

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392955** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.12.26**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.05.02**

---

(54) **СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА СПЕСОЛИМАБА**

---

(31) **21171881.2**

(32) **2021.05.03**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/061675**

(87) **WO 2022/233770 2022.11.10**

(71) Заявитель:  
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Вухерпфенниг Томас, Липпман Рико  
(DE)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение касается способа продуцирования антитела против IL36R спесолимаба. Более конкретно, настоящее изобретение касается способа продуцирования спесолимаба с бессывороточной средой для культивирования клеток в подпитываемой культуре в присутствии восстановленной меди и возрастающей концентрации железа. Кроме того, настоящее изобретение касается композиции, имеющей низкий уровень основных видов спесолимаба и/или низкий уровень видов спесолимаба с высокоманнозными структурами.

---

**A1**

**202392955**

**202392955**

**A1**

## СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА СПЕСОЛИМАБА

5 ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1] Настоящее изобретение касается способа продуцирования антитела против IL36R спесолимаба. Более конкретно настоящее изобретение касается способа продуцирования спесолимаба с бессывороточной средой для культивирования клеток в подпитываемой культуре в присутствии 10 восстановленной меди и возрастающей концентрации железа. Кроме того, настоящее изобретение касается композиции, имеющей низкий уровень основных видов спесолимаба и/или низкий уровень видов спесолимаба с высокоманнозными структурами.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15 [2] Рекомбинантные моноклональные антитела (mAb) обычно экспрессируются в культуре клеток млекопитающего. Собранное антитело содержит варианты продукта, отличающиеся по свойствам, таким как заряд и размер, и эти отличия также называют гетерогенностью продукта. Главными источниками гетерогенности являются посттрансляционные модификации и 20 вырождение, случающиеся во время культивирования клеток. Антитела, как правило, очищают в несколько этапов фильтрации и хроматографии. Однако полностью устранить гетерогенность путем последующей обработки практически невозможно. Таким образом, модификации и вырождение, случающиеся во время этапов культивирования клеток, имеют наиболее 25 значительное влияние на качество конечного продукта. Гетерогенность вследствие посттрансляционных модификаций может влиять на качество продукта, безопасность и эффективность моноклональных антител. К главным характеристикам качества относятся гликозилирование, варианты заряда (основные и кислотные виды, такие как окисленные, дезамидированные и С- и 30 N-концевые модифицированные виды), агрегаты и низкомолекулярные виды (LMW). Предшествующие процессы имеют сильное влияние на характеристики антитела как продукта, включая посттрансляционные модификации и другие модификации, и они могут быть различными у отдельных антител и линий клеток. Наиболее широко используемая линия клеток для биофармацевтического

производства изначально была получена из яичника китайского хомячка (клеток СНО) и в настоящее время большинство рекомбинантных моноклональных антител получают в подпитываемой культуре.

[3] Антитело против рецептора IL-36 (IL-36R) спесолимаб снижает или  
5 блокирует опосредуемый лигандом IL-36 сигнал, и его применяют в лечении болезней или состояний, связанных с этим сигналом.

[4] Интерлейкин 36 (IL-36) представляет собой группу цитокинов в  
10 семействе IL-1 с провоспалительным эффектом. Семейство IL-36 насчитывает четыре представителя: IL-36 $\alpha$  (IL-1F6), IL-36 $\beta$  (IL-1F8), IL-36 $\gamma$  (IL-1F9) и IL-36Ra (IL-1F5), которые связываются с IL-36R (ранее называемым IL-1Rrp2), образуя гетеродимер с IL-1RAcP. Лиганды IL-36R связаны со многими болезненными состояниями, и антитело против IL-36R спесолимаб эффективно в  
15 лечении воспалительных заболеваний и аутоиммунных заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона (CD), язвенный колит (UD), атопический дерматит (AtD), ладонно-подошвенный пустулез (PPP) и генерализованный пустулезный псориаз (GPP).

[5] Предшествующие процессы и параметры имеют сильное влияние на  
20 характеристики антитела как продукта, и к ним относятся среда для культивирования клеток и этапы процесса, такие как температура и плотность посева. Среда для культивирования клеток должна отвечать сложным требованиям к питательным веществам для клеток млекопитающих, культивируемых в суспензии в технических системах в отличие от их природного источника.

[6] Среда для культивирования клеток состоит главным образом из  
25 источника энергии, такого как углеводы или аминокислоты, липиды, витамины, микроэлементы, соли, факторы роста, полиамины и непитательные компоненты, такие как буфер, поверхностно-активные вещества или антивспенивающие агенты. Среды, используемые при подпитываемом культивировании, разделяют на две подгруппы: технологические среды (Р-среды) или основные среды и  
30 питающие среды (F-среды). Основные среды содержат все незаменимые компоненты в первоначальной концентрации, и их используют для инокуляции. Питающие среды обеспечивают главным образом питательные вещества в высокой концентрации во время процесса культивирования. Таким образом, среды для культивирования клеток представляют собой сложные композиции

многих разных соединений, и проблема состоит в распознавании соединений, ведущих к улучшению роста, производительности или качества продукта. Металлические микроэлементы содействуют широкому спектру внутри- и внеклеточных функций в культуре клеток СНО, необходимой для оптимальной продуктивности и качества mAb, включая потребление лактата, энергетический обмен, продуктивность и качество продукта. Часто применяемыми металлическими микроэлементами в среде для культивирования клеток являются железо, медь, цинк и марганец, которые традиционно добавляют с эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота, и изменчивость между партиями приводит к изменчивым результатам. В химически определенных средах микроэлементы и питательные вещества обеспечивают в определенной концентрации, и любой дефицит или избыток металлических микроэлементов может повлиять на эффективность культивирования клеток, например, рост или жизнеспособность клеток, а также продуктивность и качество продукта. Например, давно известно, что дефицит цинка вызывает раннюю смерть клеток млекопитающих. Было продемонстрировано, что дефицит магния и кальция вызывает апоптоз в клетках СНО, а дефицит меди влияет на метаболизм лактата в клетках СНО (Graham R. J., Bhatia H., Yoon S., *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116: 3446 - 3456). Также известно, что избыток меди вызывает повышение продуктивности mAb, но и повышение варианта основного заряда. Таким образом, сохраняется потребность в дальнейшем улучшении условий культивирования для улучшения качества продукта без значительного влияния на выход продукта.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] Согласно настоящему изобретению, предлагается способ, обеспечивающий действенный и эффективный процесс продуцирования антитела спесолимаба, результатом которого является антитело с определенными характеристиками продукта, такими как низкоосновные виды и низкий уровень видов со структурой маннозы 5.

[8] Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ продуцирования антитела спесолимаб в культуре клеток, который включает (а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для культивирования клеток с использованием подпитываемой культуры, включая (I) посев клеток в

культуральной среде и (II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой, причем  $\text{Cu}^{2+}$  добавляют к культуральной среде в количестве 0,35 - 1,2 мкМ и железо в количестве 1500 мкМ или более перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева; (б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и (в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток. Предпочтительно  $\text{Cu}^{2+}$  и железо добавляют к культуральной среде перед посевом на этапе (I) и/или в течение 1 дня после посева. В одном варианте осуществления  $\text{Cu}^{2+}$  и/или железо добавляют к культуральной среде одним или несколькими болюсными добавлениями или непрерывно. Одно или несколько болюсных добавлений включают обеспечение  $\text{Cu}^{2+}$  и/или железа с базальной средой. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, стабильно включают в геном СНО. Способ включает питание клеток питательной средой. В некоторых вариантах осуществления питательную среду добавляют, начиная с 0-го дня по 3-й день культивирования, предпочтительно начиная с 1-го по 3-й день, более предпочтительно с 1-го по 2-й день, еще более предпочтительно – в 1-й день. Согласно способу в соответствии с изобретением, повышенная концентрация железа и/или сниженная концентрация меди в культуральной среде в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % группы основного пика (BPG). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело спесолимаб, продуцируемое согласно способу в соответствии с изобретением, имеет  $\leq 7,5$  % BPG.

[9] В возможных вариантах способы также включают регулирование плотности посева. В некоторых вариантах осуществления плотность посева на этапе (A) составляет  $\geq 0,7 \times 10^6$  клеток/мл, предпочтительно от  $0,7 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, более предпочтительно от  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, еще более предпочтительно – от  $0,9 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,3 \times 10^6$  клеток/мл. Повышенная плотность посева в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % BPG и/или % структур Man5. В возможном варианте способ также включает регулирование температуры культивирования и/или концентрации растворенного кислорода, причем

повышение температуры культивирования и/или снижение растворенного кислорода (DO) в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % BPG и/или % структур Man5. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют при температуре от 36,0 °C до 37,5 °C в  
5 условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб, включая подпитывание клеток питательной средой, и/или с поддержанием концентрации растворенного кислорода в вышеупомянутой культуре в пределах 30 - 60 %. В некоторых вариантах осуществления антитело спесолимаб имеет менее 5 %  
10 структур Man5, предпочтительно менее 4 % структур Man5, более предпочтительно – менее 3 % структур Man5, и/или  $\leq 7,5$  % BPG, предпочтительно  $\leq 7$  % BPG, более предпочтительно  $\leq 6,5$  % BPG, еще более предпочтительно –  $\leq 6$  % BPG  $\leq 7$  % BPG, предпочтительно  $\leq 6$  % BPG.

[10] Хотя согласно способам в соответствии с изобретением возможно использование любой клетки СНО, типичными клетками СНО являются клетки  
15 СНО-K1 и СНО-DG44.

[11] В еще одном аспекте обеспечивается способ продуцирования антитела спесолимаба в культуре клеток, который включает (а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для культивирования клеток с  
20 использованием подпитываемой культуры, включая (I) посев клеток в культуральной среде с плотностью посева  $\geq 0,7 \times 10^6$  клеток/мл и (II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой, причем к культуральной среде  
25 необязательно добавляют  $\text{Cu}^{2+}$  в количестве 0,35 - 1,2 мкМ и железо в количестве 1500 мкМ или более перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева; (б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и (в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток.

[12] Изобретение также касается композиции, включающей антитело спесолимаб, имеющее (А)  $\leq 7,5$  % BPG, предпочтительно  $\leq 7$  % BPG, более предпочтительно  $\leq 6,5$  % BPG, еще более предпочтительно –  $\leq 6$  % BPG; и/или  
30 (б) менее 5 % структур Man5, предпочтительно менее 4 % структур Man5, более предпочтительно – менее 3 % структур Man5; и/или (в) менее 3 %

гликированных вариантов лизина тяжелой цепи (НС) и/или лизины К38 (НС) и К67 (НС) не являются гликированными, и гликирование в К23 (НС) составляет менее 0,3 %.

[13] Изобретение также касается композиции, включающей антитело спесолимаб, причем антитело спесолимаб получают согласно способу в соответствии с изобретением.

[14] В возможном варианте композиция, включающая антитело спесолимаб, представляет собой собранную клеточную культуральную жидкость (НССФ), аффинно-связанный пул, лекарственное вещество или лекарственный продукт, предпочтительно лекарственное вещество или лекарственный продукт. Предпочтительно композиция представляет собой лекарственный продукт, включающий антитело спесолимаб, имеющее менее 7,5 % ВРГ и/или менее 5 % структур Man5. В определенном варианте осуществления антитело спесолимаб в композиции включает  $\leq 6$  % гликированных вариантов лизина тяжелой цепи (НС), и/или лизины К38 (НС) и К67 (НС) не являются гликированными, и гликирование в К23 (НС) составляет  $\leq 0,3$  %.

[15] Изобретение также обеспечивает композицию, включающую антитело спесолимаб, имеющее  $\leq 3$  % гликированных вариантов лизина в тяжелой цепи (НС), и/или лизины К38 (НС) и К67 (НС) не являются гликированными, и гликирование в К23 (НС) составляет  $\leq 0,3$  %.

#### ФИГУРЫ

[16] **Фигура 1** показывает влияние изменения концентрации Fe (мкМ) и изменения концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  (мкМ) на качество продукта, как описано в Примерах согласно ПЭ. (А) показывает влияние изменения концентрации железа и меди на ВРГ (%) согласно измерению путем хроматографии с сильным катионным обменом ВЭЖХ (НР-SCX) для  $\text{Cu}^{2+}$  и для железа в виде контурного графика. (В) показывает влияние изменения концентрации меди на ВРГ (%) согласно измерению путем хроматографии с сильным катионным обменом ВЭЖХ (НР-SCX) в виде однофакторного графика. (С) показывает влияние изменения концентрации железа на ВРГ (%) согласно измерению путем хроматографии с сильным катионным обменом ВЭЖХ (НР-SCX) в виде однофакторного графика. Пунктирные линии на однофакторных графиках представляют доверительный интервал 95 %. Также показано влияние изменения

концентрации железа и меди на (D) концентрацию продукта (мг/л), (E) IVC (1е6 клеток \*ч/мл) и (F) жизнеспособность (%) в виде контурного графика.

[17] **Фигура 2** показывает влияние изменения плотности посева (1е6 клеток/мл, Фактор 1), температуры культивирования (°С, Фактор 2), растворенного кислорода (DO %, Фактор 3) и интенсивности подпитывания (мл/л/день, Фактор 4) на качество продукта, как описано в Примерах согласно ПЭ (плану эксперимента). (A) Показано влияние изменения температуры культивирования и плотности посева на BPG (%) согласно измерению путем хроматографии с сильным катионным обменом ВЭЖХ (HP-SCX) в виде контурного графика. (B) Показано влияние изменения плотности посева на BPG (%) согласно измерению путем хроматографии с сильным катионным обменом ВЭЖХ (HP-SCX) в виде однофакторного графика. (C) Показано влияние изменения температуры культивирования на BPG (%) согласно измерению путем хроматографии с сильным катионным обменом ВЭЖХ (HP-SCX) в виде однофакторного графика. (D) Показано влияние изменения плотности высеваемых клеток в виде однофакторного графика на структуры Man5 (Oligo Map Peak 3 (%)). (E) Показано влияние изменения температура культивирования в виде однофакторного графика на структуры Man5 (Oligo Map Peak 3 (%)). Пунктирные линии на однофакторных графиках представляют доверительный интервал 95 %. Также показано влияние изменения температуры и плотности посева на (F) концентрацию продукта (титр, мг/л), (G) IVC (1е6 клеток \*ч/мл), и (H) жизнеспособность (%) в виде контурного графика.

[18] **Фигура 3** показывает влияние изменения плотности посева (1е6 клеток/мл, Фактор 1), температуры культивирования (°С, Фактор 2), растворенного кислорода (DO %, Фактор 3) и интенсивности подпитывания (мл/л/день, Фактор 4), как описано в Примерах согласно ПЭ. (A) Показано влияние изменения концентрации DO на однофакторном графике на BPG (%) согласно измерению путем хроматографии с сильным катионным обменом ВЭЖХ (HP-SCX). (B) Показано влияние изменения концентрации DO на однофакторном графике на структуры Man5 (Oligo Map Peak 3 (%)). (C) Показано влияние изменения концентрации DO на однофакторном графике на концентрацию продукта (титр, мг/л). (D) Показано влияние изменения концентрации DO на однофакторном графике на IVC (1е6 клеток\*ч/мл).

Пунктирные линии на однофакторных графиках представляют доверительный интервал 95 %.

[19] **Фигура 4** показывает профиль гетерогенности спесолимаба с применением катионообменной хроматографии (КОХ). (А) Показан хроматографический профиль катионообменной хроматографии (КОХ) с обозначением кислотных и основных пиков. (В) Показан такой же хроматографический профиль катионообменной хроматографии (КОХ), как на графике (А), в увеличенном масштабе. (С) Показаны хроматограммы КОХ, собранные из разных отдельных фракций кислотных пиков в виде наложения.

[20] **Фигура 5** показывает типичную олигосахаридную картину спесолимаба с применением ЖХГВ-УВЭЖХ с флуоресцентным обнаружением. Показаны главные пики олигосахаридной карты, обозначенные как Пики 1 - 6; Пик 1 = A1FG0 (асиалилированный-агалактозилированный кор-фукозилированный моноантенный), Пик 2 = A2FG0 (асиалилированный-агалактозилированный кор-фукозилированный биантенный), Пик 3 = Man5 пентаманнозный кор, Пик 4 = A2FG1 (асиалилированный-моногалактозилированный кор-фукозилированный биантенный), Пик 5 = A2FG1 (асиалилированный-моногалактозилированный кор-фукозилированный биантенный), Пик 6) = A2FG2 (асиалилированный-дигалактозилированный кор-фукозилированный биантенный). Ось x показывает область интеграции для хроматограмм в минутах, а ось y показывает флуоресценцию как сигнал напряжения.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[21] Общие варианты осуществления “включающий” или “включенный” охватывают более конкретный вариант осуществления “состоящий из”. Кроме того, формы единственного и множественного числа применяются в не ограничивающем значении.

[22] Термин “среда для культивирования клеток” или “культуральная среда” в контексте данного описания означает среду для культивирования клеток млекопитающих, включающую минимум незаменимых питательных веществ и компонентов, таких как витамины, микроэлементы, соли, рассыпные соли, аминокислоты, липиды, углеводы, предпочтительно в буферной среде. Как правило, среда для культивирования клеток млекопитающих имеет приблизительно нейтральный уровень pH, например, pH от приблизительно 6,5

до приблизительно 7,5, предпочтительно от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,3, более предпочтительно приблизительно 7. Неограничивающие примеры таких сред для культивирования клеток включают серийно выпускаемые среды, такие как среда Хэма F12 (Sigma, Deisenhofen, Германия), RPMI-1640 (Sigma), модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM; Sigma), минимальная питательная среда (MEM; Sigma), Среда Дульбекко в модификации Искова (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, Калифорния (США), CHO-S-Invitrogen), бессывороточная среда CHO (Sigma) и безбелковая среда CHO (Sigma) и т. п., а также среды собственной разработки из различных источников, такие как описываемые в документе WO 2016/156476, полное содержание которого включено в данный документ путем ссылки. В возможном варианте среда для культивирования клеток является базальной средой для культивирования клеток. Среда для культивирования клеток также может быть базальной средой для культивирования клеток, в которую были добавлены питательная среда и/или добавки. Среду для культивирования клеток также называют ферментационным бульоном, если клетки культивируют в ферментере или биореакторе.

[23] Термин “культивирование клеток” или “культура клеток” включает процессы культивирования клеток и ферментации во всех масштабах (например, от микротитровальных планшетов до крупномасштабных промышленных биореакторов, т. е., от субмиллилитрового масштаба до масштаба  $> 10\ 000$  л), во всех различных режимах процесса (например, периодическом, подпитываемом, перфузионном, непрерывном культивировании), во всех режимах контроля процесса (например, неконтролируемом, полностью автоматизированном и в контролируемых системах, например, с контролем pH, температуры, содержания кислорода), во всех типах систем ферментации (например, системах одноразового использования, системах из нержавеющей стали, системах со стеклянной посудой). Согласно изобретению, культура клеток представляет собой культуру клеток млекопитающего и является подпитываемой культурой. В предпочтительном варианте осуществления культура клеток является культурой клеток в объеме  $> 10$  л,  $> 1000$  л,  $> 5000$  л, более предпочтительно  $> 10\ 000$  л.

[24] Термин “подпитка” в контексте данного описания означает культуру клеток, в которой клетки непрерывно или периодически подпитываются питательной средой, содержащей питательные вещества.

Подпитку начинают вскоре после начала культивирования клеток в 0-й день или, в более типичном варианте, через один, два или три дня после начала культивирования. Подпитка возможна по заданному плану, например, каждый день, через день, через два дня и т. д. В альтернативном варианте культивирование контролируют на предмет роста клеток, питательных веществ или токсичных побочных продуктов, и подпитку соответствующим образом регулируют. В целом следующие параметры часто определяют на ежедневной основе, и они охватывают концентрацию жизнеспособных клеток, концентрацию продукта (титр) и нескольких метаболитов, таких как глюкоза, рН, лактат, осмолярность (меру содержания солей) и аммоний (ингибитор роста, отрицательно влияющий на скорость роста и уменьшающий жизнеспособную биомассу). По сравнению с периодическими культурами (культивируемыми без подпитки) в режиме подпитки достигают более высоких титров продукта. Как правило, подпитывание культуры в определенный момент прекращают и клетки и/или среду собирают и нужный продукт, такой как антитело спесолимаб, выделяют и/или очищают. Процесс подпитки, как правило, поддерживают приблизительно 2 - 3 недели, например, приблизительно от 10 до 24 дней, приблизительно от 12 до 21 дня, приблизительно от 12 до 18 дней, предпочтительно приблизительно от 12 до 16 дней.

[25] Термин “базальная среда” или “базальная среда для культивирования клеток” в контексте данного описания означает среду для культивирования клеток, предназначенную для культивирования клеток млекопитающих, как определено ниже. Он касается среды, в которой клетки культивируют с начала периода культивирования клеток и которую не используют в качестве добавки к другой среде, хотя допускается возможность добавления к среде различных компонентов. Базальная среда служит в качестве основы, к которой необязательно добавляют другие добавки (или дополнительные компоненты), и/или питательную среду добавляют во время культивирования, т. е., в период культивирования клеток с получением в результате среды для культивирования клеток. Базальную среду для культивирования клеток обеспечивают с начала процесса культивирования клеток. В целом базальная среда для культивирования клеток обеспечивает питательные вещества, такие как источники углерода, аминокислоты, витамины, рассыпные соли (например, хлорид натрия или хлорид калия), различные

микроэлементы (например, железо, медь, цинк и марганец), рН-буфер, липиды и глюкоза. Основные рассыпные соли обычно предусматриваются только в базальной среде и не должны превышать конечную осмолярность в культуре клеток приблизительно 280 - 350 мосмоль/кг, чтобы культура клеток была способна расти и размножаться в условиях приемлемого осмотического стресса.

