186). Этот гликолипидный якорь (GPI) добавляется посттрансляционно после удаления гидрофобного С-конца, который служит как временным мембранным якорем, так и сигналом для добавления GPI. Следовательно, в одном варианте осуществления растворимая TNALP человека включает в себя TNALP, в которой первая аминокислота гидрофобной С-концевой последовательности, а именно аланин, заменена стоп-кодоном. Растворимая TNALP (называемая в данном документе

sTNALP), образованная таким образом, содержит все аминокислоты нативной заякоренной формы TNALP, которые необходимы для образования каталитического центра, но не содержит мембранного якоря GPI. Известные TNALP включают, например, TNALP человека [номера доступа в GenBank NP-000469, AAI10910, AAN90861, AAN66116, AAN21289 и AAI26166]; TNALP макака-резуса [номер доступа в GenBank XP-001109717]; TNALP крысы [номер доступа в GenBank NP\_037191]; TNALP собаки [номер доступа в GenBank AAF64516]; TNALP свиньи [номер доступа в GenBank AAN64273], TNALP мыши [номер доступа в GenBank NP\_031457], TNALP крупного рогатого скота [номера доступа в GenBank NP\_789828, NP\_776412, AAM 8209 и AAC33858] и TNALP кошки [номер доступа в GenBank NP\_001036028].

Как используется в данном документе, подразумевается, что термин "внеклеточный домен" относится к любой функциональной внеклеточной части нативного белка (например, без сигнального пептида). Рекомбинантный полипептид sTNALP, в котором сохраняются исходные аминокислоты 1-501 (18-501 при секреции), аминокислоты 1-502 (18-502 при секреции), аминокислоты 1-504 (18-504 при секреции) или аминокислоты 1-505 (18-505 при секреции), является ферментативно активным (см. Oda et al., 1999 J. Biochem 126:694-699). Это указывает на то, что аминокислотные остатки могут быть удалены с C-конца нативного белка без влияния на его ферментативную активность. Кроме того, растворимый TNALP человека может содержать одну или несколько аминокислотных замен, при этом такая(такие) замена(замены) не приводят к снижению или по меньшей мере не приводят к полному ингибированию ферментативной активности sTNALP. Например, определенные мутации, которые, как известно, вызывают гипофосфатазию (HPP), перечислены в публикации согласно РСТ № WO 2008/138131, и их следует избегать для поддержания функционального состояния sTNALP.

#### **Отрицательно заряженный пептид**

Белок щелочная фосфатаза согласно настоящему изобретению может содержать нацеливающий компонент, который может специфично нацеливать белок щелочную фосфатазу на заранее определенные тип клеток, ткань или орган. В некоторых вариантах осуществления такие заранее определенные тип клеток, ткань или орган представляют собой костную ткань. Такой компонент, нацеливающийся на кость, может включать в себя любые известные полипептиды, полинуклеотиды или низкомолекулярные соединения, известные из уровня техники. Например, в качестве компонента, нацеливающегося на кость, можно использовать отрицательно заряженные пептиды. В некоторых вариантах осуществления такие отрицательно заряженные пептиды могут представлять собой полиаспартат, полиглутамат или их комбинацию (например, полипептид, содержащий по меньшей мере один аспартат и по меньшей мере один глутамат, такой как отрицательно заряженный пептид, содержащий комбинацию остатков аспартата и глутамата). В некоторых вариантах осуществления такие отрицательно заряженные пептиды могут представлять собой D6 (SEQ ID NO: 8), D7 (SEQ ID NO: 9), D8 (SEQ ID NO: 10), D9 (SEQ ID NO: 11), D10 (SEQ ID NO: 2), D11 (SEQ ID NO: 12), D12 (SEQ ID NO: 13), D13 (SEQ ID

NO: 14), D14 (SEQ ID NO: 15), D15 (SEQ ID NO: 16), D16 (SEQ ID NO: 4), D17 (SEQ ID NO: 17), D18 (SEQ ID NO: 18), D19 (SEQ ID NO: 19), D20 (SEQ ID NO: 20) или полиаспартат, содержащий более 20 остатков аспартата. В некоторых вариантах осуществления такие отрицательно заряженные пептиды могут представлять собой E6 (SEQ ID NO: 21), E7 (SEQ ID NO: 22), E8 (SEQ ID NO: 23), E9 (SEQ ID NO: 24), E10 (SEQ ID NO: 6), E11 (SEQ ID NO: 25), E12 (SEQ ID NO: 26), E13 (SEQ ID NO: 27), E14 (SEQ ID NO: 28), E15 (SEQ ID NO: 29), E16 (SEQ ID NO: 7), E17 (SEQ ID NO: 30), E18 (SEQ ID NO: 31), E19 (SEQ ID NO: 32), E20 (SEQ ID NO: 33) или полиглутамат, содержащий более 20 остатков глутамата. В одном варианте осуществления такие отрицательно заряженные пептиды могут включать в себя по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептида от D10 (SEQ ID NO: 2) до D16 (SEQ ID NO: 4) или от E10 (SEQ ID NO: 6) до E16 (SEQ ID NO: 7).

### **Спейсер**

В некоторых вариантах осуществления белок щелочная фосфатаза согласно настоящему изобретению содержит спейсерную последовательность между частью, представляющей собой ALP, и частью, представляющей собой нацеливающий компонент. В одном варианте осуществления такой белок щелочная фосфатаза содержит спейсерную последовательность между частью, представляющей собой ALP (например, TNALP), и нацеливающим компонентом, представляющим собой отрицательно заряженный пептид. Такой спейсер может представлять собой любой полипептид, полинуклеотид или низкомолекулярное соединение. В некоторых вариантах осуществления такой спейсер может содержать области, являющиеся кристаллизующимися фрагментами (Fc). Применимые Fc-фрагменты включают Fc-фрагменты IgG, которые содержат шарнирную область и домены CH2 и CH3. Такой IgG может представлять собой любой из IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 и IgG-4 или любую их комбинацию.