[26] Термин “питание” или “питательная среда” в контексте данного описания означает концентрат питательных веществ / концентрированную питательную композицию, применяемую в качестве подпитки при культивировании клеток млекопитающих. Ее обеспечивают как “концентрированную питательную среду” для минимизации разведения культуры клеток. Как правило, питательную среду обеспечивают в количестве 10 - 50 мл/л/день, предпочтительно 15 - 45 мл/л/день, более предпочтительно 20 - 35 мл/л/день на основе первоначального объема культуры (CSV, что означает первоначальный объем в 0-й день) в сосуде. Это соответствует ежедневному добавлению приблизительно 1 - 5 %, предпочтительно приблизительно 1,5 - 4,5 %, более предпочтительно – приблизительно 2 - 3 % первоначального объема культуры. Для культур с использованием посева высокой плотности или сверхвысокой плотности может быть благоприятной более высокая интенсивность подпитывания, например 10 - 50 мл/л/день, 15 - 45 мл/л/день или 25 - 45 мл/л/день. Это соответствует ежедневному добавлению приблизительно 1 - 5 %, приблизительно 1,5 - 4,5 % или приблизительно 2,5 - 4,5 % первоначального объема культуры. Интенсивность подпитывания следует понимать как среднюю интенсивность подпитывания за период подпитывания. Питательная среда, как правило, имеет более высокую концентрацию большинства, но не всех компонентов базальной среды для культивирования клеток. В целом питательная среда замещает питательные вещества, потребленные во время культивирования клеток, такие как аминокислоты и углеводы, тогда как соли и буферы имеют меньшее значение и, как правило, обеспечиваются с базальной средой. Кроме того, микроэлементы, как правило, обеспечивают главным образом с базальной средой, и они могут присутствовать в питательной среде. Питательную среду, как правило, добавляют к (базальной) среде для культивирования клеток / ферментационному бульону в режиме подпитки. Питательная среда, добавляемая (периодически или непрерывно) к базальной среде, в результате дает среду для культивирования клеток. Подпитку

добавляют в разных режимах, таких как непрерывное или болюсное добавление, или путем применения связанных с перфузией технологий (хемостат или гибридно-перфузионная система). Предпочтительно питательную среду добавляют раз в день, но также возможно и более частое добавление, например, 5 два раза в день, или менее частое добавление, например, через день. Более предпочтительно питательную среду добавляют непрерывно. Добавление питательных веществ, как правило, выполняют во время культивирования (т. е., после 0-го дня). В отличие от базальной среды, питательная среда, как правило, состоит из высококонцентрированного питательного раствора (например, > 6х), 10 обеспечивающего все компоненты, подобные базальной среде, за исключением "высокоосмолярных активных соединений", таких как основные рассыпные соли (например, NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Как правило, 6-кратный или более концентрат базальной среды с восстановленными рассыпными солями или без них сохраняет надлежащую растворимость соединений и достаточно низкую 15 осмолярность (например, 270 - 1500 мосмоль/кг, предпочтительно 310 - 800 мосмоль/кг) с целью поддержания осмолярности в культуре клеток на уровне приблизительно 270 - 550 мосмоль/кг, предпочтительно приблизительно 280 - 450 мосмоль/кг, более предпочтительно – приблизительно 280 - 350 мосмоль/кг. Питательную среду добавляют как одну полную питательную среду, или она 20 включает одну или несколько питательных добавок для отдельного добавления к культуре клеток. Применение одной или нескольких питательных добавок бывает необходимым из-за различных планов подпитки, например, регулярной подпитки или подпитки по мере необходимости, часто выполняемой для добавления глюкозы, которую, таким образом, обычно по меньшей мере также 25 обеспечивают в виде отдельной подпитки. Применение одной или нескольких питательных добавок также бывает необходимым из-за низкой растворимости некоторых соединений, растворимости некоторых соединений при другом уровне pH и/или взаимодействия соединений в питательной среде при высокой концентрации.

30 [27] Термин "питательная добавка" в контексте данного описания означает концентрат питательного вещества, который добавляют к питательной среде перед использованием или добавляют отдельно от питательной среды к базальной среде и/или среде для культивирования клеток. Таким образом, соединение обеспечивают питательной средой или питательной добавкой, или

соединение обеспечивают и питательной средой, и питательной добавкой. Например, цистеин добавляют согласно стратегии двухразовой подпитки с питательной средой и с питательной добавкой. В качестве питательной среды “питательную добавку” обеспечивают как концентрат во избежание разведения культуры клеток.

5 [28] Среда для культивирования клеток, т. е., базальная среда и/или питательная среда, предпочтительно является бессывороточной, химически определенной, или и химически определенной, и безбелковой. “Бессывороточная среда” в контексте данного описания означает среду для культивирования 10 клеток, предназначенную для культивирования клеток *in vitro*, которая не содержит сыворотки животного происхождения. Ей отдают предпочтение, поскольку сыворотка может содержать примеси вышеупомянутого животного происхождения, такие как вирусы, а также по причине того, что сыворотка недостаточно определена и разнится от партии к партии. Базальная среда и 15 питательная среда согласно изобретению являются бессывороточными.

[29] Термин “химически определенная среда” в контексте данного описания означает среду для культивирования клеток, подходящую для культивирования клеток *in vitro*, в которой все компоненты известны. Более конкретно, она не включает добавок, таких как сыворотка животного происхождения или гидролизаты растительного, дрожжевого или животного происхождения. Она может включать гидролизаты лишь в случае, если все компоненты были проанализированы, и ее точный состав известен и может быть воспроизведен. Базальная среда и питательная среда согласно изобретению предпочтительно являются химически определенными. Химически определенная 20 среда также может включать рекомбинантные белки, такие как рекомбинантные факторы роста, в частности, инсулин или инсулиноподобный фактор роста (IGF). 25

[30] “Безбелковая среда” в контексте данного описания означает среду для культивирования клеток, предназначенную для культивирования клеток *in vitro*, которая не включает белок, за исключением белков, продуцируемых 30 культивируемой клеткой, причем белок означает полипептиды любой длины, но не включает отдельные аминокислоты, дипептиды или трипептиды. В частности, факторы роста, такие как инсулин и инсулиноподобный фактор роста (IGF), в среде отсутствуют. Предпочтительно базальная среда и питательная среда

согласно настоящему изобретению являются химически определенными и безбелковыми.

[31] В контексте данного описания термин “средовая платформа” состоит из базальной среды для культивирования клеток, которую обеспечивают в начале процесса культивирования клеток, и питательной среды, которую добавляют к базальной среде для культивирования клеток во время культивирования. В процессе культивирования клеток необязательно добавляют другие добавки, такие как глюкоза. Подача питательной среды возможна в любом режиме процесса с подпиткой (например, непрерывном, с изменением интенсивности подпитки или с болюсным добавлением подпитки).

[32] Термины “живучесть” и “жизнеспособность” являются синонимами и означают процент жизнеспособных клеток в культуре клеток, определяемый способами, известными специалистам в данной области, например, путем вытеснения трипанового синего при помощи устройства Cedex с автоматизированным микроскопическим подсчетом клеток (Roche Diagnostics, Mannheim). Однако существует и множество других способов определения жизнеспособности, таких как флуорометрические (например, на основе пропидий йодида), калориметрические или ферментативные способы, применяемые для отображения энергетического обмена живой клетки, например, способы, в которых используют LDH, лактат-дегидрогеназу, или некоторые тетразолиевые соли, такие как аламаровый синий, МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолийбромид) или ТТС (тетразолийхлорид).

[33] Термины “полипептид” или “белок” или “продукт” или “белковый продукт” или “последовательность аминокислотного остатка” применяются взаимозаменяемо. Эти термины в контексте настоящего изобретения касаются полимеров аминокислот любой длины, предпочтительно моноклонального антитела, еще более предпочтительно – моноклонального антитела спесолимаба. Эти термины также охватывают белки или антитела, которые посттрансляционно модифицируются через реакции, включая, помимо прочих, гликозилирование, гликирование, ацетилирование, фосфорилирование, окисление, амидирование или белковую обработку.

[34] Термин “кодирует” в контексте данного описания в широком смысле означает любой процесс, при котором информация в полимерной макромолекуле используется для направления продуцирования второй

молекулы, отличной от первой. Вторая молекула может иметь химическую структуру, отличающуюся от химической природы первой молекулы. Например, в некоторых аспектах термин “кодировать” означает процесс полуконсервативной репликации ДНК, при которой одну цепь двухцепочечной молекулы ДНК используют в качестве шаблона для кодирования вновь синтезированной комплементарной сестринской цепи ДНК-зависимой ДНК-полимеразы. В других аспектах молекула ДНК может кодировать молекулу РНК (например, в процессе транскрипции, в котором используют ДНК-зависимый фермент РНК-полимеразу). Кроме того, молекула РНК способна кодировать полипептид, как в процессе трансляции. Применяемый для описания процесса трансляции термин “кодировать” также распространяется на триплет-кодон, который кодирует аминокислоту. А некоторых аспектах молекула РНК может кодировать молекулу ДНК, например, в процессе обратной транскрипции, включающей РНК-зависимую ДНК-полимеразу. В еще одном аспекте, молекула ДНК может кодировать полипептид, и в этом случае термин “кодировать” следует понимать как включающий процессы как транскрипции, так и трансляции. В контексте настоящего изобретения термин “нуклеиновая кислота, кодирующая антитело спесолимаб” означает молекулу ДНК или последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность антитела спесолимаба, т. е., тяжелую цепь и легкую цепь. Предпочтительно нуклеиновая кислота, кодирующая антитело спесолимаб, является стабильно интегрированной в геном клетки СНО.

[35] Термин “спесолимаб” в контексте данного описания означает гуманизированное моноклональное антитело IgG1 против IL-36R, имеющее название INN спесолимаб, также зарегистрированное под регистрационным номером CAS 2097104-58-8. Спесолимаб имеет следующие аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи:

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (НС):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWMGEINPGNVRTN  
 YNENFRNKVTMTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCTVVFYGEPIYFPYWGQGLTLVTVS  
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA  
 AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHELPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF

PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLLJBDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

Аминокислотная последовательность легкой цепи (LC):

QIVLTQSPGTLSSLSPGERATMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGQAPRLWIYRTSRLASGV  
5 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDAATYYCHQFHRSPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQLBKLBITYSL  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

Вариабельная аминокислотная последовательность тяжелой цепи (VH):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWMGEINPGNVRTN  
10 YNENFRNKVTMTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCTVVFYGEPIFPYWGQGLTIVS  
S (SEQ ID NO: 3)

Вариабельная аминокислотная последовательность легкой цепи (LC):

QIVLTQSPGTLSSLSPGERATMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGQAPRLWIYRTSRLASGV  
15 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDAATYYCHQFHRSPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:  
4)

[36] Термин “антитело спесолимаб” в контексте данного описания  
означает антитело спесолимаб, продуцируемое в культуре клеток CHO,  
предпочтительно с применением способа согласно настоящему изобретению и,  
таким образом, касается множества молекул антител с определенной степенью  
20 гетерогенности вариантов. Таким образом, специалисту в данной области станет  
понятно, что он касается смеси разных видов спесолимаба, таких как те, которые  
включают различные посттрансляционные модификации, в том числе варианты  
гликозилирования, варианты заряда и варианты или виды гликирования.

[37] Термин “посев” в контексте данного описания означает забор  
25 образца клеток млекопитающих, таких как клетки CHO, и помещение их в среду,  
которая содержит питательные вещества, необходимые для роста. Как правило,  
клетки млекопитающих помещают в базальную среду для роста или  
продуцирования. Этот этап также называют инокуляцией. Клетки  
млекопитающих инокулируют в базальную среду с разной плотностью посева. В  
30 контексте данного описания термин “нормальный посев” означает стандартную  
плотность посева от приблизительно  $0,7 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $1 \times 10^6$   
 $10^6$  клеток/мл, термин “высокий посев” означает плотность посева более  $1 \times 10^6$   
клеток/мл до приблизительно  $4 \times 10^6$  клеток/мл, а термин “сверхвысокий посев”  
означает плотность посева более  $4 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $20 \times 10^6$

клеток/мл или еще выше, предпочтительно от приблизительно  $6 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $15 \times 10^6$  клеток/мл, более предпочтительно – от  $8 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $12 \times 10^6$  клеток/мл. В соответствии с настоящим изобретением клетки СНО предпочтительно высевают в концентрации  $\geq 0,7 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки СНО высевают в концентрации от  $0,7 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $2 \times 10^6$  клеток/мл, предпочтительно от  $0,7 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, более предпочтительно – от  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, еще более предпочтительно – от  $0,9 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $1,3 \times 10^6$  клеток/мл.

[38] Железо является незаменимым ингредиентом в средах для культивирования клеток млекопитающих (I) в качестве микроэлемента и (II) в качестве заменителя трансферрина (например, железа в форме хелата железа). Трансферрин, как правило, получают из плазмы и поставляют в форме лиофилизированного порошка человеческого трансферрина, частично насыщенного железом. Трансферрин представляет собой гликопротеин с гомологичным N-концевым и C-концевым связывающимися с железом доменами и связан с несколькими другими связывающимися с железом белками, включая лактоферрин, меланотрансферрин и овотрансферрин. Трансферрин серийно выпускают для применения в культурах клеток животных (например, Sigma-Aldrich, номер CAS 11096-37-0). Существует множество соединений железа, применяемых в качестве заменителей трансферрина в среде для культивирования клеток. Они существуют в формах II/III, в формах различных солей и в гидратированных / дегидратированных формах. Примерами, помимо прочих, являются фосфат железа (III), пирофосфат железа (III), нитрат железа (III), сульфат железа (II), хлорид железа (III), лактат железа (II), цитрат железа (II), железо(II)-аммониевый цитрат, железо-декстран, холинцитрат железа (III) или железонатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты. Предпочтительными источниками железа являются пирофосфат железа ( $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ ), железоаммониевый цитрат ( $(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]$ ), цитрат железа ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$ ), холинцитрат железа ( $\text{C}_{33}\text{H}_{57}\text{Fe}_2\text{N}_3\text{O}_{24}$ ), нитрат железа ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ), фосфат железа ( $\text{FePO}_4$ ), сульфат железа ( $\text{FeSO}_4$ ) и хлорид железа ( $\text{FeCl}_3$ ).

[39] Термин “холинцитрат железа” в контексте данного описания означает химическое соединение холинцитрат железа под номером CAS 1336-80-

7, образующее комплекс холинцитрата железа. Распространенными применяемыми синонимами являются, например, феррохолинат цитрат, холинцитрат железа, холинцитрат, холинцитрат железа (III), холиновый цитрат железа, трихолинцитрат, 2-гидроксиэтил-триметиламмоний, 2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат. Это соединение добавляют в качестве носителя железа и к базальной, и к питательной среде. Холинцитрат железа с молярным отношением железа : холина : цитрата 2:3:3 (холинцитрат железа, номер CAS 1336-80-7, молекулярная масса = 991,5 г/моль +/- 49,57 г/моль из-за 5 % содержания кристаллической воды, комплекс железа с содержанием железа приблизительно 10,2 - 12,4 %, молекулярное отношение железа : холина : цитрата 2:3:3, формула молекулы  $C_{33}H_{57}Fe_2N_3O_{24}$ ) получают, например, от Dr. Paul Lohmann GmbH KG. Однако возможно применение и других структур холинцитрата железа в эквимольном количестве на основе концентрации железа, например, в соотношении железа : холина : цитрата 1:1:1, с молекулярной массой  $M_w = 348,11$  г/моль или в соотношении (железа) : холина : цитрата (2):3:3, с молекулярной массой = 501,61 г/моль,  $C_{21}H_{47}N_3O_{10}$  (суммарная формула без железа). Холинцитрат железа также обеспечивают как отдельные компоненты, включающие источник железа (такой как хлорид железа), источник холина (такой как холинхлорид) и источник цитрата (такой как цитрат натрия) или источник холина и цитрата железа, предпочтительно в соотношении, предусмотренном для описанного выше холинцитрата железа.

[40] Среда для культивирования клеток, предназначенная для культивирования клеток млекопитающих, включает незаменимые питательные вещества, включая аминокислоты и углеводы и такие компоненты, как витамины, микроэлементы, соли, рассыпные соли и липиды или предшественники липидов, предпочтительно в буферной среде. Кроме того, возможно добавление факторов роста к базальной среде для культивирования клеток или питательной среде, например, рекомбинантный инсулиноподобный фактор роста (IGF) или рекомбинантный инсулин. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления базальная среда для культивирования клеток и/или питательная среда являются химически определенными и безбелковыми, за исключением присутствия IGF или рекомбинантного инсулина.

[41] Термин “аминокислота” в контексте данного описания означает двадцать природных аминокислот, кодируемых универсальным генетическим

кодом, как правило, L-формы (т. е., L-аланин, L-аргинин, L-аспарагин, L-аспарагиновая кислота, L-цистеин, L-глутаминовая кислота, L-глутамин, L-глицин, L-гистидин, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин, L-метионин, L-фенилаланин, L-пролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин и L-валин). Аминокислоты (например, глутамин и/или тирозин) предусмотрены в форме дипептидов с повышенной стабильностью и/или растворимостью, предпочтительно содержащих L-аланиновое (L-ala-x) или L-глициновое удлинение (L-gly-x), например, глицил-глутамин и аланил-глутамин. Кроме того, цистеин также может быть предусмотрен как L-цистеин. Термин “аминокислоты” в контексте данного описания включает все его различные соли, такие как (помимо прочих) L-аргинин моногидрохлорид, L-аспарагин моногидрат, L-цистеин гидрохлорид моногидрат, L-цистин дигидрохлорид, L-гистидин моногидрохлорид дигидрат, L-лизин моногидрохлорид и гидроксил L-пролин, L-тирозин динатрий дигидрат. Конкретная форма аминокислот не имеет важного значения с точки зрения данного изобретения, если она не ухудшает такие характеристики, как растворимость, осмолярность, стабильность и чистота. Как правило, в предпочтительных вариантах L-аргинин применяют как L-аргинин x HCl, L-аспарагин применяют как L-аспарагин x H<sub>2</sub>O, L-цистеин применяют как L-цистеин x HCl x H<sub>2</sub>O, L-цистин применяют как L-цистин x 2 HCl, L-гистидин применяют как L-гистидин x HCl x H<sub>2</sub>O, и L-тирозин применяют как L-тирозин x 2 Na x 2 H<sub>2</sub>O, причем каждую предпочтительную форму аминокислоты выбирают независимо от одной или нескольких других или любой их комбинации. Также охватываются дипептиды, включающие одну или две соответствующих аминокислоты. Например, L-глутамин часто добавляют в форме дипептидов, таких как L-аланил-L-глутамин, к среде для культивирования клеток для улучшения стабильности и уменьшения накопления аммония при хранении или во время длительного культивирования.

[42] Термины “все аминокислоты в среде” или “общее содержание аминокислот” в контексте данного описания означают сумму определяемых выше “аминокислот” в мМ. В дипептиде каждую аминокислоту учитывают в отдельности, и, таким образом, 1 мМ аланил-глутамин учитывают как 1 мМ L-аланина и 1 мМ L-глутамин (молярное отношение 1:1). Подобным образом в L-цистине каждый цистеин учитывают отдельно, и, таким образом, 1 мМ L-цистина учитывают как 2 мМ L-цистеина (молярное отношение 1:2). Как

правило, общее содержание аминокислот является приблизительно в 5 - 20 раз, предпочтительно приблизительно в 7 - 15 раз, более предпочтительно – приблизительно в 10 раз большим в концентрированной питательной среде по сравнению с базальной средой для культивирования клеток. Общее содержание аминокислот в базальной среде согласно изобретению составляет приблизительно от 25 до 150 мМ, предпочтительно приблизительно от 30 до 130 мМ, более предпочтительно – приблизительно от 35 до 120 мМ, еще более предпочтительно – приблизительно от 40 до 100 мМ. Общее содержание аминокислот в питательной среде может составлять приблизительно от 100 до 1000 мМ, предпочтительно приблизительно от 200 до 900 мМ, более предпочтительно – приблизительно от 300 до 800 мМ, еще более предпочтительно – приблизительно от 400 до 700 мМ. Другие аминокислоты, которые прямо не кодируются универсальным генетическим кодом, такие как L-орнитин, гидроксил-L-пролин или их метаболиты, такие как таурин, также могут присутствовать в базальной среде для культивирования клеток или питательной среде, но они не учитываются в общем содержании аминокислот.

[43] Неограничивающими примерами подходящих витаминов являются биотин (B7), пантотенат кальция, цианокобаламин (B12), фолиевая кислота, миоинозит, ниацинамид (B3), пиридоксал гидрохлорид, пиридоксин гидрохлорид, рибофлавин (B2) и/или тиамин (B1). Неограничивающими примерами микроэлементов являются молибден, ванадий, медь, никель, селенит, силикат и цинк, и типичными источниками микроэлементов являются молибдат аммония, ванадат аммония, сульфат меди, сульфат никеля, селенит натрия, силикат натрия и сульфат цинка и/или хлорид цинка. Неограничивающими примерами предшественников липидов являются холин хлорид, этаноламин, глицерин, инозит, линолевая кислота, жирные кислоты, фосфолипиды или связанные с холестерином соединения.

[44] Кроме того, возможными солями, помимо прочих, являются, хлорид кальция, нитрат кальция, хлорид магния, сульфат магний, хлорид калия и/или хлорид натрия. Одна из функций соли состоит в регулировании осмолярности в среде. Предпочтительно осмолярность базальной среды для культивирования клеток не выходит за пределы типичного оптимального диапазона 280 - 350 мосмоль/кг. Как правило, осмолярность концентрированной питательной среды составляет < 2000 мосмоль/кг, предпочтительно < 1500 мосмоль/кг, более

предпочтительно < 1000 мосмоль/кг. Возможна и более высокая осмолярность питательной среды, но она не должна увеличивать осмолярность в культуре клеток после добавления, чтобы она выходила за пределы оптимального диапазона 270 - 550 мосмоль/кг, предпочтительно 280 - 450 мосмоль/кг, более  
5 предпочтительно – 280 - 350 мосмоль/кг.

[45] Предпочтительно питательная среда имеет сниженное или низкое содержание солей. Сниженное или низкое содержание солей означает, например, общую концентрацию солей приблизительно 100 мМ или менее, предпочтительно приблизительно 50 мМ или менее (например, питательная  
10 среда без хлорида натрия и сниженная концентрация хлорида калия). Наиболее способствуют осмолярности ионы натрия, ионы хлорида и бикарбонат, а также глюкоза и другие источники углерода, например, аминокислоты. Кроме того, для общего процесса подпитки питательная среда должна быть концентрированной для минимизации объема культуры в течение периода культивирования. Размер  
15 биореактор фактически может вызвать ограничения подпитки, допускающие лишь общую дозу подпитки приблизительно 35 % (30 - 40 %) от первоначального объема культуры или приблизительно 45 % (40 - 50 %) от первоначального объема культуры.

[46] Углеводами, помимо прочих, могут быть глюкоза, манноза, галактоза, фруктоза, сахароза или глюкозамин и т. п. Эти углеводы добавляют непосредственно в базальную среду для культивирования клеток и/или питательную среду, или добавляют отдельно в культуру клеток. К другим  
20 источникам энергии относится, помимо прочих, пируват натрия.

[47] Клетки млекопитающих культивируют при нейтральном уровне рН, например, от приблизительно рН 6,5 до приблизительно рН 7,5, предпочтительно от приблизительно рН 6,6 до приблизительно рН 7,3, более предпочтительно приблизительно при рН 7. Таким образом, к базальной среде для культивирования клеток требуется добавление буферных агентов. Для питательной среды допускается уровень рН, слегка выходящий за пределы  
25 вышеупомянутого диапазона, при условии, что добавление питательной среды не вызывает выхода уровня рН культуры клеток за пределы этого диапазона, поскольку питательную среду добавляют в форме концентрата. Предпочтительный диапазон уровня рН в питательной среде составляет от  
30 приблизительно 6 до приблизительно 8. Подходящими буферными агентами

являются, помимо прочих, HEPES, фосфатные буферы (например, одноосновный фосфат калия и двухосновный фосфат калия и/или двухосновный безводный фосфат натрия и одноосновный фосфат натрия), феноловый красный, бикарбонат натрия и/или гидрокарбонат натрия.

5 [48] В целом питательная среда включает питательные вещества, потребляемые во время культивирования клеток, такие как аминокислоты и углеводы, тогда как соли и буферы имеют меньшее значение. Таким образом, некоторые соли можно полностью исключить из питательной среды.

10 [49] Базальная среда для культивирования клеток и/или питательная среда должна соответствовать потребностям конкретных клеток и метаболическим потребностям культуры клеток млекопитающего во время культивирования клеток. Другими словами, она соответствует (I) потребностям конкретной клетки млекопитающего, (II) в системе культивирования клеток, (III) в течение всего жизненного цикла периода культивирования (составляющего 15 приблизительно 10 - 20 дней). Клетки млекопитающих в культуре имеют разные потребности в питательных веществах в разных фазах процесса культивирования клеток.

[50] Культивирование клеток также может включать размножение клеток, требуемое для последовательности инокуляции в процедуре масштабирования. Например, масштаб культивирования постепенно повышают от размораживания банка клеток (миллилитровый масштаб) до производственного масштаба (> 10 000 л). Чем лучше рост на каждой N-х стадии (N-стадия означает конечный масштаб производства, а N-х означает стадии 20 размножения клеток перед конечной стадией производства, обычно в периодическом режиме), тем быстрее и лучше происходит каждый переход к следующей стадии. В частности, лучший рост клеток и более высокая концентрация жизнеспособных клеток позволяют выполнять N-х культивирование с сокращением времени процесса (то есть, быстрее). Улучшенный рост клеток и повышенная концентрация жизнеспособных клеток в 25 результате также обеспечивают улучшенный перенос, что улучшает общую эффективность. Например, если определенная N-х стадия требует инокуляции определенной плотности высеваемых клеток, и концентрация жизнеспособных клеток при этом высока, требуется перенос относительно малого объема культуры клеток от одной стадии к следующей (перенос объема инокулята на 30

изначальный объем культуры (CSV), определяемый как индекс разведения, обычно от 1:5 до 1:20). Это означает, что одновременно только уменьшенный объем “использованной” среды для культивирования клеток переносится от одной стадии к следующей, и максимальный объем “новой” среды может быть добавлен к следующей стадии (при неизменных общих объемах культивирования). В результате также обеспечивается улучшение общей эффективности культивирования клеток на конечной N-стадии (например, повышенный титр продукта).

[51] В большинстве культур клеток из-за избыточного обмена веществ возможен неидеальный состав питательных веществ для основного углерода. Это означает, что основной источник углерода глюкоза используется неэффективно, что способствует увеличению количества органических кислот, например, молочной кислоты. Повышенный уровень молочной кислоты способен вызвать снижение уровня pH ниже 6,65, а это отрицательно сказывается на буферной активности культуральной среды и, таким образом, на жизнеспособности культуры. По этой причине концентрацию CO<sub>2</sub> в атмосфере культуры снижают в начале экспоненциальной фазы роста с целью минимизации уровня кислоты в культуральной среде.

[52] Антитело спесолимаб очищают от других рекомбинантных белков, белков клеток-хозяев и загрязнителей в последующем процессе. Образцы, получаемые и/или анализируемые на разных этапах очистки, также называют технологическими контрольными (IPC) образцами или промежуточными образцами процесса. Сбор, как правило, включает центрифугирование и/или фильтрацию для получения собранной клеточной культуральной жидкости. Другие возможные этапы процесса включают аффинную хроматографию, в частности, хроматографию на колонке с белком А, для отделения антитела спесолимаба от примесей. Другие возможные этапы процесса включают кислотную обработку для инактивации вирусов, осветление собранного продукта путем глубинной фильтрации, предпочтительно после кислотной обработки, для удаления загрязняющих клеточных компонентов, таких как белки из клеток-хозяев и ДНК. Другие возможные этапы процесса включают, в следующем порядке или в любом другом порядке, который может быть целесообразным в конкретном случае: ионообменную хроматографию, в частности, анионообменную хроматографию, для дополнительного удаления

загрязняющих клеточных компонентов, и/или катионообменную хроматографию для удаления связанных с продуктом загрязнителей, таких как агрегаты. Кроме того, предпочтительно следующие этапы процесса могут включать нанофильтрацию для дальнейшего удаления вирусов и ультрафильтрацию и диафильтрацию для концентрирования рекомбинантного белка и для обмена буфера, соответственно.

[53] Образец, включающий антитело спесолимаб, очищенное от собранной клеточной культуральной жидкости (НССФ), например, после колонки с белком А, кислотной обработки, глубинной фильтрации, анионообменной хроматографии и/или катионообменной хроматографии, также указывают как “пул очищенного продукта антитела”. Пул очищенного продукта антитела подвергают дальнейшей очистке и необязательно рецептируют со вспомогательными компонентами. Таким образом, пул очищенного продукта антитела может быть идентичен лекарственному веществу, но может присутствовать в другой концентрации и/или в другой буферной системе.

[54] Термин “собранная клеточная культуральная жидкость (НССФ)” в контексте данного описания означает жидкость, включающую собранный рекомбинантный белок, в данном случае антитело спесолимаб. Как правило, клетки-хозяева, используемые для продуцирования, подвергают инженерии для секретирования полипептида в среду для культивирования клеток, и, таким образом, собирают супернатант культуры клеток. Однако теоретически клетки перед сбором также могут быть подвергнуты лизису. Сбор включает центрифугирование и/или фильтрацию для получения собранной клеточной культуральной жидкости. Таким образом, собранную клеточную культуральную жидкость также указывают как осветленную собранную клеточную культуральную жидкость. Она не содержит живых клеток и клеточного дебриса, и клеточные компоненты были удалены. Как правило, речь идет об осветленном супернатанте культуры клеток, причем осветление означает центрифугирование или фильтрацию, предпочтительно фильтрацию, например, при помощи фильтра 0,1 мкм. НССФ в некоторых вариантах осуществления представляет собой очищенную НССФ. В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления НССФ включает от приблизительно 1,8 г/л до приблизительно 5 г/л антитела спесолимаба, предпочтительно от приблизительно 2,0 г/л до приблизительно 5,0 г/л антитела спесолимаба, более предпочтительно от

приблизительно 2,5 г/л до приблизительно 4,5 г/л антитела спесолимаба. Способ в соответствии с настоящим изобретением представляет собой способ крупномасштабной очистки для НССФ, включающий > 20 кг или даже >30 кг спесолимаба, и/или для НССФ из ферментера  $\geq 2000$  л, предпочтительно  $\geq 12\ 000$  л.

[55] Термин “пул продукта” в контексте данного описания означает раствор, включающий продукт, т. е., антитело спесолимаб, в конце этапа процесса. Термин “пул продукта”, таким образом, применяют как синоним термина “пул продукта, включающего антитело”. Он представляет собой элюат или фильтрат, при условии содержания главной фракции продукта. Термин “образец пула продукта”, таким образом, касается образца раствора, включающего антитело спесолимаб, в частности, после одного из этапов в соответствии со способами согласно изобретению.

[56] Антитело спесолимаб продуцируют в линии клеток СНО в большом масштабе, т. е., в масштабе  $\geq 12\ 000$  л. Титр в НССФ составляет от приблизительно 1,8 г/л до приблизительно 5 г/л. Таким образом, процесс в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает исходный материал (НССФ) для очистки, включающий > 20 кг или даже >30 кг спесолимаба.

[57] Термин “загрязняющий” или “загрязнение” в контексте данного описания означает присутствие нежелательного и/или непредусмотренного вещества, такого как белки клеток-хозяев, ДНК клеток-хозяев и/или по меньшей мере один белок или вещество, обладающее гидролитической активностью.

[58] Термин “лекарственное вещество (ЛВ)” означает рецептированный активный фармацевтический ингредиент (АФИ) со вспомогательными компонентами. АФИ обладает терапевтическим эффектом в организме в отличие от вспомогательных компонентов, которые способствуют доставке АФИ. В случае биологических терапевтических средств, рецептированный АФИ со вспомогательными компонентами, как правило означает АФИ в буфере для конечной рецептуры в концентрации, составляющей по меньшей мере наивысшую концентрацию, применяемую в конечной дозированной форме, также называемой лекарственным продуктом.

[59] Термин “лекарственный продукт”, сокращенно указываемый как ЛП, в контексте данного описания означает реализуемую на рынке готовую дозированную форму лекарственного вещества, например, таблетку или капсулу,

или, в случае биопрепаратов, как правило, раствор для инъекций в надлежащем  
 5  
 150 мг/мл в стеклянном шприце.

[60] Антитела, как правило, включают олигосахариды, присоединенные  
 к Asn297 (IgG) C<sub>H</sub>2-домена тяжелой цепи иммуноглобулина. Большинство этих  
 олигосахаридов имеет биантенную структуру. Это означает, что они имеют  
 10  
 коровую структуру (Man(α1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc→Asn) с необязательной  
 связью Fuc(α1-6) на концевом остатке GlcNAc и два внешних плеча (Gal(β1-  
 4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)→Man и Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3)→Man;  
 концевые галактозные (Gal) остатки являются необязательными), соединенные с  
 концевой маннозой коровой структуры (Man = манноза, GlcNAc = N-  
 15  
 ацетилглюкоза, Gal = галактоза, Fuc = фукоза). Концевая галактоза в каждом  
 внешнем плече является необязательной, образуя в результате изоформу G(0),  
 G(1) и G(2), причем изоформа G(2) имеет концевой галактозный остаток на  
 каждом из внешних плеч олигосахаридной структуры, изоформа G(1) имеет  
 только концевой галактозный остаток на любом из связанных (α1-6) или (α1-3)  
 20  
 внешних плеч, и изоформа G(0) не имеет галактозного остатка ни на одном из  
 внешних плеч.

[61] Термины “структура Man5” или “гликоструктура маннозы-5”  
 применяются авторами как синонимы и означают олигоманнозную структуру,  
 связанную с Asn-остатком полипептида, который включает или состоит из пяти  
 маннозных остатков и двух N-ацетилглюкозных коровых остатков, образуя  
 25  
 трехантенную структуру.

[62] Введение гликоструктур в полипептиды, такие как антитела,  
 является посттрансляционной модификацией. Из-за неполного  
 гликозилирования каждая клетка экспрессирует полипептиды, такие как  
 антитела, с характером или профилем гликозилирования, включающим различные  
 30  
 гликоструктуры. Сумму или отдельные гликоструктуры указывают как характер  
 или профиль гликозилирования. Олигосахариды пула очищенного спесолимаба  
 или белка А определяют путем мечения высвобождаемых олигосахаридов 2-  
 аминоксипридином и анализа с применением хроматографии гидрофильного  
 взаимодействия (ЖХГВ-ВЭЖХ), предпочтительно сверхэффективной

жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (ЖХГВ-СВЭЖХ). Профиль хроматографии демонстрирует 6 главных пиков, из которых пик 3 является пиком Man5 (ФИГУРА 5), также указываемым как (Oligo Map Peak 3). Термин “% структур Man5” в контексте данного описания означает относительный процент площади пика (пик 3) от общей суммы площади пиков.

[63] Термин “приблизительно” в контексте данного описания означает колебание в пределах 10 % от указанного значения, например, приблизительно 50 % означает колебание от 45 до 55 %.

[64] Настоящее изобретение обеспечивает способ продуцирования антитела спесолимаба в культуре клеток, включающий (а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для культивирования клеток с использованием подпитываемой культуры, включая (I) посев клеток в культуральной среде и (II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой, причем медь(II) ( $\text{Cu}^{2+}$ ) добавляют к культуральной среде в количестве 0,35 - 1,2 мкМ, а железо добавляют к культуральной среде в количестве 1500 мкМ или более перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева; (б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и (в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток. Предпочтительно  $\text{Cu}^{2+}$  и железо добавляют к культуральной среде перед посевом на этапе (I) и/или в течение 1 дня после посева, более предпочтительно  $\text{Cu}^{2+}$  и железо добавляют к культуральной среде перед посевом на этапе (I) или во время инокуляции (т. е., во время посева клеток). В одном варианте осуществления  $\text{Cu}^{2+}$  и/или железо добавляют к культуральной среде одним или несколькими болюсными добавлениями или непрерывно. Одно или несколько болюсных добавлений включают обеспечение  $\text{Cu}^{2+}$  и/или железа с базальной средой. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления этап (I) включает посев клеток в базальной среде, включающей  $\text{Cu}^{2+}$  в количестве 0,35 - 1,2 мкМ и железо в количестве 1500 мкМ или более. Культуральную среду на этапе (I) также указывают как базальную среду.

[65] Медь добавляют к культуральной среде в количестве 0,35 - 1,2 мкМ, перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней или 1 дня после

посева. Специалисту в данной области станет понятно, что способы добавления меди к культуральной среде не имеют значения, и добавление перед посевом клеток на этапе (I) включает ситуации, когда медь присутствует в культуральной среде согласно этапу (I) или составляет ее часть, и/или добавляется как содержащая медь добавка к готовой смешанной культуральной среде перед посевом на этапе (I). В предпочтительном варианте осуществления  $\text{Cu}^{2+}$  добавляют в количестве 0,4 - 1,0 мкМ, более предпочтительно – 0,5 - 0,8 мкМ, к культуральной среде перед посевом клеток на этапе (I) и/или в течение 2 дней, предпочтительно 1 дня, после посева. Медь(II), как правило, обеспечивают в виде ее соли или гидрата, причем подходящими солями, помимо прочих, являются  $\text{CuSO}_4$  или  $\text{CuCl}_2$ . Предпочтительно медь обеспечивают как  $\text{CuSO}_4$ .

[66] Железо добавляют к культуральной среде в количестве 1500 мкМ или более перед посевом клеток на этапе (I) и/или в течение 2 дней или 1 дня после посева. Специалистам в данной области станет понятно, что способы добавления железа к культуральной среде не имеют значения, и добавление перед посевом клеток на этапе (I) включает ситуации, когда железо присутствует в культуральной среде согласно этапу (I) или составляет ее часть, и/или добавляется как содержащая железо добавка к готовой смешанной культуральной среде перед посевом на этапе (I). В предпочтительном варианте осуществления железо добавляют в количестве 2000 мкМ или более, более предпочтительно – 2500 мкМ или 3000 или более. Железо добавляют в количестве до 10000 мкМ, предпочтительно 5000 мкМ, но, как правило, используют меньшую концентрацию, главным образом, из-за растворимости и осаждения компонентов среды в присутствии высокой концентрации железа, а также из-за возможных проблем, связанных с токсичностью железа в очень высокой концентрации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления концентрация железа составляет от 1500 мкМ до 10 000 мкМ, от 2000 мкМ до 10 000 мкМ, от 2500 мкМ до 10 000 мкМ или от 3000 мкМ до 10 000 мкМ, предпочтительно от 1500 мкМ до 5000 мкМ, от 2000 мкМ до 5000 мкМ, от 2500 мкМ до 5000 мкМ или от 3000 мкМ до 5000 мкМ. Железо, как правило, обеспечивают в форме соли и/или халата из подходящих источников железа, к которым, помимо прочих, относятся пирофосфат железа ( $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ ), железоаммониевый цитрат ( $(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]$ ), цитрат железа ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$ ), холинцитрат железа, нитрат железа (III), фосфат железа, сульфат железа и

хлорид железа. Предпочтительными источниками железа являются цитрат железа, холинцитрат железа и хлорид железа. Другие подходящие источники железа известны специалистам в данной области, и специалистам в данной области станет понятно, что добавление определенных комплексообразователей, таких как цитрат и/или холин, может повышать клеточный захват железа, который может добавляться отдельно от источника железа.

[67] В контексте настоящего изобретения важным является то, что медь и железо добавляют (и/или они присутствуют) в указанной концентрации в начале фазы роста, т. е., перед посевом и/или в течение 2 дней или 1 дня после посева, тогда как концентрация меди и железа в течение культивирования, в частности, в фазе продуцирования, имеет меньшее значение. В частности, благодаря синергетическому влиянию восстановления меди и увеличения железа на содержание PBG и Man5, обеспечивается возможность дальнейшего восстановления или такого же восстановления при слегка повышенной концентрации меди, что позволяет избегать отрицательного влияния слишком низкой концентрации меди.

[68] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, стабильно включают в геном СНО. Способы трансфекции или трансдукции клеток СНО антителом и отбора продуцирующих антитело клонов известны специалистам в данной области.

[69] Способ согласно изобретению включает подпитку клеток питательной средой. В некоторых вариантах осуществления питательную среду добавляют, начиная с 0-го дня по 3-й день культивирования, предпочтительно начиная с 1-го по 3-й день, более предпочтительно – начиная с 1-го по 2-й день, еще более предпочтительно – начиная в 1-й день. Хотя это и не существенно, питательная среда также может включать ионы  $\text{Cu}^{2+}$ . Например, питательная среда может добавлять ионы  $\text{Cu}^{2+}$  в количестве менее 15 нМ, менее 12 нМ, менее 10 нМ в день, предпочтительно менее 7 нМ в день, более предпочтительно – менее 6 нМ в день. Питательная среда также может включать ионы железа. Например, питательная среда может добавлять до 100 мкМ железа в день, предпочтительно до 50 мкМ, 40 мкМ, 30 мкМ или 20 мкМ железа в день. Питательная среда также может включать ионы  $\text{Cu}^{2+}$  и железа в указанной концентрации. Питательную среду, используемую в соответствии со способами согласно изобретению, добавляют к клеткам, культивируемым в базальной среде

для культивирования клеток, причем (а) питательную среду добавляют в количестве приблизительно 10 - 50 мл/л/день, предпочтительно 20 - 35 мл/л/день, на основе изначального объема культуры, (б) питательную среду добавляют, начиная с 0-го, 1-го, 2-го или 3-го дня, и/или (в) питательную среду добавляют непрерывно или в виде болюса несколько раз в день, два раза в день, раз в день, через день или через два дня.

[70] Согласно способу в соответствии с изобретением, повышенная концентрация железа и/или сниженная концентрация меди в культуральной среде в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % BPG. Термин “сниженный % BPG” в данном контексте следует понимать как показатель относительно ситуации, когда антитело спесолимаб продуцируют таким же способом с применением меньшей концентрации железа и/или большей концентрации меди, либо в пределах диапазона в соответствии со способом согласно изобретению, либо относительно того же способа с применением концентрации железа ниже указанного диапазона и/или концентрации меди выше указанного заявленного диапазона. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело спесолимаб, продуцируемое согласно способу в соответствии с изобретением, имеет  $\leq 7,5$  % BPG, предпочтительно  $\leq 7$  % BPG, более предпочтительно  $\leq 6,5$  % BPG, еще более предпочтительно –  $\leq 6$  % BPG. В соответствии с настоящим изобретением, повышение концентрации железа снижает % BPG и, таким образом, может компенсировать слегка повышенную концентрацию меди, которая не может быть еще больше снижена с учетом других аспектов.

[71] Таким образом, изобретение также касается способа снижения % BPG антитела спесолимаба, включающего (а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для культивирования клеток с использованием подпитываемой культуры, включая (I) посев клеток в культуральной среде и (II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой, причем % BPG снижают путем снижения концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  и повышения концентрации железа, обеспечиваемого в культуральной среде перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева, причем концентрация меди, обеспечиваемая в

культуральной среде, составляет 0,35 - 1,2 мкМ, а концентрация железа, обеспечиваемая в культуральной среде, составляет 1500 мкМ или более; (б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и (в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток.