Без ограничения данной теорией считается, что Fc-фрагмент, используемый в слитых белках на основе sALP, нацеленных на кость (например, в асфотазе альфа), выступает в качестве спейсера, который дает возможность белку более эффективно сворачиваться, с учетом того, что экспрессия sTNALP-Fc-D10 была выше, чем у sTNALP-D10. Одно из возможных объяснений заключается в том, что введение Fc-фрагмента приводит к ослаблению сил отталкивания, вызванных присутствием последовательности D10 с высоким отрицательным зарядом (SEQ ID NO: 2), добавленной на С-конце последовательности sALP, представленной в данном документе в качестве примера. В некоторых вариантах осуществления белок щелочная фосфатаза, описанный в данном документе, содержит структуру, выбранную из группы, состоящей из: sALP-Fc-D10, sALP-D10-Fc, D10-sALP-Fc, D10-Fc-sALP, Fc-sALP-D10 и Fc-D10-sALP. В других вариантах осуществления D10 (SEQ ID NO: 2) в вышеуказанных структурах заменен другими отрицательно заряженными полипептидами (например, D8 (SEQ ID NO: 10), D16 (SEQ ID NO: 4), E10 (SEQ ID NO: 6), E8 (SEQ ID NO: 23), E16 (SEQ ID NO: 7) и т. д.).

Спейсеры, применимые в настоящем изобретении, включают, например, полипептиды, содержащие Fc, а также гидрофильные и гибкие полипептиды, способные

ослаблять силы отталкивания, вызванные присутствием последовательности, нацеливающейся на кость, с высоким отрицательным зарядом (например, D10 (SEQ ID NO: 2)), добавленной на С-конце последовательности sALP.

### **Димеры/тетрамеры**

В конкретных вариантах осуществления слитые белки на основе sALP, нацеленные на кость, согласно настоящему изобретению ассоциированы таким образом, что они образуют димеры или тетрамеры.

В димерной конфигурации стерические затруднения, налагаемые образованием межцепочечных дисульфидных связей, по-видимому, препятствуют ассоциации доменов sALP в отношении их ассоциации с образованием димерного белка с минимальной каталитической активностью, который присутствует в нормальных клетках.

sALP, нацеленная на кость, может дополнительно необязательно содержать одну или несколько дополнительных аминокислот 1) ниже отрицательно заряженного пептида (например, метки кости); и/или 2) между отрицательно заряженным пептидом (например, меткой кости) и Fc-фрагментом; и/или 3) между спейсером (например, Fc-фрагментом) и sALP-фрагментом. Это может иметь место, например, если в стратегии клонирования, применяемой для получения конъюгата, нацеливающегося на кость, в эти местоположения вводятся экзогенные аминокислоты. Однако экзогенные аминокислоты должны быть выбраны так, чтобы они не образовывали дополнительный сигнал присоединения GPI-якоря. Вероятность расщепления сконструированной последовательности трансамидазой клетки-хозяина может быть предсказана, как описано в Ikezawa, 2002 *Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. Biol Pharm Bull.* 25:409-17.

Настоящее изобретение также охватывает слитый белок, который подвергнут посттрансляционной модификации, как, например, путем гликозилирования, включая те, которые явным образом упомянуты в данном документе, ацетилирования, амидирования, блокады, формилирования, гидроксиглирования гамма-карбоксихлутаминовой кислоты, метилирования, фосфорилирования, образования пирролидонкарбоновой кислоты и сульфатирования.

### **Асфотаза альфа**

Асфотаза альфа представляет собой растворимый Fc-слитый белок, состоящий из двух полипептидов TNALP-Fc-D10, каждый из которых содержит 726 аминокислот, как показано в SEQ ID NO: 1. Каждый полипептид или мономер состоит из пяти частей. Первая часть (sALP), содержащая аминокислоты L1-S485, является растворимой частью фермента человеческой нетканеспецифической щелочной фосфатазы, которая обладает каталитической функцией. Вторая часть содержит аминокислоты L486-K487 в качестве линкера. Третья часть (Fc), содержащая аминокислоты D488-K714, представляет собой Fc-часть иммуноглобулина гамма-1 (IgG1) человека, содержащую шарнирную область, домены CH2 и CH3. Четвертая часть содержит D715-I716 в качестве линкера. Пятая часть содержит аминокислоты D717-D726 (D10 (SEQ ID NO: 2)), которая представляет собой компонент, нацеливающийся на кость, который дает возможность асфотазе альфа



связываться с минеральной фазой кости. Кроме того, каждая полипептидная цепь содержит шесть потенциальных сайтов гликозилирования и одиннадцать остатков цистеина (Cys). Cys102 существует в виде свободного цистеина. Каждая полипептидная цепь содержит четыре внутрицепочечные дисульфидные связи между Cys122 и Cys184, Cys472 и Cys480, Cys528 и Cys588, а также Cys634 и Cys692. Две полипептидные цепи соединены двумя межцепочечными дисульфидными связями между Cys493 в обеих цепях и между Cys496 в обеих цепях. В дополнение к этим ковалентным структурным признакам щелочные фосфатазы млекопитающих, как полагают, имеют четыре сайта связывания металлов в каждой полипептидной цепи, в том числе два сайта для цинка, один сайт для магния и один сайт для кальция.