5 Предпочтительно  $\text{Cu}^{2+}$  и железо добавляют к культуральной среде перед посевом на этапе (I) и/или в течение 1 дня после посева, более предпочтительно  $\text{Cu}^{2+}$  и железо добавляют к культуральной среде перед посевом на этапе (I) или во время инокуляции (т. е., во время посева клеток). В одном варианте осуществления  $\text{Cu}^{2+}$  и/или железо добавляют к культуральной среде одним или

10 несколькими болюсными добавлениями или непрерывно. Одно или несколько болюсных добавлений включают обеспечение  $\text{Cu}^{2+}$  и/или железа с базальной средой. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления этап (I) включает посев клеток в базальной среде, включающей  $\text{Cu}^{2+}$  в количестве 0,35 - 1,2 мкМ и железо в количестве 1500 мкМ или более. Термин “сниженный % ВРГ” в данном

15 контексте следует понимать как показатель относительно ситуации, когда антитело спесолимаб продуцируют таким же способом с применением меньшей концентрации железа и/или большей концентрации меди, либо в пределах диапазона в соответствии со способом согласно изобретению, либо относительно того же способа с применением концентрации железа ниже

20 указанного диапазона и/или концентрации меди выше указанного заявленного диапазона. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело спесолимаб, продуцируемое согласно способу в соответствии с изобретением, имеет  $\leq 7,5$  % ВРГ, предпочтительно  $\leq 7$  % ВРГ, более предпочтительно  $\leq 6,5$  % ВРГ, еще более предпочтительно –  $\leq 6$  % ВРГ.

25 [72] Термин “% группа основного пика (ВРГ)” в контексте данного описания означает относительный процент площади пика от общей суммы площади пиков, как определяют путем катионообменной хроматографии (КОХ) на ВЭЖХ-хроматограмме профиля спесолимаба (относительный процент общего антитела). Термин “ВРГ” также указывают как основные виды или основные

30 варианты антитела спесолимаба.

[73] ВРГ определяют с применением катионообменной хроматографии (КОХ-ВЭЖХ). Более конкретно, основные виды соответствуют пику, который элюируется позже, чем главный пик на ВЭЖХ-хроматограмме профиля спесолимаба. В одном варианте осуществления ВЭЖХ-хроматограмму

генерируют с использованием первой мобильной фазы 10 мМ MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоты, 4-морфолинпропансульфоновой кислоты) (рН 7,6) и второй мобильной фазы 10 мМ MOPS, 100 мМ хлорида калия (рН 7,6), причем ВЭЖХ-хроматограмму генерируют, применяя обнаружение при 280 нм.

[74] Уровень ВРГ главным образом определяют с применением предшествующих процессов, и он в очень слабой мере зависит от последующих процессов. Таким образом, значения % ВРГ в НССФ спесолимаба очень подобны значениям % ВРГ в лекарственном веществе. В этом состоит отличие, например, от высокомолекулярных видов (НМВ) или низкомолекулярных видов (ЛМВ), которые обычно сокращаются в последующем процессе.

[75] Способы согласно изобретению также могут включать выбор плотности посева. Повышенная плотность посева в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % ВРГ и/или % структур Man5. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления плотность посева на этапе (А) составляет  $\geq 0,7 \times 10^6$  клеток/мл, предпочтительно от  $0,7 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, более предпочтительно от  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, еще более предпочтительно – от  $0,9 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,3 \times 10^6$  клеток/мл). Термин “сниженный % ВРГ и/или % структур Man5” в данном контексте следует понимать как показатель относительно ситуации, когда антитело спесолимаб продуцируют таким же способом с применением меньшей плотности посева, либо в пределах диапазона в соответствии со способом согласно изобретению, либо относительно того же способа с применением плотности посева ниже указанного диапазона.

[76] Способы согласно изобретению также могут включать выбор температуры культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют при температуре от 36,0 °С до 37,5 °С в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб, включая подпитывание клеток питательной средой. Предпочтительно температура культивирования составляет от 36,0 °С до 37,3 °С или от 36,5 °С до 37,0 °С. Способ также может включать выбор концентрации растворенного кислорода (DO). В некоторых вариантах осуществления концентрацию растворенного кислорода (DO) в вышеупомянутой культуре поддерживают в пределах 30 - 60 %, предпочтительно в пределах 40 - 50 %, более предпочтительно – в пределах 40 - 45 %. Повышение температуры

культивирования и/или снижение растворенного кислорода в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % ВРГ и/или сниженный % структур Man5. Термин “сниженный % ВРГ” и/или “сниженный % структур Man5” в данном контексте следует понимать как показатель относительно ситуации, когда антитело спесолимаб продуцируют таким же способом с применением более низкой температуры культивирования и/или более высокой концентрации DO, либо в пределах заявленного диапазона в соответствии со способом согласно изобретению, либо относительно того же способа с применением температуры культивирования ниже указанного диапазона или концентрации растворенного кислорода выше указанного диапазона. В некоторых вариантах осуществления антитело спесолимаб имеет менее 5 % структур Man5, предпочтительно менее 4 % структур Man5, более предпочтительно – менее 3 % структур Man5, и/или  $\leq 7,5$  % ВРГ, предпочтительно  $\leq 7$  % ВРГ, более предпочтительно 6,5 % ВРГ, еще более предпочтительно –  $\leq 6$  % ВРГ. Температура культивирования также может зависеть от используемой линии клеток. Например, клетки СНО-К1 обычно имеют оптимальную температуру культивирования, более низкую (например, 33 - 36 °С) по сравнению с СНО-DG44, причем оптимальная температура культивирования составляет приблизительно 36,0 - 37,5 °С, предпочтительно от 36,5 до 37,0 °С.

[77] Термин “% структур Man5” в контексте данного описания означает % площади пика Маннозы-5 (пик 3) относительно суммы или общей площади всех пиков гликозилирования (на Фигуре 5), как определяют при помощи хроматографии гидрофильного взаимодействия (ЖХГВ-ВЭЖХ), предпочтительно сверхэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (ЖХГВ-СВЭЖХ). Структуры Man5 представлены как % площади пика 3.

[78] Высокоманнозные структуры, в частности, Структуры Man5, определяют с применением хроматографии гидрофильного взаимодействия (ЖХГВ), предпочтительно сверхэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (ЖХГВ-СВЭЖХ). В одном варианте осуществления фракцию Man5 определяют после ферментативного высвобождения олигосахаридов N-гликозидазой F (ПНГаза F) и мечения 2-аминобензамидом (2-АВ) с применением ЖХГВ-СВЭЖХ.

[79] Подобно уровню BPG, уровень высокоманнозных структур, в частности, структур Man5, главным образом определяют с применением предшествующих процессов, и он в очень слабой мере зависит от последующих процессов. Таким образом, процентные значения структур Man5 в НССФ спесолимаба подобны проценту структур Man5 в лекарственном веществе. В этом состоит отличие, например, от высокомолекулярных видов (НМВ) или низкомолекулярных видов (LMW), которые, как правило, сокращаются в последующем процессе.

[80] Клетка млекопитающего, применяемая в соответствии со способом согласно изобретению, является клеткой яичника китайского хомячка (CHO), такой как клетка CHO-K1, клетка CHO-DG44, клетка DuxB11 или клетка CHO с дефицитом GS, предпочтительно CHO-DG44 или CHO-K1. Клетки CHO, обеспечивающие возможность процессов эффективного развития линии клеток, подвергают метаболической инженерии, например, путем нокаута глутаминсинтетазы (GS) и/или нокаута дигидрофолатредуктазы (DHFR) для облегчения отбора с применением метионинсульфоксимиона (MSX) или метотрексата, соответственно. Клетки CHO, используемые в соответствии со способом согласно изобретению, включают CHO-K1, CHO-DXB11 (также известные как CHO-DUKX или DuxB11), CHO-DUKX B1, CHO-S, CHO-DG44 и клетки CHO с дефицитом глутаминсинтетазы (GS) или производные/потомство любых из этих линий клеток. Предпочтение отдают линиям клеток CHO-DG44, CHO-DUKX, CHO-K1, CHO-S и CHO-DG44 с дефицитом GS, причем особенно предпочтительными являются клетки CHO-DG44 и CHO-K1, еще более предпочтительными – клетки CHO-DG44. В соответствии с настоящим изобретением клетки CHO культивируют как суспензионные клетки. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих, которые используют со средами согласно настоящему изобретению, представлены в Таблице 1.

**Таблица 1:** Примеры подходящих линий продуцирующих клеток млекопитающих

Линия клеток	Идентификационный номер / источник
CHO	ECACC No. 8505302
CHO дикого типа	ECACC 00102307
CHO-DUKX (= CHO duk <sup>-</sup> , CHO/dhfr <sup>-</sup> )	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B11	ATCC CRL-9010

Линия клеток	Идентификационный номер / источник
CHO-DG44	Urlaub et al., Cell 33 (2), 405 – 412, 1983; Life Technologies A1097101
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
CHO-S	Life Technologies A1136401; CHO-S, производные от варианта CHO, Tobey et al. 1962
CHO-K1	ATCC CCL-61, ECACC 85051005
CHO-K1/SF	ECACC 93061607
CHO-K1 GS	Клетки с дефицитом глутаминсинтетазы (GS), производные от CHO-K1
CHOZN GS	Клетки с дефицитом GS, производные от CHO-K1 (SAFC ECACC 85051005)

[81] Вышеупомянутые продуцирующие клетки CHO предпочтительно культивируют в условиях, обеспечивающих возможность пролиферации клеток. Кроме того, вышеупомянутые продуцирующие клетки CHO предпочтительно культивируют в условиях, благоприятных для экспрессии антитела спесолимаба. Антитело спесолимаб затем выделяют из клеток и/или супернатанта культуры клеток. Предпочтительно антитело спесолимаб извлекают из культуральной среды как секретированный полипептид.

[82] Антитело спесолимаб очищают от НССФ, других рекомбинантных белков, белков клеток-хозяев и загрязнителей в последующем процессе. Образцы, полученные и/или анализируемые на разных этапах очистки, также называют технологическими контрольными (IPC) образцами или промежуточными образцами процесса. Сбор, как правило, включает центрифугирование и/или фильтрацию для продуцирования собранной клеточной культуральной жидкости. Таким образом, собранную клеточную культуральную жидкость также указывают как осветленную собранную клеточную культуральную жидкость. Она не содержит живых клеток и клеточного дебриса, и большинство компонентов клеток также были удалены. Осветление, как правило, означает центрифугирование или фильтрацию, предпочтительно фильтрацию. Другие возможные этапы процесса включают аффинную хроматографию, в частности, хроматографию на колонке с белком А, для отделения антитела спесолимаба от загрязнителей. Другие возможные этапы процесса включают кислотную обработку для инактивации вирусов, осветление собранного продукта путем глубинной фильтрации, предпочтительно после кислотной обработки, для удаления загрязняющих клеточных компонентов, таких как белки из клеток-хозяев и ДНК. Другие возможные этапы процесса

включают в следующем порядке или в любом другом порядке, который может быть целесообразным в конкретном случае: ионообменную хроматографию, в частности, анионообменную хроматографию, для дополнительного удаления загрязняющих клеточных компонентов, и/или катионообменную хроматографию для удаления связанных с продуктом загрязнителей, таких как агрегаты. Кроме того, предпочтительно следующие этапы процесса могут включать нанофильтрацию для дальнейшего удаления вирусов и ультрафильтрацию и диафильтрацию для концентрирования рекомбинантного белка и для обмена буфера, соответственно.

10 [83] Образец, включающий антитело спесолимаб, очищенное от НССФ, например, после колонки с белком А, кислотной обработки, глубинной фильтрации, анионообменной хроматографии и/или катионообменной хроматографии, также указывают как “пул очищенного продукта антитела”. Пул очищенного продукта антитела подвергают дальнейшей очистке и необязательно рецептируют со вспомогательными компонентами. Таким образом, пул очищенного продукта антитела может быть идентичен лекарственному веществу, но может присутствовать в другой концентрации и/или в другой буферной системе.

20 [84] В еще одном аспекте обеспечивается способ продуцирования антитела спесолимаба в культуре клеток, который включает (а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для культивирования клеток с использованием подпитываемой культуры, включая (I) посев клеток в культуральной среде с плотностью посева  $\geq 0,7 \times 10^6$  клеток/мл и (II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой, причем к культуральной среде необязательно добавляют  $\text{Cu}^{2+}$  в количестве 0,35 - 1,2 мкМ и железо в количестве 1500 мкМ или более перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева; (б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и (в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток. Повышенная плотность посева в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % ВРГ и/или % структур Man5. В некоторых вариантах

осуществления плотность посева на этапе (а) составляет  $0,7 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, более предпочтительно от  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, еще более предпочтительно – от  $0,9 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,3 \times 10^6$  клеток/мл. Термин “сниженный % ВРГ и/или % структур Man5” в данном контексте следует понимать как показатель относительно ситуации, когда антитело спесолимаб продуцируют таким же способом с применением меньшей плотности посева, необязательно в пределах диапазона в соответствии со способом согласно изобретению, либо относительно того же способа с применением плотности посева ниже указанного диапазона и необязательно относительно того же способа с применением меньшей концентрации железа и/или большей концентрации меди, либо в пределах диапазона в соответствии со способом согласно изобретению, либо относительно того же способа с применением концентрации железа ниже указанного диапазона и/или концентрации меди выше указанного заявленного диапазона. Варианты осуществления и модификации или варианты раскрытия с учетом вышеуказанного аспекта подобным образом относятся к способу в соответствии с этим аспектом. Повышение температуры культивирования может дополнительно снижать ВРГ и/или структуры Man5. Конкретная температура культивирования зависит от используемых клеток СНО и предпочтительно составляет от  $36,0 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , но может составлять и  $33 - 36 \text{ }^\circ\text{C}$  для других клеток СНО. Кроме того, снижение растворенного кислорода (поддержание  $dO_2$  на уровне от 30 до 60 %) также способно снижать ВРГ и/или структуры Man5. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления повышение температуры культивирования и/или снижение растворенного кислорода в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % ВРГ и/или % структур Man5. В предпочтительных вариантах осуществления продуцируемое антитело спесолимаб имеет менее 5 % структур Man5, предпочтительно менее 4 % структур Man5, более предпочтительно – менее 3 % структур Man5 и/или  $\leq 7,5$  % ВРГ, предпочтительно  $\leq 6,5$  % ВРГ.

[85] В еще одном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую антитело спесолимаб, причем антитело спесолимаб получают согласно способу в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления композиция включает антитело спесолимаб, имеющее (а)  $\leq 7,5$  % ВРГ, предпочтительно  $\leq 7$  % ВРГ, более предпочтительно  $\leq 6,5$  %

ВРG, еще более предпочтительно –  $\leq 6\%$  ВРG менее  $7\%$  ВРG, предпочтительно менее  $6\%$  ВРG; и/или (б) менее  $5\%$  структур Man5, предпочтительно менее  $4\%$  структур Man5, более предпочтительно – менее  $3\%$  структур Man5, предпочтительно менее  $2\%$  структур Man5. В возможных вариантах композиция представляет собой собранную клеточную культуральную жидкость (НССF), аффинно-связанный пул, лекарственное вещество или лекарственный продукт. Предпочтительно композиция является лекарственным веществом или лекарственным продуктом.

[86] В еще одном аспекте обеспечивается композиция, включающая антитело спесолимаб, имеющее (а)  $\leq 7,5\%$  ВРG, предпочтительно  $\leq 7\%$  ВРG, более предпочтительно  $\leq 6,5\%$  ВРG, еще более предпочтительно –  $\leq 6\%$  ВРG; и/или (б) менее  $5\%$  структур Man5, предпочтительно менее  $4\%$  структур Man5, более предпочтительно – менее  $3\%$  структур Man5, предпочтительно менее  $2\%$  структур Man5. В возможных вариантах композиция представляет собой собранную клеточную культуральную жидкость (НССF), аффинно-связанный пул, лекарственное вещество или лекарственный продукт. Предпочтительно композиция является лекарственным веществом или лекарственным продуктом.

[87] Антитело спесолимаб в композициях согласно изобретению также характеризуется низким общим гликированием, в частности, отсутствием гликирования в ключевых лизинах, т. е., лизинах, расположенных поблизости от CDR антитела, например, в пределах 3-х аминокислот от CDR. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело спесолимаб имеет  $\leq 6\%$  гликированных вариантов лизина тяжелой цепи (НС), предпочтительно  $\leq 3\%$  гликированных вариантов лизина НС, и/или лизины К38 и К67 тяжелой цепи (НС) не являются гликированными, и гликирование в К23 составляет  $\leq 0,3\%$ . В некоторых вариантах осуществления антитело спесолимаб также имеет  $\leq 2\%$  гликированных вариантов лизина легкой цепи (LC), предпочтительно  $\leq 1\%$  гликированных вариантов лизина легкой цепи (LC). Образовавшиеся в результате LC и дегликозилированную НС разделяли путем высокоэффективной хроматографии с обращением фаз (ОФ-ВЭЖХ) и анализировали онлайн при помощи ИЭР Q-TOF MS (Xevo G2 Q-TOF). Белковые субъединицы и соответствующие глюкозные аддукты (добавление М-глюкозы = 162 Да) анализируют и полученные спектры подвергают деконволюции с применением алгоритма MaxEnt™.

[88] Термин “% гликированных вариантов лизина тяжелой цепи” в контексте данного описания означает процент гликированной тяжелой цепи (НС + глюкоза) от всей тяжелой цепи (гликированной и негликированной НС). Термин “ % гликированных вариантов лизина легкой цепи” в контексте данного описания означает процент гликированной легкой цепи (LC + глюкоза) от всей легкой цепи (гликированной и негликированной LC). Гликированные и негликированные варианты лизина LC и/или НС определяют путем разделения восстановленных и дегликозилированных (таких как обработанные N-гликозидазой F) LC и НС путем высокоэффективной хроматографии с обращением фаз (ОФ-ВЭЖХ) и анализа путем ИЭР Q-TOF МС.

[89] Гликирование отдельных лизинов анализируют в расщепленных химотрипсином пептидах после денатурации и алкилирования спесолимаба йодуксусной кислотой путем жидкостной хроматографии с обращением фаз (ЖХ/МС) и ИЭР-МС. Относительное количество гликированных пептидов определяют на основе экстрагированных ионных хроматограмм пептидов дикого типа и пептидов, несущих глюкозный аддукт (+ 162 Да).

[90] Кроме того, обеспечивается композиция, включающая антитело спесолимаб, которое включает  $\leq 6$  % гликированных вариантов лизина НС, предпочтительно  $\leq 3$  % гликированных вариантов лизина НС, и/или лизины K38 (НС) и K67 (НС) не являются гликированными, и гликирование в K23 (НС) составляет  $\leq 0,3$  %. В некоторых вариантах осуществления антитело спесолимаб также имеет  $\leq 2$  % гликированных вариантов лизина легкой цепи (LC), предпочтительно  $\leq 1$  % гликированных вариантов лизина легкой цепи (LC).

[91] Также обеспечивается композиция, включающая антитело спесолимаб, которое включает субфракции APG AP4 в количестве менее 1 % и фракции AP3 в количестве менее 4 %, в частности, AP4 в количестве менее 1 % и фракции AP3b в количестве менее 1 %.

С учетом вышеизложенного, следует понимать, что изобретение также охватывает следующие пункты:

1. Способ продуцирования антитела спесолимаба в культуре клеток, включающий

(а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для культивирования клеток с использованием подпитываемой культуры, включая

(I) посев клеток в культуральной среде и

(II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой,

5       причем  $\text{Cu}^{2+}$  добавляют к культуральной среде в количестве 0,35 - 1,2 мкМ, а железо добавляют в количестве 1500 мкМ или более перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева;

(б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и

10       (в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток.

2.       Способ снижения % ВРГ антитела спесолимаба, включающий

(а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для  
15       культивирования клеток с использованием подпитываемой культуры, включая

(I) посев клеток в культуральной среде и

(II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой,

20       причем % ВРГ снижают путем снижения  $\text{Cu}^{2+}$  концентрации и повышения концентрации железа, обеспечиваемого в культуральной среде перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева, причем концентрация меди, обеспечиваемая в культуральной среде, составляет 0,35 - 1,2 мкМ, а концентрация железа, обеспечиваемая в культуральной среде, составляет  
25       1500 мкМ или более;

(б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и

(в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток.

30       3.       Способ по пункту 1 или 2, причем  $\text{Cu}^{2+}$  и железо добавляют к культуральной среде перед посевом на этапе (I) и/или в течение 1 дня после посева.

4. Способ по одному из пунктов с 1 по 3, причем  $\text{Cu}^{2+}$  и железо добавляют к культуральной среде одним или несколькими болюсными добавлениями или непрерывно.

5 5. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, стабильно включают в геном СНО.

6. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем питательную среду добавляют, начиная с 0-го дня по 3-й день культивирования.

10 7. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем необязательно с питательной средой добавляют менее 15 нМ  $\text{Cu}^{2+}$  в день и/или до 100 мкМ железа.

8. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем повышенная концентрация железа и/или сниженная концентрация меди в культуральной среде в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % ВРГ.

15 9. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем антитело спесолимаб имеет  $\leq 7,5$  % ВРГ, предпочтительно  $\leq 7$  % ВРГ, более предпочтительно  $\leq 6,5$  % ВРГ, еще более предпочтительно –  $\leq 6$  % ВРГ.

10. Способ по пункту 8, причем ВРГ определяют с применением катионообменной хроматографии (КОХ-ВЭЖХ).

20 11. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем плотность посева на этапе (а) составляет  $\geq 0,7 \times 10^6$  клеток/мл, предпочтительно  $0,7 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, более предпочтительно от  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, еще более предпочтительно – от  $0,9 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,3 \times 10^6$  клеток/мл.

25 12. Способ продуцирования антитела спесолимаба в культуре клеток, включающий

(а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для культивирования клеток с использованием подпитываемой культуры, включая

30 (I) посев клеток в культуральной среде с плотностью посева  $\geq 0,7 \times 10^6$  клеток/мл и

(II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой,

причем к культуральной среде необязательно добавляют  $\text{Cu}^{2+}$  в количестве 0,35 - 1,2 мкМ и железо в количестве 1500 мкМ или более перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева;

5 (б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и

(в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток.

10 13. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем повышенная плотность посева в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % ВРГ и/или % структур Man5.