Асфотазу альфа также можно охарактеризовать следующим образом. От N-конца к C-концу асфотаза альфа содержит: (1) растворимый каталитический домен нетканеспецифической щелочной фосфатазы человека (TNSALP) (№ доступа в UniProtKB/Swiss-Prot P05186), (2) Fc-домен иммуноглобулина G1 человека (№ доступа в UniProtKB/Swiss-Prot P01857) и (3) пептид декааспартат (D10 (SEQ ID NO: 2)), используемый в качестве домена, нацеливающегося на кость (Nishioka et al. 2006 *Mol Genet Metab* 88:244-255). Белок ассоциирует с образованием гомодимера из двух первичных последовательностей белка. Этот слитый белок содержит 6 подтвержденных сайтов сложного N-гликозилирования. Пять из этих сайтов N-гликозилирования расположены в домене sALP, и один в Fc-домене. Другой важной посттрансляционной модификацией, присутствующей в асфотазе альфа, является наличие дисульфидных мостиков, стабилизирующих структуру фермента и Fc-домена. В общей сложности в каждом мономере присутствует 4 внутримолекулярных дисульфидных мостика, а в димере присутствуют 2 межмолекулярных дисульфидных мостика. Один цистеин домена щелочной фосфатазы является свободным.

Асфотаза альфа применялась в качестве средства ферментозаместительной терапии для лечения гипофосфатазии (HPP). У пациентов с HPP мутация(мутации) потери функции в гене, кодирующем TNSALP, вызывает дефицит ферментативной активности TNSALP, что приводит к повышенным уровням циркулирующих субстратов, таких как неорганический пирофосфат (PPi) и пиридоксаль-5'-фосфат (PLP). Введение асфотаза альфа пациентам с HPP приводит к расщеплению PPi с высвобождением неорганического фосфата для связывания с кальцием, что тем самым способствует образованию кристаллов гидроксиапатита и минерализации костей, а также приводит к восстановлению нормального фенотипа скелета. Более подробно об асфотазе альфа и путях ее применения в лечении см. в публикациях согласно PCT №№ WO 2005/103263 и WO 2008/138131.

В некоторых вариантах осуществления в способе получают щелочную фосфатазу (асфотазу альфа), характеризующуюся улучшенной ферментативной активностью получаемой щелочной фосфатазы (например, асфотаза альфа) по сравнению со щелочной фосфатазой, получаемой посредством традиционных способов, благодаря минимизации концентрации ионов металлов, обладающих потенциально отрицательным влиянием на

активность, или увеличению концентрации ионов металлов, обладающих потенциально положительным влиянием на активность, или и тому, и другому, как описано в данном документе. Активность может быть измерена посредством любого известного способа. Такие способы включают, например, анализы *in vitro* и *in vivo*, в которых измеряют ферментативную активность получаемой щелочной фосфатазы (например, асфотазы альфа) по отношению к субстратам щелочной фосфатазы, таким как фосфоэтаноламин (PEA), неорганический пирофосфат (PPi) и пиридоксаль-5'-фосфат (PLP).

В некоторых вариантах осуществления щелочная фосфатаза, раскрытая в данном документе, кодируется первым полинуклеотидом, который гибридизируется в условиях высокой жесткости со вторым полинуклеотидом, по сравнению с последовательностью, полностью комплементарной третьему полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1. Такие условия высокой жесткости могут включать предварительную гибридизацию и гибридизацию в 6 x SSC, 5 x реагенте Денхардта, 0,5% SDS и 100 мг/мл денатурированной фрагментированной ДНК молот лососевых рыб при 68°C и промывки в 2 x SSC и 0,5% SDS при комнатной температуре в течение 10 минут; в 2 x SSC и 0,1% SDS при комнатной температуре в течение 10 минут и в 0,1 x SSC и 0,5% SDS при 65°C три раза по 5 минут.

### **ПРИМЕРЫ**

Пример 1. Процесс изготовления асфотазы альфа

Иллюстративный процесс изготовления нерасфасованного лекарственного вещества (BDS) асфотазы альфа показан на фиг. 1.

Ниже подробно описан процесс изготовления асфотазы альфа, в котором содержание TSAC измеряли в день 7 ферментации культуры клеток в производственном биореакторе и использовали для определения времени поддержания для последующей стадии ультрафильтрации/диафильтрации после сбора (UF/DF1). Эта дополнительная стадия обеспечивала повышенный контроль качества, при котором конечное содержание TSAC поддерживалось в пределах диапазона приемлемых значений, который ранее был одобрен для применения у людей. Процесс изготовления и целевой диапазон TSAC обеспечивают получение готового лекарственного препарата с надлежащей ферментативной активностью, терапевтически эффективным периодом полувыведения и воспроизводимостью между партиями.

Хронология процедур внутрипроизводственного контроля TSAC

Сиаловая кислота представляет собой известную форму гликозилирования, ассоциированную с асфотазой альфа, которая влияет на период полувыведения молекулы в физиологических условиях. Контроль уровней TSAC в пределах диапазона приемлемых значений 1,2-3,0 моль сиаловой кислоты/моль мономера асфотазы альфа (моль/моль) необходим для получения готового лекарственного препарата с надлежащей эффективностью, терапевтически эффективным периодом полувыведения и воспроизводимостью между партиями. TSAC образуется в производственном биореакторе (жидкость культуры клеток, CCF, стадия 2 на фиг. 1), и при этом TSAC в собранной

жидкости культуры клеток (HCCF, стадия 3 на фиг. 1) уменьшается в ходе поддержания пула ультрафильтрации/диализации после сбора (UF/DF1) (стадия 4 на фиг. 1) перед стадией хроматографии с белком А на MabSelect™ SuRe™ (ProA) (стадия 5b на фиг. 1).

Поддержание пула UF/DF1 является важной стадией внутрипроизводственного контроля TSAC в BDS. В предыдущих мелкомасштабных исследованиях для определения характеристик было установлено, что время поддержания UF/DF1 после сбора, концентрация белка и температура существенно влияют на величину, до которой уменьшается TSAC в ходе поддержания пула UF/DF1.

#### Обзор производственных данных о TSAC

TSAC измеряется на двух стадиях в ходе изготовления (пул ProA и высвобождение BDS). Для подмножества партий TSAC также измеряли на стадии производственного биореактора (день 7 и день 10, обозначаемые как CCF), стадии сбора (HCCF) и стадии НИС. Данные о TSAC для партий объемом 20000 л представлены в табличной форме в таблице 1. Обзор производственных данных подтвердил, что TSAC уменьшается от стадии HCCF (стадия 3 на фиг. 1) до стадии ProA (стадия 5b на фиг. 1), как представлено в табличной форме в таблице 1 и показано на фиг. 2.

Результаты для TSAC в BDS согласно наблюдениям приближались к нижнему пределу спецификации, включая три результата (№ 8, № 9 и № 11), которые не соответствовали спецификации (OOS). Изменчивость в предшествующем процессе, в частности в производственном биореакторе, была определена как вероятная причина для OOS TSAC в BDS. Кроме того, процедуры контроля TSAC после производственного биореактора (поддержание UF/DF1) не были оптимально разработаны, чтобы учитывать эту предшествующую изменчивость.

Таблица 1. Данные о TSAC в ходе процесса и в BDS и данные процесса UF/DF1

Контроль TSAC	Партия BDS	TSAC в день 7 <sup>2</sup> (моль/моль)	TSAC в CCF (до сбора) (моль/моль)	TSAC в HCCF (моль/моль)	TSAC на стадии ProA (моль/моль)	TSAC на стадии HIC <sup>4</sup> (моль/моль)	TSAC в BDS (моль/моль)	Средняя температура поддержания UF/DF1 (°C)	Белок UF/DF1, концентрация (г/л)	UF/DF1, время поддержания (ч.)
Стратегия фиксированного контроля TSAC	1	2,4	1,9	1,9	1,2	1,3	1,2	22,0	3,2	31
	2	3,0	2,3	2,4	1,5	1,6	1,4	22,0	3,2	32
	3	2,1	2,4	2,1	1,3	1,6	1,4	22,0	3,1	25
	4	N/A	2,1	2,3	1,4	N/A	1,4	22,0	3,5	20
	5	N/A	2,4	2,7	1,5	N/A	1,6	22,0	3,1	19
	6	N/A	2,3	2,5	1,5	N/A	1,7	22,0	3,0	19
	7	N/A	2,1	2,4	1,1	N/A	1,3	22,0	3,1	19
	8 <sup>1</sup>	N/A	N/A <sup>3</sup>	2,1	1,0	N/A	1,1	22,0	2,9	19
	9 <sup>1</sup>	N/A	1,8	2,2	1,0	N/A	1,0	22,0	3,1	19
	10	N/A	1,8	2,0	1,1	N/A	1,2	22,0	3,0	19
	11 <sup>1</sup>	N/A	1,7	2,0	1,0	N/A	1,1	22,0	3,1	24
	12	N/A	2,1	2,4	1,4	N/A	1,5	22,0	3,2	14
	13	N/A	1,9	2,2	1,0	N/A	1,3	22,0	3,4	14
	14	N/A	1,9	2,3	1,4	N/A	1,5	22,0	3,0	14
	15	2,0	1,8	2,3	1,1	N/A	1,2	22,0	3,1	15

Стратегия контроля TSAC на основе данных в день 7	16 <sup>5</sup>	2,6	2,1	2,5	1,1	1,3	1,4	22,0	2,3	18
	17 <sup>6</sup>	2,1	2,0	2,5	1,8	1,9	1,9	22,0	2,5	6
	18	2,4	2,2	2,5	2,1	2,4	2,3	22,0	2,1	4
	19	2,3	2,1	2,6	2,2	2,4	2,4	22,0	2,5	4
	20	2,4	2,0	2,5	2,0	N/A	1,9	22,0	2,3	4
	21	2,4	2,1	2,4	1,7	N/A	2,0	22,0	2,5	3
	22	2,2	2,0	2,5	2,0	N/A	2,0	22,0	2,4	9

<sup>1</sup> BDS не соответствует спецификации для TSAC

<sup>2</sup> TSAC в день 7 обычно не тестируется в ходе изготовления партий с фиксированным контролем TSAC.

<sup>3</sup> Образец не анализировали в отношении TSAC из-за неправильного обращения с образцом перед мелкомасштабной очисткой и выполнением анализа.

<sup>4</sup> TSAC на стадии НИС обычно не тестируют в ходе изготовления.

<sup>5</sup> Время поддержания UF/DF1 находилось в пределах целевого диапазона, определенного пределами регулирования в день 7 на момент выполнения партии. Исходя из конечной усовершенствованной стратегии контроля TSAC, целевое время поддержания для данной партии будет составлять 10-14 часов согласно таблице 3.

<sup>6</sup> Фиксированное время поддержания UF/DF1 было реализовано для демонстрации эксплуатационной осуществимости. Достигнутое время поддержания находилось в пределах целевого диапазона, определенного пределами регулирования в день 7 согласно таблице 3 (< 9 часов).