15 14. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем клетки культивируют при температуре от 36,0 °С до 37,5 °С в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб, включая подпитывание клеток питательной средой, и/или концентрацию растворенного кислорода (DO) в вышеупомянутой культуре поддерживают в пределах 30 - 60 %.

15 15. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем повышение температуры культивирования и/или снижение растворенного кислорода в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % ВРГ и/или % структур Man5.

20 16. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем антитело спесолимаб имеет менее 5 % структур Man5, предпочтительно менее 4 % структур Man5, более предпочтительно – менее 3 % структур Man5, и/или  $\leq 7,5$  % ВРГ, предпочтительно  $\leq 6,5$  % ВРГ.

25 17. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем клетка СНО является клеткой СНО-К1 или СНО-DG44

18. Композиция, включающая антитело спесолимаб, имеющее

(а)  $\leq 7,5$  % ВРГ, предпочтительно  $\leq 7$  % ВРГ, более предпочтительно  $\leq 6,5$  % ВРГ, еще более предпочтительно –  $\leq 6$  % ВРГ; и/или

30 (б) менее 5 % структур Man5, предпочтительно менее 4 % структур Man5, более предпочтительно – менее 3 % структур Man5.

19. Композиция, включающая антитело спесолимаб, причем антитело спесолимаб получают с применением способа по одному из пунктов 1 - 17.

20. Композиция по пункту 18 или 19, причем композиция представляет собой собранную клеточную культуральную жидкость (HCCF), аффинно-

связанный пул, лекарственное вещество или лекарственный продукт, предпочтительно лекарственное вещество или лекарственный продукт.

21. Композиция по одному из пунктов с 18 по 20, причем композиция представляет собой лекарственный продукт, включающий антитело спесолимаб, имеющее менее 7,5 % ВРG и/или менее 5 % структур Man5.

22. Композиция по одному из пунктов с 18 по 21, причем антитело спесолимаб включает  $\leq 6$  % гликированных вариантов лизина тяжелой цепи (НС), и/или лизины K38 (НС) и K67 (НС) не являются гликированными, и гликирование в K23 (НС) составляет  $\leq 0,3$  %.

23. Композиция, включающая антитело спесолимаб, которое включает  $\leq 6$  % гликированных вариантов лизина тяжелой цепи (НС), и/или лизины K38 (НС) и K67 (НС) не являются гликированными, и гликирование в K23 (НС) составляет  $\leq 0,3$  %.

24. Композиция, включающая антитело спесолимаб, которое включает субфракции APG AP4 в количестве менее 1 % и фракции AP3 в количестве менее 4 %, в частности, AP4 в количестве менее 1 % и фракции AP3b в количестве менее 1 %.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Линии клеток**

[92] Линии клеток CHO (CHO-DG44) адаптировали к условиям бессывороточных сред и дополнительно трансфицировали ДНК для продуцирования рекомбинантного mAb спесолимаба. В частности, использовали полученные от VI HEX (Boehringer-Ingelheim High Expression) производные от CHO-DG44 линии клеток CHO, которые были независимо адаптированы к бессывороточным средам (под названием HEX II). Эти клетки имели дефицит DHFR (дигидрофолатредуктазы), и в качестве селективного маркера использовали метотрексат.

### **Аналитические способы**

[93] Концентрацию клеток и жизнеспособность клеток определяли способом вытеснения трипанового синего с применением автоматического анализатора клеток CEDEX Hires (версия 2.2.3) (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия). Концентрацию продуцируемого рекомбинантного mAb в среде определяли при помощи анализатора Konelab 60i (Thermo Scientific, Dreieich, Германия) на основе фотометрических способов. Инструмент Konelab 60i также

применяли для определения количества метаболитов, таких как глюкоза, молочная кислота (лактат), глутамин, глутамат и аммоний, в супернатантах культур клеток. Профили осмолярности анализировали при помощи автоматического устройства осмомат (Gonotec GmbH, Берлин, Германия). Этот способ основывается на криоскопической точке замерзания конкретного раствора, которая пропорциональна количеству растворенных частиц. Растворенный диоксид углерода  $pCO_2$ , растворенный кислород  $pO_2$  и уровень pH определяли ежедневно при помощи анализатора газов крови Rapidlab 248/348 (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Германия). Эти инструменты и необходимые способы хорошо известны специалистам в данной области, и их применяют для наблюдения за процессом и контроля разработки биофармацевтического процесса и производства.

#### Периодический режим и режим подпитки

[94] Для продуцирования антител процессы подпитки, как правило, применяют на конечной стадии продуцирования, тогда как периодическое культивирование обычно выполняют на стадиях размножения клеток перед конечной стадией продуцирования. Серию периодических культур называют системой посевных ферментеров во время размножения клеток, то есть, клетки на каждом этапе размножения переносят в резервуар для культивирования с большим объемом культивирования. Периодические процессы в конечной стадии продуцирования в результате, как правило, не дают высокой производительности и, таким образом, их редко применяют для производства рекомбинантных белков. В процессах с подпиткой концентрированную питательную среду добавляют во время культивирования в качестве компенсации для пополнения питательных веществ со свежей средой. Эти процессы позволяют достигать более высокой производительности и, таким образом, их применяют преимущественно в производстве рекомбинантных белков. В отличие от периодического режима, пополнение питательных веществ путем добавления концентрированной питательной среды также снижает ингибирование роста клеток нежелательными побочными продуктами обмена веществ, такими как лактат или аммоний. Как правило, процессы подпитки начинают с объема, значительно меньшего максимальной емкости смесительного бака, для возможности добавления концентрированных растворов

питательных веществ в течение времени культивирования в биореакторе. Подпитываемое культивирование осуществляли в течение 14 дней.

#### Культивирование в биореакторе

[95] Эксперименты в биореакторе выполняли в контролируемой системе из 48 минибиореакторов с максимальным объемом 15 мл (биореакторная система AMBR 15) или в контролируемой системе из 24 минибиореакторов с номинальным объемом 250 мл (биореакторная система AMBR 250) с применением собственной базальной и питательной среды. Полностью контролируемые биореакторы функционировали в режиме подпитки. Концентрированный подпитывающий раствор непрерывно добавляли при помощи подпиточного насоса, начиная с 1-го дня культивирования, с интенсивностью подпитывания 33 мл/л/д, или варьировали в ходе эксперимента (в зависимости от изначального объема культуры) согласно указанию. Плотность посева устанавливали на  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл или варьировали в ходе эксперимента согласно указанию. Концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне 60 % или варьировали в ходе эксперимента согласно указанию. Размножение клеток в более длительных временных рамках осуществляли в соответствии со стандартным протоколом системы посевных ферментеров для роста клеток и расщепления культур с целью обеспечения фенотипической стабильности. Эта процедура гарантирует совместимость между различными экспериментальными условиями в разные моменты времени. Стандартный формат процесса состоит из диапазона pH 7,10 - 6,95 (+/- 0,25) и неизменной скорости перемешивания от 1000 до 1150 об/мин в системе из 48 минибиореакторов и неизменной скорости перемешивания 614 об/мин в системе из 24 минибиореакторов. Температуру поддерживали на уровне 36,5 С или варьировали в ходе эксперимента. Глюкозу подавали по мере потребности для поддержания фактической концентрации глюкозы 2 - 4 г/л в течение периода культивирования. Описанные выше аналитические способы применяли для определения основных параметров культивирования, таких как число клеток, жизнеспособность клеток и концентрация основного углеродного метаболита, для обеспечения идеального поступления питательных веществ в культуру клеток. В биореакторных системах pH и pO<sub>2</sub> контролировали онлайн. Параметры автономных процессов и заданные значения полностью контролировали при помощи контрольной программы с применением автоматизированной системы с

замкнутым контуром, например, для контролирования уровня рН, добавления питательных веществ, температуры, перемешивания и подачи газа. Этот процесс культивирования успешно поддавался масштабированию, и масштаб увеличивали до 2000 и 12000 л.

5        Обнаружение вариантов заряда

10        [96] Катионообменная хроматография (КОХ-ВЭЖХ) позволяет разделять белки и популяции белков по их электрическому заряду, поскольку содержание солей в градиенте возрастает при неизменном рН. В зависимости от их функциональных групп и их микрогетерогенности, белки могут нести либо

15        положительный, либо отрицательный заряд. В КОХ-ВЭЖХ используют эти зависимые от рН заряды для содействия разделению различных белков / модификаций белков.

20        [97] Приготавливали образцы, имеющие концентрацию антитела приблизительно 1 мг/мл в мобильной фазе А, и анализировали при помощи системы ВЭЖХ с градиентным элюированием, автодозатора с контролем температуры и УФ-детектора с применением колонки для ВЭЖХ MAbPac SCX-10, 4 x 250 нм, 10 мкм. ВЭЖХ хроматограмму генерируют с использованием

25        первой мобильной фазы (элюента А) 10 mM MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоты, 4-морфолинпропансульфоновой

30        кислоты) (рН 7,6) и второй мобильной фазы (элюента В) 10 mM MOPS, 100 mM хлорида калия (рН 7,6). Элюирование выполняли путем применения 40-минутного линейного градиента от 15 % до 85 % элюента А при скорости потока 0,8 мл/мин. Обнаружение осуществляли в УФ-детекторе с длиной волны 280 нм.

35        [98] APG (группу кислотного пика), главный пик и BPG (группу основного пика) разделяли путем расщепления с использованием непрерывной исходной линии. Область интеграции начинается приблизительно через 2 мин и заканчивается приблизительно через 44 мин. Группу кислотного пика дополнительно разделяют на 7 подвидов, элюируя в следующем порядке от

40        главного пика. AP1 (a,b,c), AP2, AP3 (a,b) и AP4 со следующими значениями времени удержания (Таблица 2). Интеграцию отдельных пиков расщепляли с применением указанных ниже значений времени удержания, тогда как главный пик является эталонным пиком. Интеграцию осуществляли в соответствии с эталонной хроматограммой, показанной на Фигуре 4А - В

**Таблица 2: Пример начальных условий интеграции и расщепления для****кислотных пиков**

<b>Пики</b>	<b>RT (мин)</b>
AP4	16,0 - 18,7
AP3b	18,7 - 20,6
AP3a	20,6 - 22,7
AP2	22,7 - 24,1
AP1c	24,1 - 26,0
AP1b	26,0 - 27,3
AP1a	27,3 - 28,2
MP	28,2 - 30,2
BP1	30,2 - 31,7
BP2	31,7 - 33,5
BP3	33,5 - 36,2

**Обнаружение вариантов гликозилирования**

- 5 [99] Образец для анализа и эталонный стандарт приготавливали в двух  
экземплярах с использованием 0,2 мг белка на образец. Олигосахариды  
ферментативно высвобождали из образца / эталонного стандарта при помощи  
ПНГазы F (NEB P0704L, в соответствии с инструкциями производителя) и  
метили 2-аминобензамидом (2-AB (Ludger; LT-KAB-A2) в соответствии с  
10 инструкциями производителя). Очищенную воду использовали как холостой  
контроль и приготавливали параллельно с образцами / эталонным стандартом.  
Меченые олигосахариды анализировали с применением СВЭЖХ (например,  
Nexera, Fa. Shimadzu))) с колонкой ЖХГВ (колонка Glycan VEN Amide, 130Å, 1,7  
мкм, 2,1 мм × 150 мм) и детектором флуоресценции (FLD). Этот способ  
15 применяли для определения олигосахаридного профиля (олигосахаридной  
карты) и для определения количества олигосахаридных структур пула  
лекарственного вещества спесолимаба или белка А. После высвобождения N-  
гликана и 2-AB-мечения аликвоты очищали с применением аминопропиловых  
картриджей (например, SepPak; Waters; WAT020840 с применением вакуумной  
20 камеры или автоматизированной системы твердофазной экстракции.  
Элюированные фракции высушивали при помощи испарителя и  
ресуспендировали в 80 мкл перед анализом путем ВЭЖХ с применением  
скорости потока 0,7 мл/мин и FL-детектора длины волны (длина волны  
затухания 330 нм; длина волны излучения 420 нм) мобильной фазы А (0,05 М  
25 формата аммония, рН 4,5 / 50 % ацетонитрила (ACN)) и мобильной фазы В:  
ацетонитрил степени чистоты для ВЭЖХ (ACN)) со следующим градиентом.

Элюирование выполняли с 25-минутным линейным градиентом от 50 % до 80 % элюента А.

[100] Область интеграции для хроматограмм эталонного стандарта и образца составляет приблизительно от 4 до 20 минут. Время удержания слегка колеблется в зависимости от применяемого оборудования и мобильных фаз. Относительную площадь пика 3 (Фигура 5, также указывается как (Oligo Map Peak 3)) вычисляют по указанной ниже формуле

$$\text{Относительная площадь пика } x \text{ [\%]} = \frac{\text{Абсолютная площадь пика для пика } x}{\text{Абсолютная площадь пика (все интегрированные пики)}} * 100 \%$$

Пик  $x = 1, 2, 3, 4, 5$  или  $6$

10 Абсолютная площадь пика = сумма всех интегрированных площадей пиков

[101] Относительные площади пиков для всех пиков одной инъекции указывали как сумму пиков (абсолютную площадь пика). Пик 3 включает высокоманнозные (Man5) структуры.

15 **Пример 1: Влияние железа и меди на APG и высокоманнозные структуры**

[102] Влияние разных значений концентрации железа и меди, а также их взаимодействия на эффективность культивирования клеток и параметры качества продукта, включая кислотные и основные варианты заряда (группу кислотного пика (APG) и группу основного пика (BPG)) и высокоманнозные виды, исследовали согласно плану эксперимента (DOE). Исследование согласно DOE представляет собой инструмент сбора и анализа данных, позволяющий варьировать множество входных факторов и определять их влияние, в комбинации и по отдельности, но различных выходных параметров. Таким образом, этот тип исследования позволяет распознавать взаимодействие множества факторов в процессе путем одновременного изменения уровня множества входных параметров в процессе.

[103] 24 эксперимента с культивированием в полностью автоматизированных 15 мл минибиореакторах осуществляли в описанных выше условиях процесса. Клетки высевали в базальную среду в концентрации  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл. Концентрацию железа в базальной среде варьировали в пределах 1,4 - 6,0 мМ с использованием холинцитрата железа (Dr. Paul Lohmann GmbH KG) в качестве источника железа. Холинцитрат железа (0,7, 1,4, 2,1 и 3,0 г/л холинцитрата железа) непосредственно добавляли к составу среды, включающей

5,8 мкМ железа (нитрат железа (III) и сульфат железа (II)) перед стерильной фильтрацией. Медь обеспечивали в форме  $\text{CuSO}_4$  в количестве от 0,36 до 1,71 мкМ. Дополнительный раствор меди ( $\text{CuSO}_4$ ) обеспечивали путем добавления после стерильной фильтрации непосредственно в базальную среду, включающую 0,139 мкМ  $\text{CuSO}_4$ , в биореакторе перед инокуляцией. Питательную среду добавляли ежедневно в количестве 30 мл/л/день, и она включала 1,13 мМ железа (обеспечиваемого в форме холинцитрата железа; 565 мкМ) и 0,43 мМ  $\text{CuSO}_4$ .

[104] Выходными параметрами, которые оценивали при помощи статистического программного обеспечения (Design Expert, Stat Ease, Inc.), были титр продукта спесолимаба, плотность интегрированных жизнеспособных клеток, жизнеспособность на 14-й день и параметры качества продукта APG, BPG, измеряемые путем катионообменной хроматографии (КОХ), и высокоманнозные виды, представленные через структуру Маннозы 5, определяемую путем ЖХГВ УВЭЖХ (Таблица 3).

**Таблица 3. Обзор плана эксперимента**

Опыт DoE, опыт №	Фактор		Ответ					
	I A Cu [мкМ]	I B Fe [мкМ]	Конц. пр-та [мг/л]	IVC [1e6 ж/спос. клеток *ч/мл]	Ж/спос. [%]	HP-SCX APG [%]	HP- SCX BPG [%]	HP-SCX главн. пик [%]
DoE, опыт № 1	1,709	6060,2	3275	2716	39,5	38,8499	7,6791	53,471
DoE, опыт № 2	0,57	1418,5	2489	2574	30,7	42,6608	5,7762	51,563
DoE, опыт № 3	0,359	1418,5	2570	2548	29,8	41,6469	5,5415	52,8117
DoE, опыт № 4	0,359	1418,5	2540	2559	30,2	41,8276	5,4723	52,7001
DoE, опыт № 5	1,709	6060,2	3135	2732	36,4	39,526	7,5707	52,9033
DoE, опыт № 6	0,359	6060,2	3021	2692	32,1	40,8427	4,9329	54,2244
DoE, опыт № 7	1,709	4243,9	3359	2845	39,3	38,5471	7,9149	53,538
DoE, опыт № 8	0,926	6060,2	3430	2750	39,1	38,7951	6,2244	54,9805
DoE, опыт № 9	0,926	6060,2	3336	2856	38,7	39,5181	6,1785	54,3033
DoE, опыт № 10	0,926	4243,9	3135	2732	36,4	40,2692	6,2954	53,4354
DoE, опыт № 11	0,57	2831,2	3015	2665	34,4			
DoE, опыт № 12	1,709	6060,2	3114	2670	32,5	39,6907	7,5364	52,7728
DoE, опыт № 13	0,359	6060,2	3368	2972	41,1	40,0037	4,8158	55,1805
DoE, опыт № 14	1,709	1418,5	2733	2646	31,6	40,7905	8,4525	50,757
DoE, опыт № 15	0,359	4243,9	3090	2822	35,3	40,3784	5,0608	54,5607
DoE, опыт № 16	0,926	4243,9	3208	2821	36,8	40,7413	6,3177	52,941
DoE, опыт № 17	0,359	2831,2	3024	2738	33,7	40,3231	5,2703	54,4066
DoE, опыт № 18	1,709	1418,5	2707	2690	30,7	40,9797	8,5259	50,4944
DoE, опыт № 19	1,709	1418,5	2770	2472	32,8	40,4689	8,5401	50,991
DoE, опыт № 20	0,359	6060,2	3126	2813	34	40,1859	5,0883	54,7258
DoE, опыт № 21	0,926	1418,5	2671	2568	30,5	40,7017	7,7322	51,5662
DoE, опыт № 22	0,359	1418,5	2506	2434	27,5	41,5386	5,8857	52,5758
DoE, опыт № 23	1,709	2831,2	3144	2805	34,3	39,2898	8,3987	52,3115
DoE, опыт № 24	0,926	2831,2	2959	2644	31	40,4996	6,7522	52,7482

[105] Результаты, показанные на Фигуре 1А - F, демонстрируют, что самых низких ВРГ достигают при высокой концентрации железа и низкой концентрации меди (Фигура 1А, В и С). Подобным образом высокая концентрация железа и низкая концентрация меди оказываются благоприятными для титра (Фигура 1D), плотности жизнеспособных клеток (Фигура 1E) и жизнеспособности (Фигура 1F).

**Пример 2: Влияние параметров процесса на ВРГ и высокоманнозные структуры**

[106] Параметры процесса культивирования клеток плотность высеваемых клеток, температуру культивирования и концентрацию растворенного кислорода оценивали согласно DOE для исследования их влияния на параметры качества продукта ВРГ и высокоманнозные виды. Плотность высеваемых клеток варьировали в пределах от 0,5 до 1,5 млн. клеток/мл, температура от 35 °С до 38 °С, концентрацию растворенного кислорода в биореакторе варьировали от 40 до 80 %, и интенсивность подпитки варьировали от 29,7 до 36,3 мл/л в зависимости от изначального объема культуры в день. Проводили 24 параллельных опыта в режиме подпитки в течение 14 дней в полностью автоматизированной системе из 24 минибиореакторов. Другие параметры культивирования и выполняемые аналитические способы были такими, как описано выше. Выходными параметрами, которые оценивали при помощи статистического программного обеспечения (Design Expert, Stat Ease, Inc.), были титр продукта спесолимаба, плотность интегрированных жизнеспособных клеток, жизнеспособность на 14-й день и параметры качества продукта АРГ, ВРГ, измеряемые при помощи КОХ, и высокоманнозные 5 виды, определяемые путем ЖХГВ-УВЭЖХ (Таблица 4).