### Усовершенствованная стратегия контроля TSAC

Была разработана усовершенствованная стратегия контроля TSAC. Усовершенствованная стратегия включает отслеживание уровней TSAC в производственном биореакторе и модулирование параметров процесса UF/DF1 в соответствии с ними для улучшения технологического контроля и производственных возможностей в отношении TSAC в BDS. В частности, TSAC, измеренное в день 7 в образце из производственного биореактора (называемое "TSAC в день 7"), может обеспечить оценку TSAC до технологической операции UF/DF1. TSAC в день 7 было введено в качестве внутрипроизводственного контроля (IPC) для процесса, и при этом соответствующие пределы регулирования для TSAC в день 7 определяют целевое время поддержания UF/DF1 для каждой партии. TSAC в день 7 используется в качестве косвенного показателя результата для TSAC в конце культивирования клеток или после сбора, поскольку получение образцов (мелкомасштабная очистка с помощью белка A) и продолжительность анализа TSAC в настоящее время исключают фактическое измерение TSAC "у линии" до начала операции и поддержания UF/DF1. С целью оптимизации стратегии поддержания UF/DF1 в соответствии с получением TSAC в биореакторе для конкретной партии корректировали целевое значение и диапазон концентрации белка. Температура поддержания UF/DF1 была неизменной.

Изменения, внесенные в операцию UF/DF1 для дальнейшего усовершенствования контроля TSAC, обобщенно представлены в таблице 2. Пределы регулирования TSAC в день 7 перечислены в таблице 3. Диапазоны параметров и атрибутов, а также пределы регулирования IPC оптимизировали с использованием прогностической модели, созданной на основе мелкомасштабных исследований для определения характеристик UF/DF1 и сбора дополнительных данных о TSAC из партий промышленного масштаба.

Таблица 2. Сводная информация об усовершенствованном контроле TSAC

<b>Параметр/ атрибут</b>	<b>Исходный диапазон</b>	<b>Диапазон для контроля TSAC</b>	<b>Обоснование</b>
TSAC в день 7 (моль/моль)	N/A	См. таблицу 3	TSAC в день 7 отслеживали и использовали для проведения корректировки целевого времени поддержания UF/DF1 с целью улучшения технологического контроля и производственных возможностей в отношении TSAC в BDS.
Время	14-42	0-48	Параметр контролировали до

поддержания UF/DF1 (ч.)			достижения целевого значения, определенного на основании пределов регулирования TSAC в день 7. См. таблицу 3. Более широкий диапазон приемлемых значений давал возможность учитывать более широкий диапазон TSAC, образующийся в производственном биореакторе.
Температура поддержания UF/DF1 (°C)	15-25	15-25	Без изменения
Концентрация белка в UF/DF1 (г/л)	2,0-4,3	1,8-4,3	Более широкий диапазон был оптимизирован к изменениям стратегии времени поддержания и позволял учитывать более широкий диапазон TSAC, образующийся в производственном биореакторе.

Таблица 3. TSAC в день 7 и целевые значения времени поддержания UF/DF1 для усовершенствованного контроля TSAC

TSAC в день 7 (моль/моль)	Действие в соответствии с результатом для TSAC в день 7: целевое время поддержания UF/DF1	
	Целевой диапазон (ч.)	
< 2,5	< 9	
2,5-2,7	10-14	
2,8-3,0	23-27	
> 3,0	38-42	

Обновления стратегии контроля TSAC приводили к улучшению технологического контроля и производственных возможностей в отношении TSAC в BDS при более широком диапазоне TSAC, образующемся в ходе процесса культивирования клеток в производственном биореакторе. Опытные партии использовались для точной настройки времени поддержания UF/DF1, демонстрации эксплуатационной осуществимости изготовления при внутрипроизводственном контроле TSAC в день 7 и демонстрации эффективности модифицированной стратегии контроля.

Четыре исходные опытные партии успешно выполняли до получения BDS (партии 16, 17, 18 и 19; см. таблицу 1 и фиг. 2 и 3). Образцы дня 7 из производственного биореактора очищали с помощью мелкомасштабной хроматографии с белком А, а затем тестировали в отношении TSAC. Для трех из четырех опытных партий результат для TSAC в день 7 использовали для модулирования времени поддержания UF/DF1 на основании предварительно определенных пределов регулирования, подобных тем, которые указаны в таблице 3. Одну партию (17) выполняли с фиксированным целевым временем поддержания, чтобы продемонстрировать эксплуатационную осуществимость кратчайшего времени поддержания ниже ранее определенного диапазона. Три дополнительные партии изготавливали до получения BDS (партии 20-22) с усовершенствованной стратегией контроля TSAC. TSAC и данные процесса UF/DF1 для всех партий с усовершенствованным контролем TSAC обобщенно представлены в таблице 1. Для всех партий температура UF/DF1, концентрация белка и время поддержания находились в пределах диапазонов приемлемых значений, определенных для усовершенствованной стратегии контроля (таблица 2). Фактическое время поддержания UF/DF1 находилось в пределах целевых диапазонов, определенных для пределов регулирования в день 7 (таблица 3), за исключением первой опытной партии 16, которая выполнялась с другими пределами регулирования в день 7.

TSAC из производственного биореактора (CCF) и после сбора (HCCF) (HCCF, показанная на фиг. 2) имеет сходную тенденцию в партиях с усовершенствованным контролем TSAC по сравнению с предыдущими партиями, а TSAC в день 7 приближается к TSAC до технологической операции UF/DF1 (TSAC в HCCF) (таблица 1, фиг. 2). Среднее значение TSAC в BDS для партий 1-15 без контроля TSAC в день 7 ( $n=15$ ) составляло 1,3 моль/моль по сравнению со средним значением TSAC в BDS, составляющим 2,1 моль/моль (диапазон от 1,9 до 2,4 моль/моль), для партий, в которых использовался контроль TSAC в день 7 (партии 17-22,  $n=6$ ). Смещение TSAC в BDS для партий 17-22 ближе к средней точке диапазона спецификации по сравнению с предыдущими партиями согласуется с условиями поддержания UF/DF1, выполняемыми для этих партий с использованием усовершенствованного контроля TSAC (таблица 1 и фиг. 2 и фиг. 3), и иллюстрирует их эффективность. Тогда как TSAC из производственного биореактора (день 7) в этих партиях приводила к более короткому целевому времени поддержания UF/DF1, усовершенствованная стратегия контроля TSAC позволяет динамически реагировать на диапазон показателей TSAC на выходе из производственного биореактора. Если в день 7 измеряется более высокий выходной показатель TSAC, то с помощью усовершенствованной стратегии идентифицируют и определяют соответствующее целевое время поддержания UF/DF1 с целью смещения TSAC в BDS ближе к средней точке диапазона спецификации и во избежание результатов OOS.