**Таблица 4: Влияние параметров процесса на ВРГ и высокоманнозные структуры**

Опыт	Фактор				Ответ			
	1 (А) SCD [1e6 клеток/ мл]	2 (Б) Темп. [°С ]	3 (В) DO [%]	4 (Г) Интенс. подп. [мл/л/д]	HP-SCX АРГ [%]	HP-SCX главн. пик [%]	HP-SCX ВРГ [%]	Oligo Map Peak 3 [%]
DoE, опыт 1	0,5	38	80	36,3	48,4307	41,6024	9,9668	3,3907
DoE, опыт 2	1	36,5	60	33	38,983	55,3915	5,6255	2,5953
DoE, опыт 3	0,5	38	40	33	40,1887	52,4259	7,3854	2,773
DoE, опыт 4	1,5	38	60	36,3	42,8188	51,7155	5,4657	2,4207

Опыт	Фактор				Ответ			
	1 (А) SCD [1e6 клеток/ мл]	2 (Б) Темп. [°С ]	3 (В) DO [%]	4 (Г) Интенс. подп. [мл/л/д]	HP-SCX APG [%]	HP-SCX главн. пик [%]	HP-SCX BPG [%]	Oligo Map Peak 3 [%]
DoE, опыт 5	1,5	36,5	40	33	39,4805	55,7712	4,7483	2,2246
DoE, опыт 6	1,5	36,5	80	36,3	38,6954	53,0661	8,2384	2,9646
DoE, опыт 7	0,5	36,5	80	29,7	34,8409	53,5268	11,6322	3,0047
DoE, опыт 8	0,5	35	80	33	33,3687	53,1322	13,4991	3,3424
DoE, опыт 9	0,5	35	40	29,7	30,9043	58,4277	10,668	3,5845
DoE, опыт 10	1,5	35	80	29,7	33,7413	56,7309	9,5278	2,9234
DoE, опыт 11	1,5	35	60	33	33,9172	59,1234	6,9593	2,6479
DoE, опыт 12	1	36,5	60	29,7	37,6827	57,0318	5,2856	2,2165
DoE, опыт 13	1,5	35	40	36,3	34,9144	58,0599	7,0256	2,9119
DoE, опыт 14	1,5	38	40	29,7	44,0231	51,1164	4,8605	2,3038
DoE, опыт 15	0,5	35	60	36,3	31,5503	54,6764	13,7733	3,9877
DoE, опыт 16	1	36,5	60	33	37,4845	56,7758	5,7397	2,4537
DoE, опыт 17	1,5	38	80	29,7	43,9258	47,9145	8,1597	2,6825
DoE, опыт 18	0,5	38	60	29,7	40,3619	50,9505	8,6876	2,7644
DoE, опыт 19	1	38	80	33	43,2368	47,2226	9,5406	2,7673
DoE, опыт 20	1	35	80	36,3	35,7668	52,3688	11,864	3,2503
DoE, опыт 21	1	35	40	29,7	33,1456	59,6815	7,1729	2,7785
DoE, опыт 22	1	36,5	60	33	38,0348	56,1745	5,7907	2,4649
DoE, опыт 23	0,5	36,5	40	36,3	35,486	57,2048	7,3092	3,2644
DoE, опыт 24	1	38	40	36,3	42,8652	51,4559	5,679	2,5289

[107] Результаты, показанные на Фигуре 2А - Н, демонстрируют, что самого низкого BPG достигают при высокой плотности посева и более высокой температуре (Фигура 2А, В и С), и самого низкого уровня высокоманнозных (5Man) структур подобным образом достигают при высокой плотности посева и низкой температуре (Фигура 2D и E). Подобным образом титр (Фигура 2F) и плотность жизнеспособных клеток (Фигура 2G) возрастают с увеличением плотности посева и повышением температуры культивирования. Жизнеспособность после 14 дней культивирования несколько снизилась при высокой плотности посева и повышенной температуре культивирования (Фигура 2H), но это, видимо, не имело отрицательного влияния на титр. Результаты, показанные на Фигуре 3 А - D, демонстрируют, что снижение растворенного кислорода также имеет благоприятное влияние на BPG (Фигура 3А), высокоманнозные структуры (Фигура 3В), титр (Фигура 3С) и плотность жизнеспособных клеток (Фигура 3D).

**Пример 3: Связывание IL36 и FcRn разных гетерогенных вариантов (APG/BPG)**

[108] Для определения активности фракций КОХ, собранных для спесолимаба, осуществляли связывание IL36R (SPR) и биоанализ IL36R (Таблица 5).

[109] Большинство из выделенных фракций КОХ демонстрируют активность по сравнению с материалом источника лекарственного вещества. Сниженную активность наблюдали для большинства кислотной фракции AP4 и, в меньшей степени, для кислотной фракции AP3b (то же касается и связывания FcRn (SPR)). Обе фракции, в особенности фракция AP4, демонстрируют не очень выраженный профиль элюирования (Фигура 4А и В) и имеют низкую относительную распространённость < 1 % (Таблица 5).

[110] Подобным образом большинство основной фракции BP3 также демонстрирует не очень выраженный профиль элюирования ((Фигура 4А и В) с низкой относительной распространённостью менее 1,5 % (Таблица 5). В пределах связывания IL36R(SPR) эта фракция продемонстрировала сниженное восстановление, что означает уменьшение связывания с сенсорным чипом белка A/G, что соответствует возрастанию олигомеров, наблюдаемых в пределах этих фракций, как показано на Фигуре 4С.

**Таблица 5: биоанализ IL36R, связывание IL36R (SPR) и связывание FcRn (SPR) фракций КОХ, собранных для спесолимаба.**

	КОХ	Биоанализ IL36R	Связ. IL36R (SPR)		Связ. FcRn (SPR)
	Относ. кол-во общей площади в КОХ [%]	Активность [%]	Восстан. <sup>(a)</sup> [%]	Акт-сть <sup>(б)</sup> [%]	Связывание [%]
Фракция AP4	0,5	60	75	93	69
Фракция AP3b	0,8	80	87	93	84
Фракция AP3a	2,8	91	88	98	88
Фракция AP2	2,4	94	90	99	н/а
Фракция AP1c	2,2	102	90	100	90
Фракция AP1b	7,6	99	92	100	89
Фракция AP1a	13,6	102	93	99	92
Фракция MP	62,5	110	95	102	95
Фракция BP1	3,75	97	93	100	95
Фракция BP2	2,4	97	84	100	91
Фракция BP3	1,3	н/а	70	100	н/а
Источник СМС2	Н/А	91	93	101	94

н/а = не анализировали (ввиду отсутствия материала)

(a) Восстановление указывает количество видов, связывающихся с белком A/G, иммобилизованным на сенсорном чипе (первый этап анализа SPR).

(b) Активность указывает активность связывания IL36R видов, связанных с белком A/G (второй этап анализа SPR).

#### 5 Виды BPG

[111] Группа основного пика включает, помимо прочих, различные N-концевые и C-концевые варианты заряда. Наблюдаемые N-концевые варианты заряда представляют собой спесолимаб, содержащий N-концевой глутамин вместо N-концевого пироглутамина (наблюдаемого главным образом на N-конце легкой цепи в фракция BP2, а также в меньшей степени наблюдаемого на N-конце тяжелой цепи в фракции BP1). Кроме того, спесолимаб, содержащий дополнительные аминокислоты VHS на N-конце тяжелой цепи, обогащен фракцией BP3 (остаток N-концевого сигнального пептида). Наблюдаемые C-концевые варианты заряда представляют собой спесолимаб, содержащий дополнительный лизин на C-конце одной (фракция BP1) или обеих (фракция BP3) тяжелых цепей. Кроме того, спесолимаб, содержащий пролинамид на C-конце одной (фракция BP1) или обеих (фракция BP3) тяжелых цепей, является обогащенным (генерируемым путем удаления C-концевого глицина и амидирования соседнего пролина).

#### 20 Виды APG

[112] Группа кислотного пика включает, помимо прочего, спесолимаб, несущий N-гликаны, содержащие N-ацетилнейраминовую кислоту (NANA) и/или спесолимаб, несущий дезамидирование в N386+N391+N392 (HC). Кроме того, умеренное обогащение фрагмента, предположительно состоящего из спесолимаба, в котором отсутствует одна легкая цепь, наблюдается в пределах других кислотных пиков.

#### **Пример 4: Гликированные варианты лизина**

[113] Гликирование является результатом образования различных типов ковалентных аддуктов, в которых глюкоза способна реагировать с первичным амином лизинового остатка или N-конца с образованием в результате кислотных вариантов. Гликирование спесолимаба происходит во время предыдущего производства, когда в культуральной среде содержится глюкоза. Гликированные виды могут быть генерированы в культура клеток и при сборе, когда клетки и молекула спесолимаба подвергаются воздействию повышенного уровня гексозы.

В последующем производственном процессе восстанавливающие сахара не применяют, но они могут присутствовать или образовываться в фармацевтической композиции, т. е., в лекарственном продукте.

[114] Подверженность лизинового остатка гликированию определяется доступностью растворителя (третичной структуры) и химической средой его боковой цепи (первичных и вторичных структур). В IgG большая часть гликирования распределяется по более чем 30 лизиновым остаткам (Miller AK, Hambly DM, Kerwin BA, Treuheit MJ, Gadgil HS, Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100(7): 2543 - 2550). Спесолимаб имеет 11 лизиновых остатков в легкой цепи (LC; SEQ ID NO: 2) и 33 лизиновых остатка в тяжелой цепи (HC; SEQ ID NO: 1), которые могут подвергаться гликированию. Поскольку существует 3 лизиновых остатка поблизости от CDR тяжелой цепи (потенциально критичных лизинов: HC -K23, K38, K67; SEQ ID NO: 1), гликирование может быть критичным для эффективности/активности антитела.

Сумма гликирования через относительный количественный анализ при помощи ЖХ/МС (восстановленная)

[115] Для определения относительного количественного анализа восстановленной суммы гликирования при помощи ЖХ/МС спесолимаба 100 мкл образцы, разведенные до 1 мг/мл, обрабатывали 1 мкл (1U/мкл) N-гликозидазы F (Roche PO11365193001 или эквивалента) для удаления N-связанных олигосахаридов перед восстановлением 1 мкл 1 М DTT. Восстановление выполняют в течение 20 мин при 57 °С. Образованные в результате LC и дегликозилированную HC разделяли путем высокоэффективной хроматографии с обращением фаз (ОФ-ВЭЖХ) и анализировали онлайн при помощи ИЭР Q-TOF МС (Xevo G2 Q-TOF). Белковые субъединицы и соответствующие глюкозные аддукты (добавление М-глюкозы = 162 Да) анализируют и полученные спектры подвергают деконволюции с применением алгоритма MaxEnt™ (Таблица 6).

**Таблица 6: Гликированные варианты лизина согласно ЖХ/МС**

Варианты	Репрезентативное относительное распределение (%) из лекарственного вещества
<b>Легкая цепь</b>	
Негликированный	99
Гликированный	1
<b>Тяжелая цепь</b>	
Негликированный	97
Гликированный	3

Относительный количественный анализ при помощи ЖХ/МС (отдельный сайт гликирования)

[116] Для определения относительного количества отдельных сайтов гликирования при помощи ЖХ/МС образцы денатурировали производили замену буфера с помещением в Tris-буфер гидрохлорида гуанидия (разведение образцов до 1 мг/мл 7М гидрохлорида гуанидия / 100 мМ Tris/HCl, pH 8,3), восстанавливали дитиотрептолом (DTT, конечная концентрация: 10 мМ) в течение 20 минут при 57 °С и алкилировали йодуксусной кислотой (IAA, конечная концентрация: 10 мМ) в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте. Затем реакцию гасили путем добавления 50 мМ DTT. После восстановления и алкилирования снова производили замену буфера, помещая образцы в 100 мМ буфера бикарбоната аммония и подвергали ферментативному расщеплению с применением химотрипсина в присутствии поверхностно-активного вещества. Реакцию прекращали через 30 мин при 37 °С путем добавления муравьиной кислоты (1:120, объем:объем). Пептиды разделяли путем жидкостной хроматографии с обращением фаз и анализировали путем ИЭР-МС. Относительное количество гликированных пептидов определяют (Таблица 7) на основе экстрагированных ионных хроматограмм пептидов дикого типа и пептидов, несущих глюкозный аддукт (+ 162 Да).

**Таблица 7: Распределение гликирования отдельного лизина по молекуле**

Лизиновый остаток	% гликированного лизина
НС	
K12+K13+K19+K23 <sup>(a),(b),(r)</sup>	0,3
K38 <sup>(a)</sup>	н/о
K67 <sup>(a)</sup>	н/о
K123+K135 <sup>(b)</sup>	0,1
K149 <sup>(b)</sup>	0,4
K207	0,1
K212+K215+K220+K224 <sup>(b)</sup>	0,2
K248+K250	0,4
K276	0,1
K290	н/о
K319	0,1
K322+K324+K328+K336 <sup>(b), (b)</sup>	0,3
K328+K336 <sup>(b)</sup>	0,2
K336+K340+K342 <sup>(b)</sup>	0,0
K340+K342 <sup>(b)</sup>	0,0
K362	н/о
K372	0,0
K394	0,0

Лизиновый остаток		% гликированного лизина
	K416	0,0
LC	K40	0,0
	K104 <sup>(б)</sup>	0,1
	K104+K108 <sup>(б), (в)</sup>	0,0
	K127	0,1
	K146	0,0
	K150+K170 <sup>(б), (в)</sup>	0,3
	K184	0,2
	K184+K189+K191 <sup>(б), (в)</sup>	1,4
	K208	н/о

(a) поблизости от CDR, (б) повышенное гликирование в условиях высокого глюкозного стресса (например, 0,5 М глюкозы), (в) лизины в пределах того же пептида, подвергаемые анализу только вместе, без различия между остатками, (г) определенное гликирование в условиях высокого глюкозного стресса (например, 0,5 М глюкозы)

[117] Варианты гликированного лизина для тяжелой цепи и легкой цепи присутствуют на низком уровне  $\leq 3\%$  и  $\leq 1\%$ , соответственно, но обнаружимы (Таблица 6) и в более низком диапазоне, как правило, упоминаются в литературе о рекомбинантных IgG на уровне 5 - 15 % (Eon-Duval A et al, J Pharm Sci., 2012, 101(10): 3604 - 3618). Также неожиданно было обнаружено, что гликирование на критичных остатках имеет уровень ниже обнаружимого предела или для K23 ниже 0,3 % (Таблица 7, критичные остатки выделены жирным шрифтом).

[118] Хотя были описаны определенные аспекты и варианты осуществления изобретения, они были представлены лишь в качестве примера и не ограничивают объем изобретения. Действительно, описанные авторами новые способы и системы могут быть воплощены в различных других формах без отклонения от сущности изобретения. Прилагаемая формула изобретения и ее эквиваленты включают такие формы или модификации и охватываются объемом и сущностью изобретение.

[119] Все патенты и/или публикации, включая журнальные статьи, упоминаемые в данном описании, являются прямо включенными в него путем ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ продуцирования антитела спесолимаба в культуре клеток, включающий

5 (а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для культивирования клеток с использованием подпитываемой культуры, включая

(I) посев клеток в культуральной среде и

10 (II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой,

причем  $\text{Cu}^{2+}$  добавляют к культуральной среде в количестве 0,35 - 1,2 мкМ, а железо добавляют в количестве 1500 мкМ или более перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева;

15 (б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и

(в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток.

20 2. Способ по п. 1, причем  $\text{Cu}^{2+}$  и железо добавляют к культуральной среде перед посевом на этапе (I) и/или в течение 1 дня после посева.

3. Способ по пп. 1 или 2, причем повышенная концентрация железа и/или сниженная концентрация меди в культуральной среде в результате ведет к  
25 продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % группы основного пика (% BPG).

4. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем антитело спесолимаб имеет  $\leq 7,5$  % BPG, предпочтительно  $\leq 7$  % BPG, более  
30 предпочтительно  $\leq 6,5$  % BPG, еще более предпочтительно –  $\leq 6$  % BPG.

5. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем плотность посева на этапе (а) составляет  $\geq 0,7 \times 10^6$  клеток/мл, предпочтительно  $0,7 \times 10^6$  клеток/мл до  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, более предпочтительно от  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл до

1,5x10<sup>6</sup> клеток/мл, еще более предпочтительно – от 0,9x10<sup>6</sup> клеток/мл до 1,3x10<sup>6</sup> клеток/мл.

5 6. Способ продуцирования антитела спесолимаба в культуре клеток, включающий

(а) культивирование клеток СНО, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело спесолимаб, в бессывороточной среде для культивирования клеток с использованием подпитываемой культуры, включая

10 (I) посев клеток в культуральной среде с плотностью посева  $\geq 0,7 \times 10^6$  клеток/мл и

(II) культивирование клеток в культуральной среде в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб в культуре клеток, включая подпитывание клеток в культуре клеток питательной средой,

15 причем к культуральной среде необязательно добавляют  $\text{Cu}^{2+}$  в количестве 0,35 - 1,2 мкМ и железо в количестве 1500 мкМ или более перед посевом клеток на этапе (I) и/или в пределах 2 дней после посева;

(б) сбор супернатанта культуры клеток, включающего антитело спесолимаб; и

20 (в) необязательно очистку антитела спесолимаба от супернатанта культуры клеток.

7. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем повышенная плотность посева в результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % группы основного пика (% BPG) и/или % структур Man5.

8. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем клетки культивируют при температуре от 36,0 °С до 37,5 °С в условиях, позволяющих продуцировать антитело спесолимаб, включая подпитывание клеток питательной 30 средой, и/или концентрацию растворенного кислорода (DO) в вышеупомянутой культуре поддерживают в пределах 30 - 60 %.

9. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем повышение температуры культивирования и/или снижение растворенного кислорода в

результате ведет к продуцированию антитела спесолимаба, имеющего сниженный % ВРГ и/или % структур Man5.

5 10. Способ по одному из предыдущих пунктов, причем антитело спесолимаб имеет менее 5 % структур Man5, предпочтительно менее 4 % структур Man5, более предпочтительно – менее 3 % структур Man5, и/или  $\leq 7,5$  % ВРГ, предпочтительно  $\leq 6,5$  % ВРГ.

10 11. Композиция, включающая антитело спесолимаб, имеющее  
(а)  $\leq 7,5$  % ВРГ, предпочтительно  $\leq 7$  % ВРГ, более предпочтительно  $\leq 6,5$  % ВРГ, еще более предпочтительно –  $\leq 6$  % ВРГ; и/или  
(б) менее 5 % структур Man5, предпочтительно менее 4 % структур Man5, более предпочтительно – менее 3 % структур Man5.

15 12. Композиция, включающая антитело спесолимаб, причем антитело спесолимаб получают с применением способа по одному из пунктов 1 - 10.

20 13. Композиция по пп. 11 или 12, причем композиция представляет собой лекарственный продукт, включающий антитело спесолимаб, имеющее менее 7,5 % ВРГ и/или менее 5 % структур Man5.

25 14. Композиция по одному из пунктов с 11 по 13, причем антитело спесолимаб включает  $\leq 6$  % гликированных вариантов лизина тяжелой цепи (НС), и/или лизины К38 (НС) и К67 (НС) не являются гликированными, и гликирование в К23 (НС) составляет  $\leq 0,3$  %.

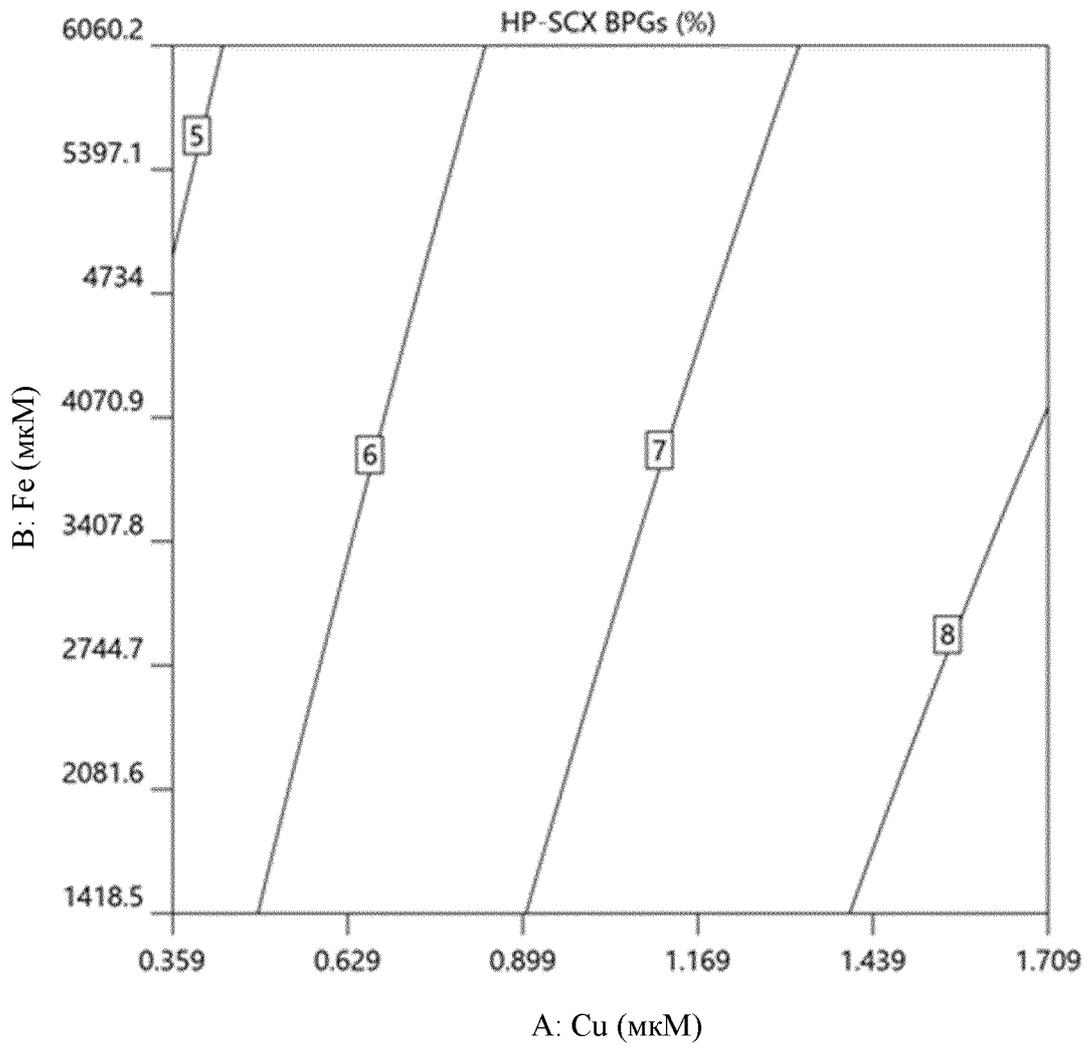
30 15. Композиция, включающая антитело спесолимаб, которое включает  $\leq 6$  % гликированных вариантов лизина тяжелой цепи (НС), и/или лизины К38 (НС) и К67 (НС) не являются гликированными, и гликирование в К23 (НС) составляет  $\leq 0,3$  %.

16. Композиция, включающая антитело спесолимаб, которое включает субфракции группы кислотного пика (АРГ) АР4 в количестве менее 1 % и

фракции AP3 в количестве менее 4 %, в частности, AP4 в количестве менее 1 % и фракции AP3b в количестве менее 1 %.