В дополнение к демонстрации осуществимости и эффективности усовершенствованной стратегии контроля TSAC, BDS из партий 17-22 соответствуют всем критериям спецификации при выпуске, что подтверждает отсутствие нежелательного



влияния на производительность процесса или другие характеристики качества продукта.

### **Другие варианты осуществления**

Все литературные источники, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Хотя вышеприведенное настоящее изобретение было описано довольно подробно в качестве иллюстрации и примера для целей ясности понимания, специалистам в данной области очевидно, что на практике будут осуществляться определенные незначительные изменения и модификации. Следовательно, описание и примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Вышеприведенное подробное описание и примеры даны только для ясности понимания. На их основе не следует делать неоправданных заключений о каких-либо ограничениях. Настоящее изобретение не ограничено представленными и описанными подробными данными, поскольку в настоящее изобретение, определенное формулой изобретения, включены видоизменения, очевидные специалисту в данной области.

Если не указано иное, то все числа, выражающие количества компонентов, значения молекулярной массы и т. д., используемые в настоящем описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "приблизительно". Соответственно, если не указано иное в противоположном смысле, числовые параметры, изложенные в описании и формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от требуемых свойств, которые необходимо достичь с помощью настоящего изобретения. По крайней мере, и не в качестве попытки ограничить доктрину эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр следует по меньшей мере истолковывать с учетом количества сообщаемых значащих цифр и с применением стандартных методик округления.

Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий объем настоящего изобретения, являются приближенными значениями, числовые значения, указанные в конкретных примерах, сообщаются настолько точно, насколько это возможно. Тем не менее, все числовые значения по определению предусматривают диапазон, неизбежно обусловленный стандартным отклонением, определенным при их соответствующих измерениях в ходе тестирования.

Полные раскрытия всех патентов, патентных заявок, в том числе предварительных патентных заявок, публикаций, в том числе патентных публикаций и непатентных публикаций, а также доступных в электронном виде материалов (в том числе, например, нуклеотидных последовательностей, поданных, например, в GenBank и RefSeq, и аминокислотных последовательностей, поданных, например, в Swiss-Prot, PIR, PRF, PDB, и продуктов трансляции аннотированных кодирующих областей из GenBank и RefSeq), цитируемых в данном документе, включены посредством ссылки. Вышеприведенное подробное описание и примеры даны только для ясности понимания. На их основе не следует делать неоправданных заключений о каких-либо ограничениях. Настоящее изобретение не ограничено представленными и описанными подробными данными,

поскольку в варианты осуществления, определенные формулой изобретения, включены видоизменения, очевидные специалисту в данной области.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения рекомбинантной щелочной фосфатазы, включающий:

(а) инокуляцию в биореактор клетки, экспрессирующей рекомбинантную щелочную фосфатазу;

(b) получение водной среды для культивирования, содержащей рекомбинантную щелочную фосфатазу;

(с) получение аликвоты из водной среды для культивирования в период от приблизительно дня 6 до приблизительно дня 10 после инокуляции;

(d) количественное определение общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в виде молярной концентрации на моль рекомбинантной щелочной фосфатазы в аликвоте;

(е) сбор водной среды для культивирования и

(f) осуществление по меньшей мере одной стадии очистки с получением нерасфасованного раствора лекарственного средства (BDS);

где:

(i)

(1) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,5 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение менее чем приблизительно девяти часов;

(2) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,5 моль/моль до приблизительно 2,7 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно 10 часов до приблизительно 14 часов;

(3) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,8 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно 23 часов до приблизительно 27 часов; или

(4) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,0 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно 38 часов до приблизительно 42 часов; или

(ii)

(1) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,5 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно пяти часов до приблизительно девяти часов;

(2) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,5 моль/моль до приблизительно 2,7 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно 16 часов до приблизительно 20 часов; или

(3) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 2,7 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно 30 часов до приблизительно 34 часов; или

(iii)

(1) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую менее чем приблизительно 2,3 моль/моль или равную этому значению, и стадию фильтрации поддерживают в течение

от приблизительно 14 часов до приблизительно 22 часов;

(2) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую от приблизительно 2,4 моль/моль до приблизительно 3,1 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно 28 часов до приблизительно 36 часов; или

(3) аликвота имеет концентрацию TSAC, составляющую более чем приблизительно 3,2 моль/моль или равную этому значению, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно 40 часов до приблизительно 48 часов.

2. Способ по п. 1, где стадия (с) включает получение аликвоты из водной среды для культивирования в приблизительно день 7 после инокуляции.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где стадия фильтрации включает ультрафильтрацию, диафильтрацию или их комбинацию.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где клетка представляет собой клетку млекопитающего.

5. Способ по п. 4, где клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

6. Способ по любому из пп. 1-5, где концентрация TSAC в аликвоте составляет менее чем приблизительно 2,5 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение менее чем приблизительно девяти часов.

7. Способ по любому из пп. 1-5, где концентрация TSAC в аликвоте составляет от приблизительно 2,5 моль/моль до приблизительно 2,7 моль/моль, и стадию фильтрации поддерживают в течение от приблизительно 10 до приблизительно 14 часов.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где концентрация щелочной фосфатазы в ходе стадии фильтрации составляет от приблизительно 1,8 г/л до приблизительно 5,0 г/л.

9. Способ по п. 8, где концентрация щелочной фосфатазы в ходе стадии фильтрации составляет от приблизительно 1,8 до приблизительно 4,3 г/л.

10. Способ по п. 9, где концентрация щелочной фосфатазы в ходе стадии фильтрации составляет приблизительно 2,3 г/л, приблизительно 3,1 г/л или приблизительно 3,7 г/л.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где концентрация TSAC в BDS составляет от приблизительно 1,2 моль/моль до приблизительно 3,0 моль/моль.

12. Способ по п. 11, где концентрация TSAC в BDS составляет от приблизительно 1,6 моль/моль до приблизительно 2,4 моль/моль.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где стадию фильтрации поддерживают при постоянной температуре.

14. Способ по п. 13, где постоянная температура составляет от приблизительно 15°C до приблизительно 25°C.

15. Способ по п. 14, где постоянная температура составляет от приблизительно 19°C до приблизительно 25°C.

16. Способ по п. 15, где температура составляет приблизительно 22°C.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где аликвоту получают асептически.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где аликвота составляет от приблизительно 1 мл

до приблизительно 500 мл.

19. Способ по п. 18, где аликвота составляет от приблизительно 50 мл до приблизительно 300 мл.

20. Способ по п. 19, где аликвота составляет приблизительно 100 мл или приблизительно 200 мл.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где стадия (с) дополнительно включает центрифугирование аликвоты.

22. Способ по п. 21, где стадия (с) дополнительно включает удаление надосадочной жидкости из аликвоты.

23. Способ по п. 22, где стадия (с) дополнительно включает очистку щелочной фосфатазы из надосадочной жидкости с помощью хроматографической колонки.

24. Способ по п. 23, где хроматографическая колонка включает в себя колонку с белком А, колонку HiTrap с белком А на 1 мл; RoboColumn с белком А на 600 мкл или колонку для твердофазной хроматографии MabSelect Sure с белком А.

25. Способ по п. 24, где колонка с белком А представляет собой колонку MabSelect Sure с белком А.

26. Способ по любому из пп. 23-25, где стадия (с) дополнительно включает осуществление замены буфера.

27. Способ по любому из пп. 23-26, где стадия (с) дополнительно включает концентрирование щелочной фосфатазы.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где стадия (d) включает осуществление кислотного гидролиза с высвобождением TSAC.

29. Способ по любому из пп. 1-28, дополнительно включающий лиофилизацию щелочной фосфатазы.

30. Способ по п. 29, дополнительно включающий помещение щелочной фосфатазы во флакон.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где биореактор имеет объем, составляющий по меньшей мере 2 л.

32. Способ по п. 31, где объем составляет по меньшей мере 10 л.

33. Способ по п. 32, где объем составляет по меньшей мере 1000 л.

34. Способ по п. 33, где объем составляет по меньшей мере 10000 л.

35. Способ по п. 34, где объем составляет приблизительно 20000 л.

36. Способ по любому из пп. 1-34, где среда для культивирования выбрана из группы, состоящей из бессывороточной среды EX-CELL<sup>®</sup> 302; среды CD DG44; среды BD Select<sup>™</sup>; среды SFM4CHO и их комбинаций.

37. Способ по любому из пп. 1-36, где рекомбинантная щелочная фосфатаза содержит структуру W-sALP-X-Fc-Y-Dn-Z, где:

W отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты;

X отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по

меньшей мере одной аминокислоты;

Y отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты;

Z отсутствует или представляет собой аминокислотную последовательность из по меньшей мере одной аминокислоты;

Fc представляет собой область, являющуюся кристаллизующимся фрагментом;

Dn представляет собой полиаспартат, полиглутамат или их комбинацию, где n равняется 10 или 16; и

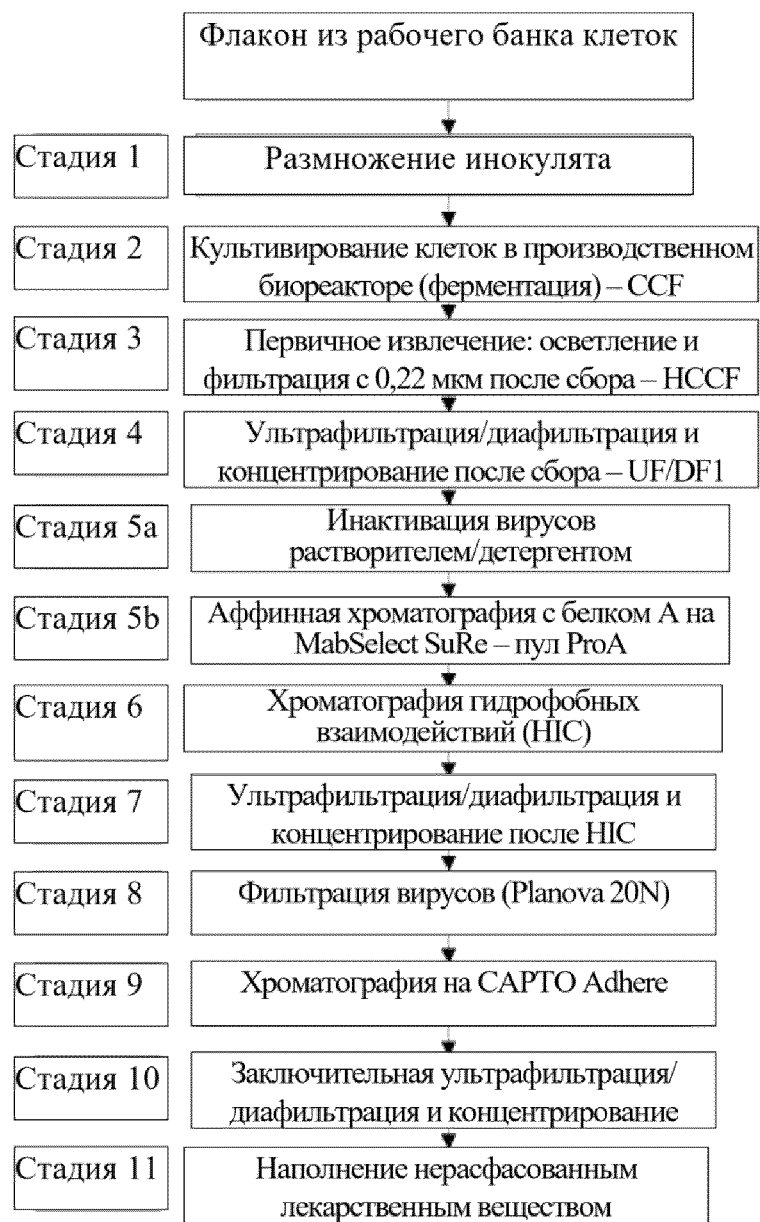
sALP представляет собой растворимую щелочную фосфатазу.