ФИГ. 1

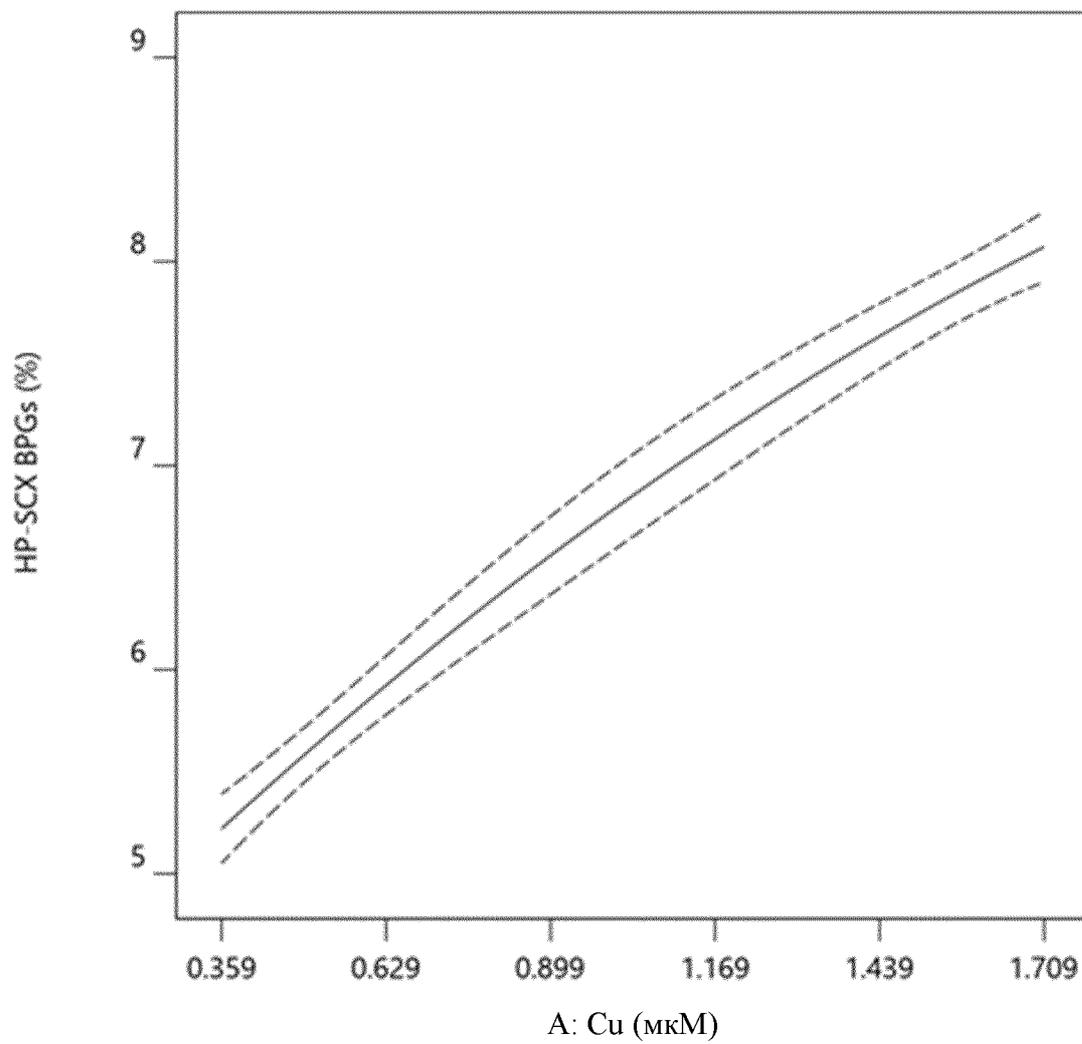
A



ФИГ. 1

В

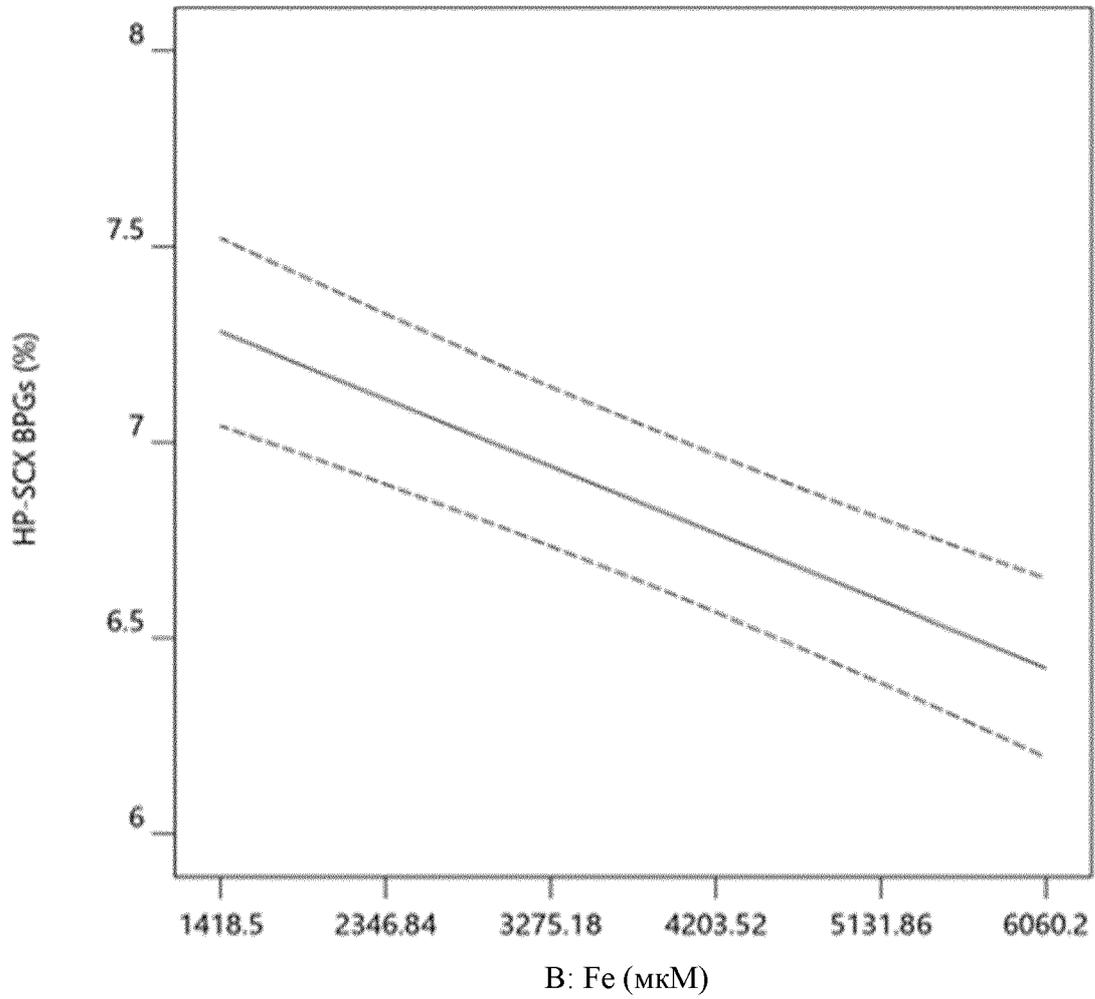
Однофакторный



ФИГ. 1

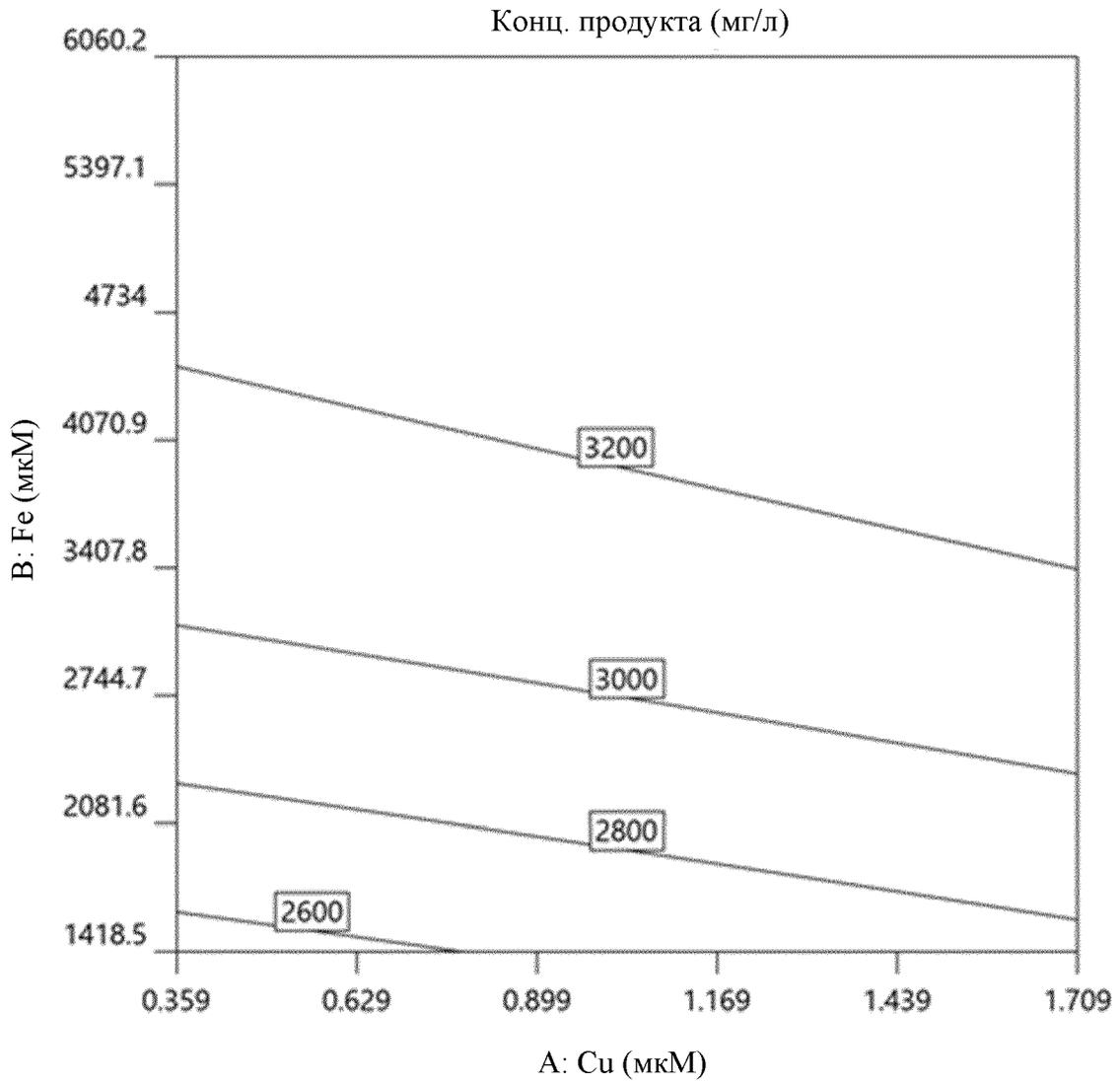
С

Однофакторный



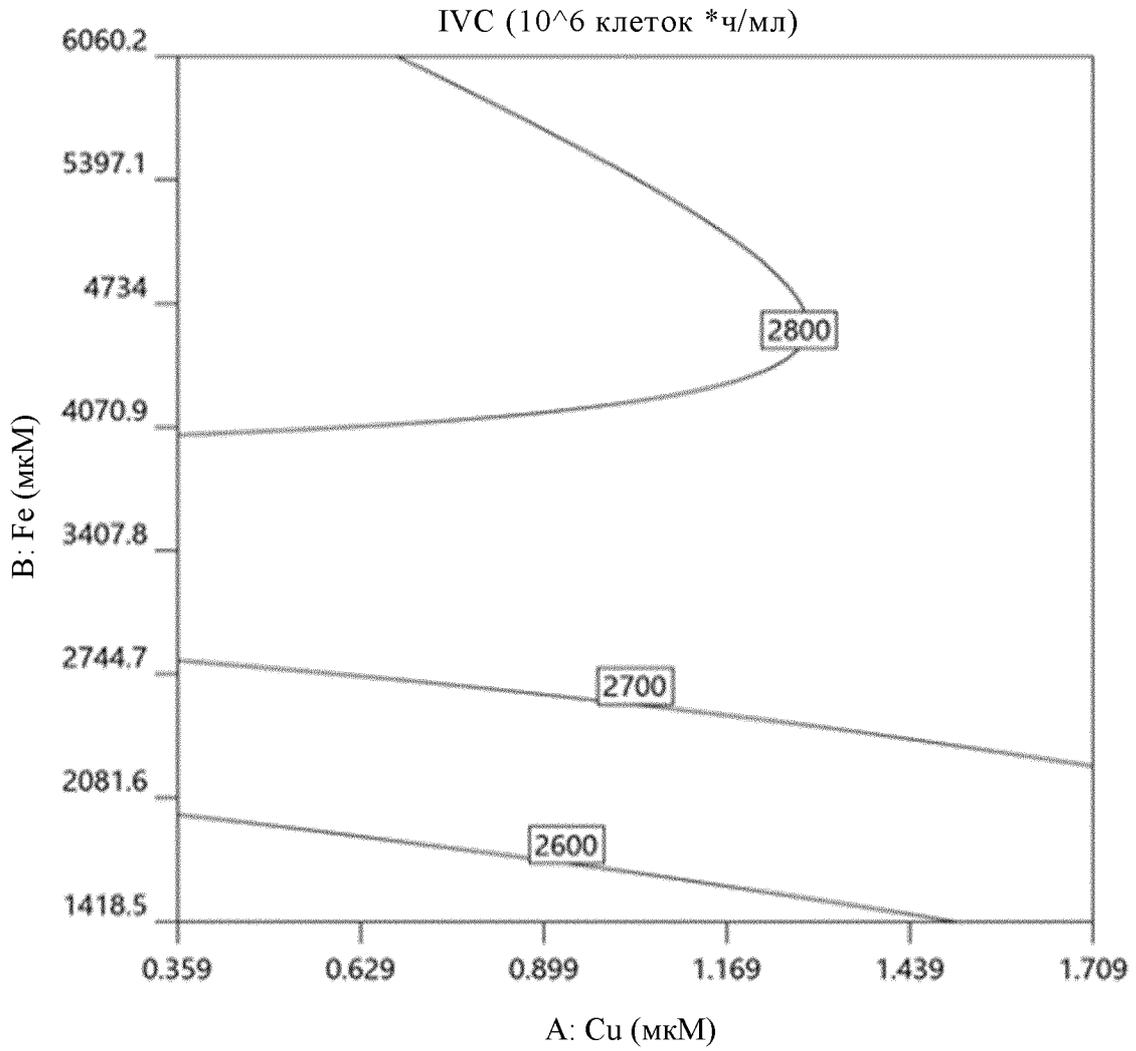
ФИГ. 1

D



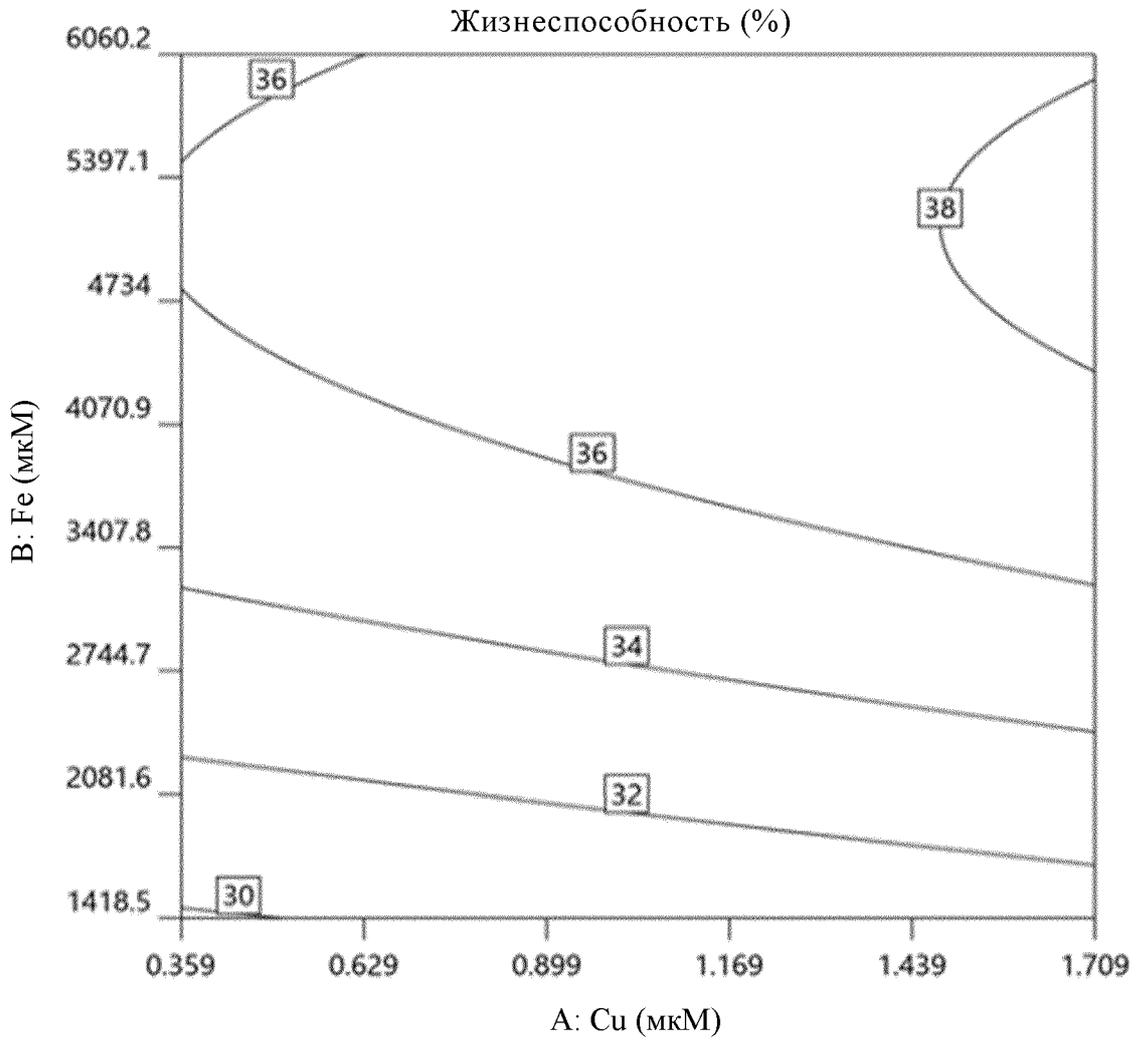
ФИГ. 1

E



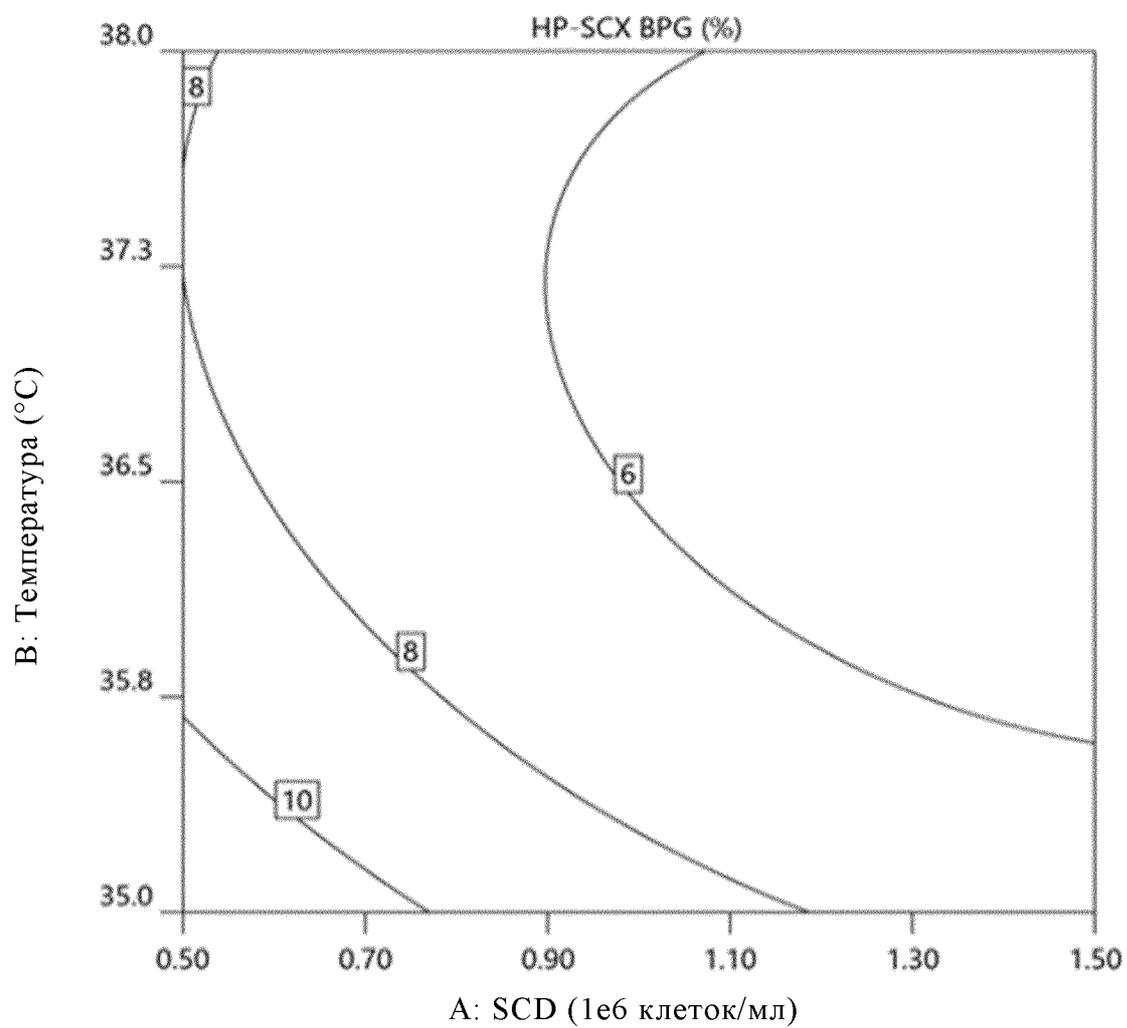
ФИГ. 1

F



ФИГ. 2