38. Способ по п. 37, где рекомбинантная щелочная фосфатаза содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1.

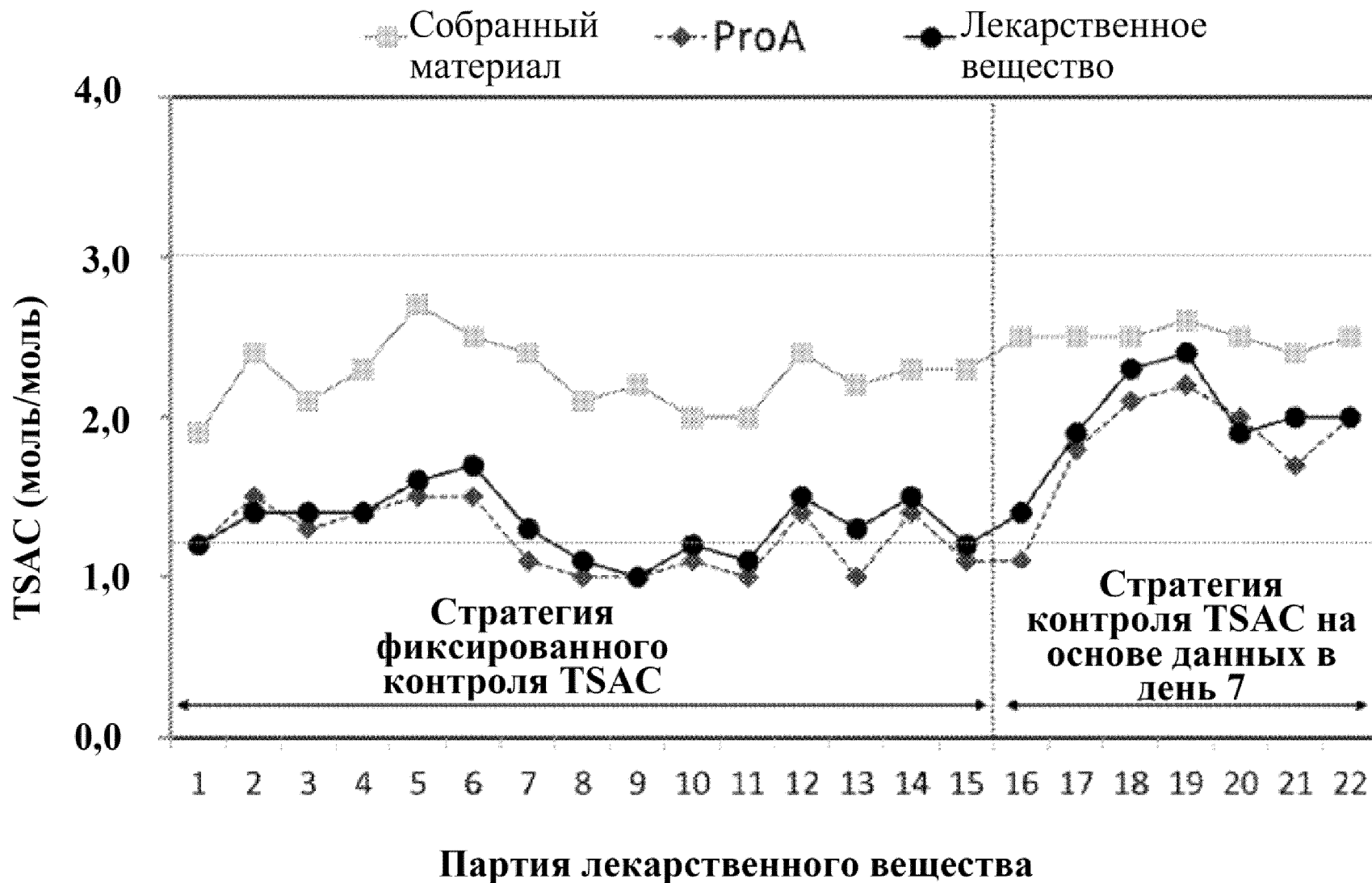
39. Способ по п. 37, где рекомбинантная щелочная фосфатаза содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, или состоит из нее.

По доверенности

ФИГ. 1



ФИГ. 2





ФИГ. 3