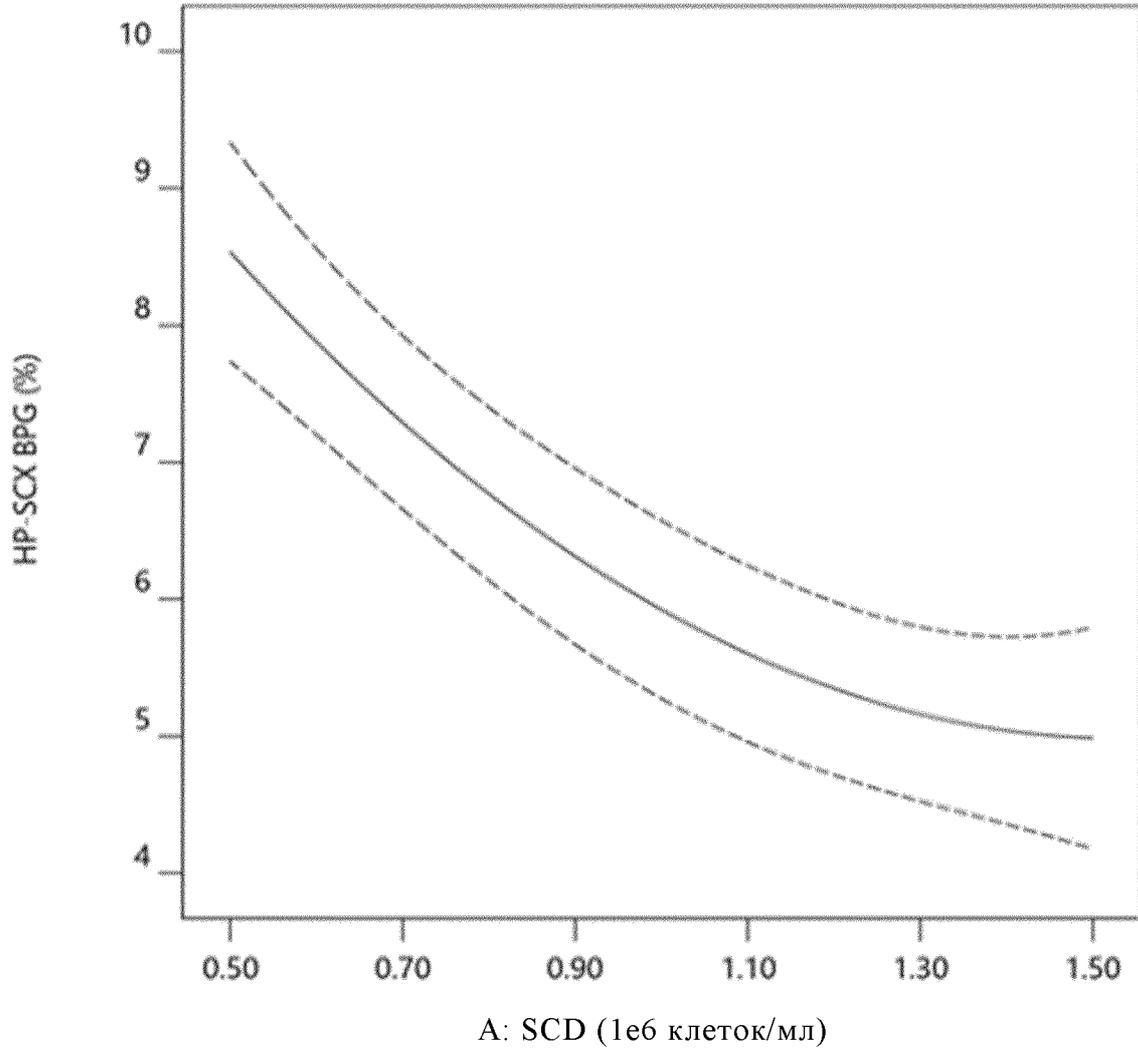
А



ФИГ. 2

В

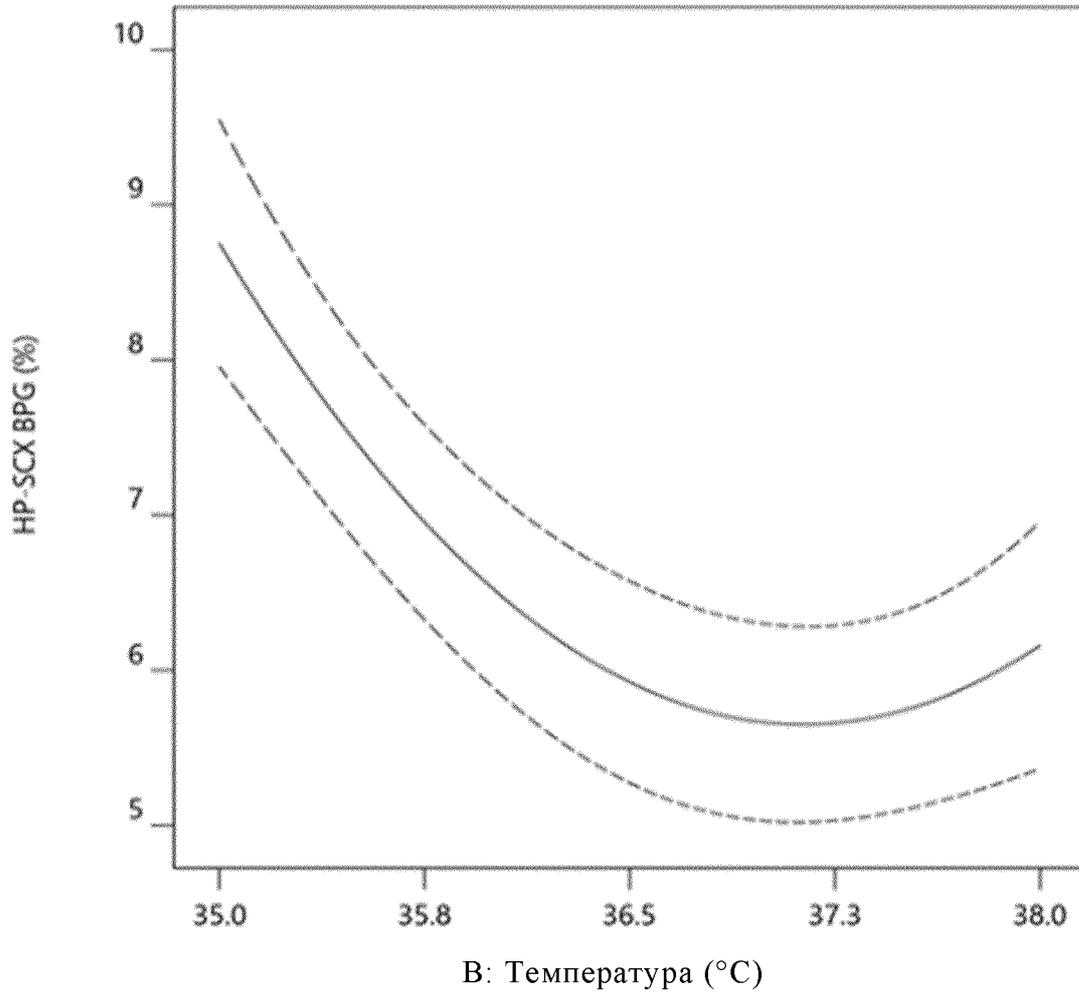
Однофакторный



ФИГ. 2

С

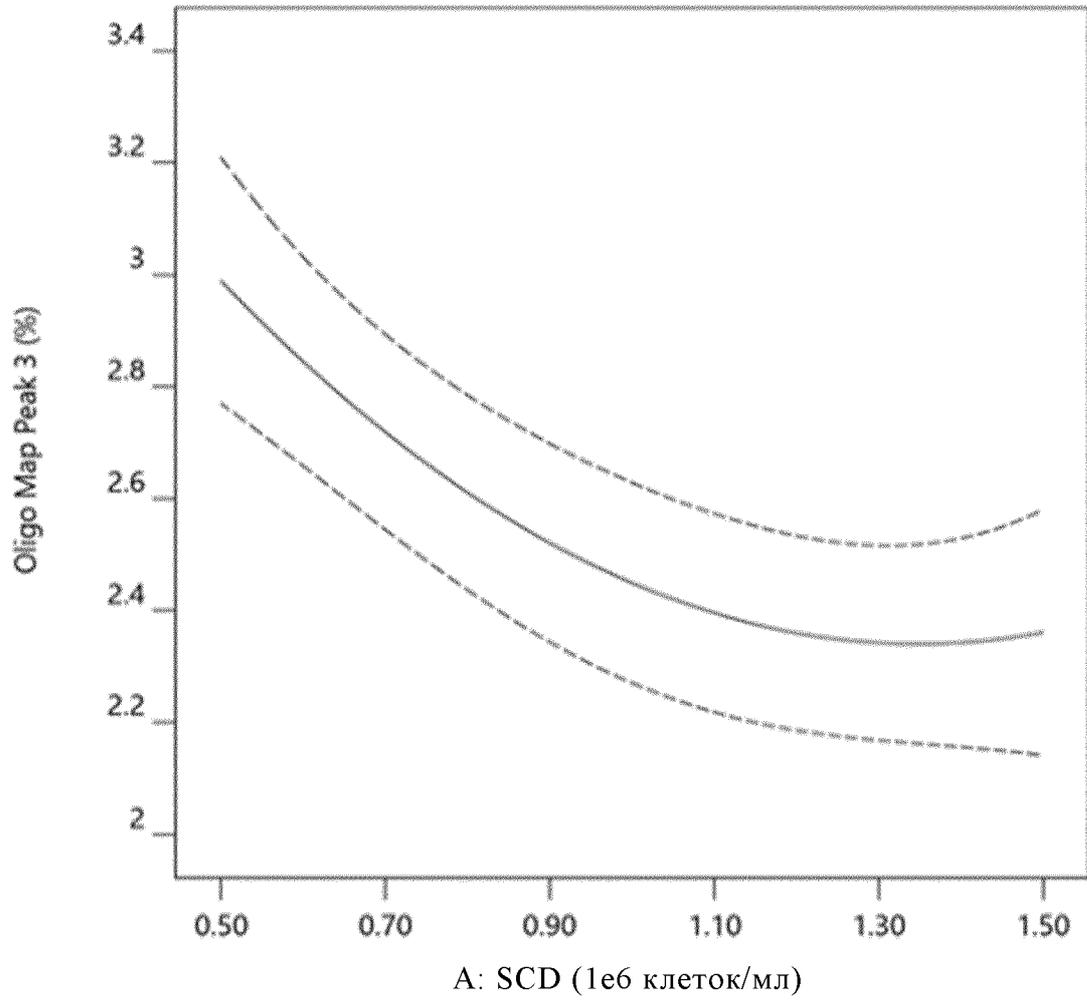
Однофакторный



ФИГ. 2

D

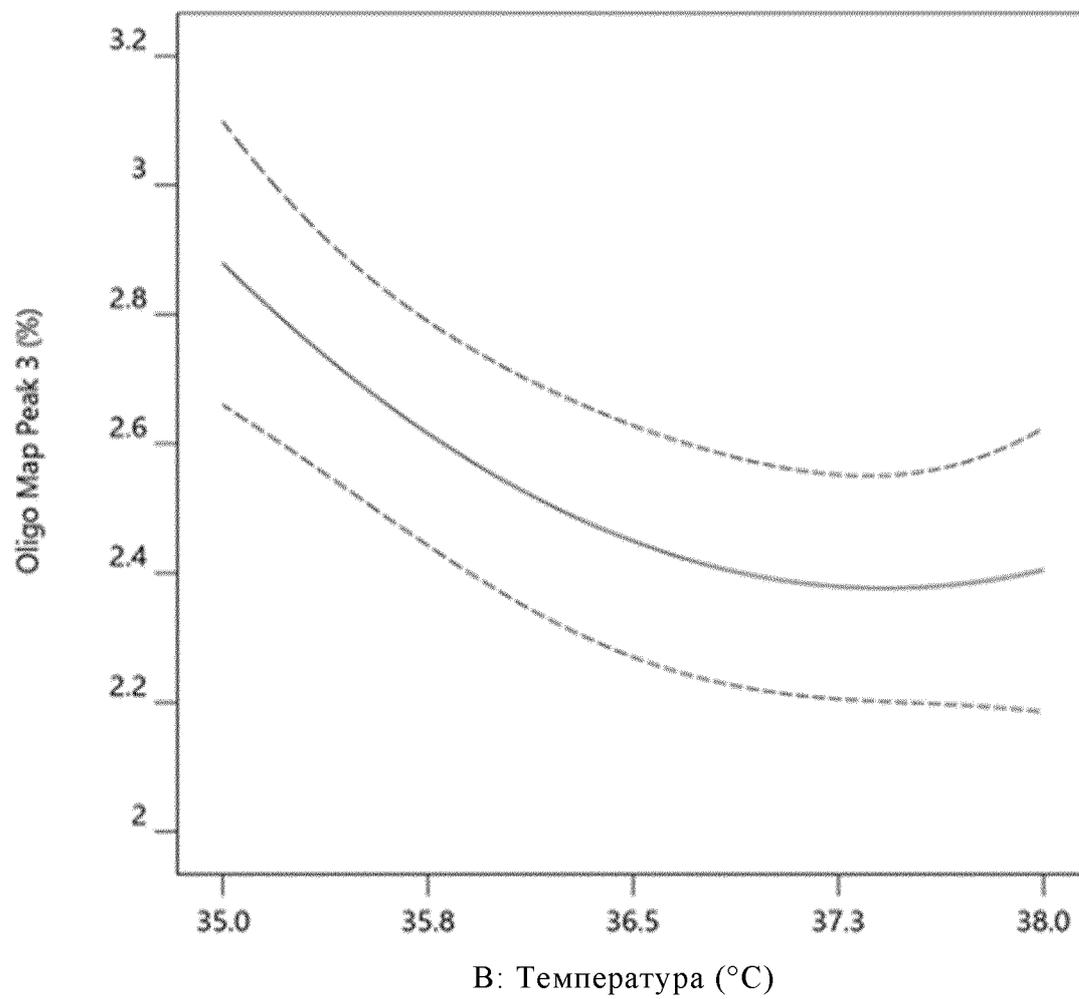
Однофакторный



ФИГ. 2

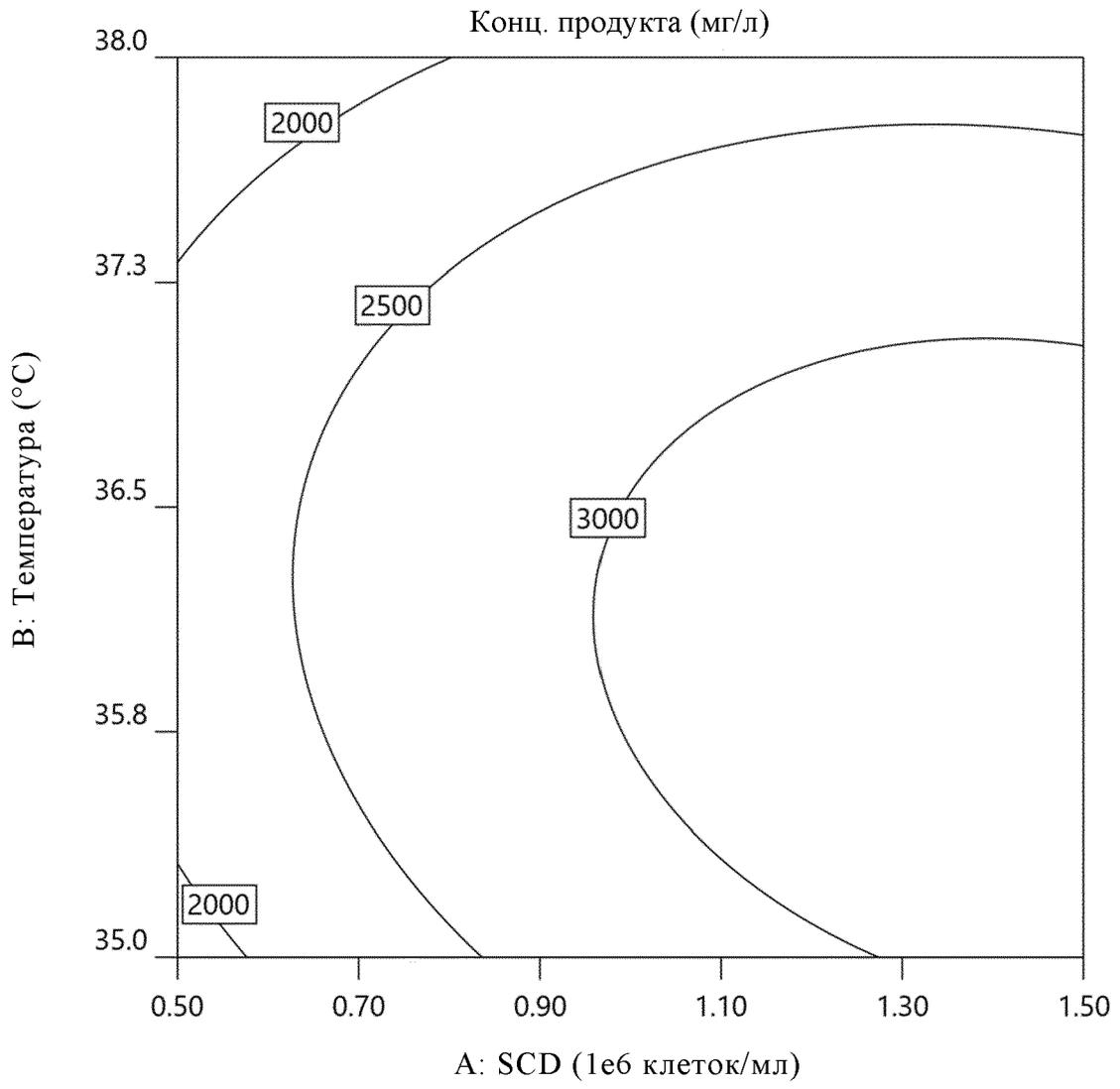
Е

Однофакторный



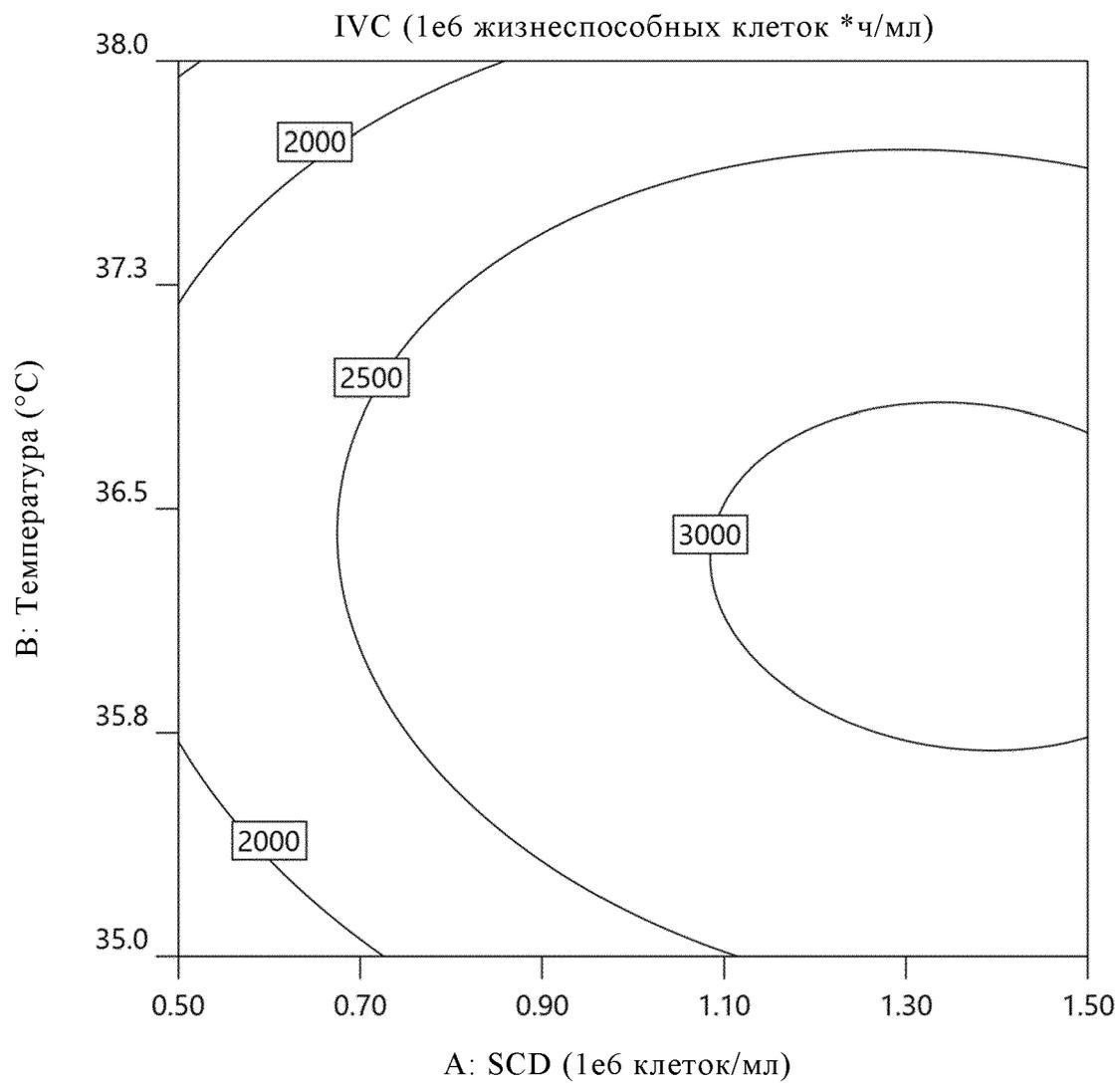
ФИГ. 2

F



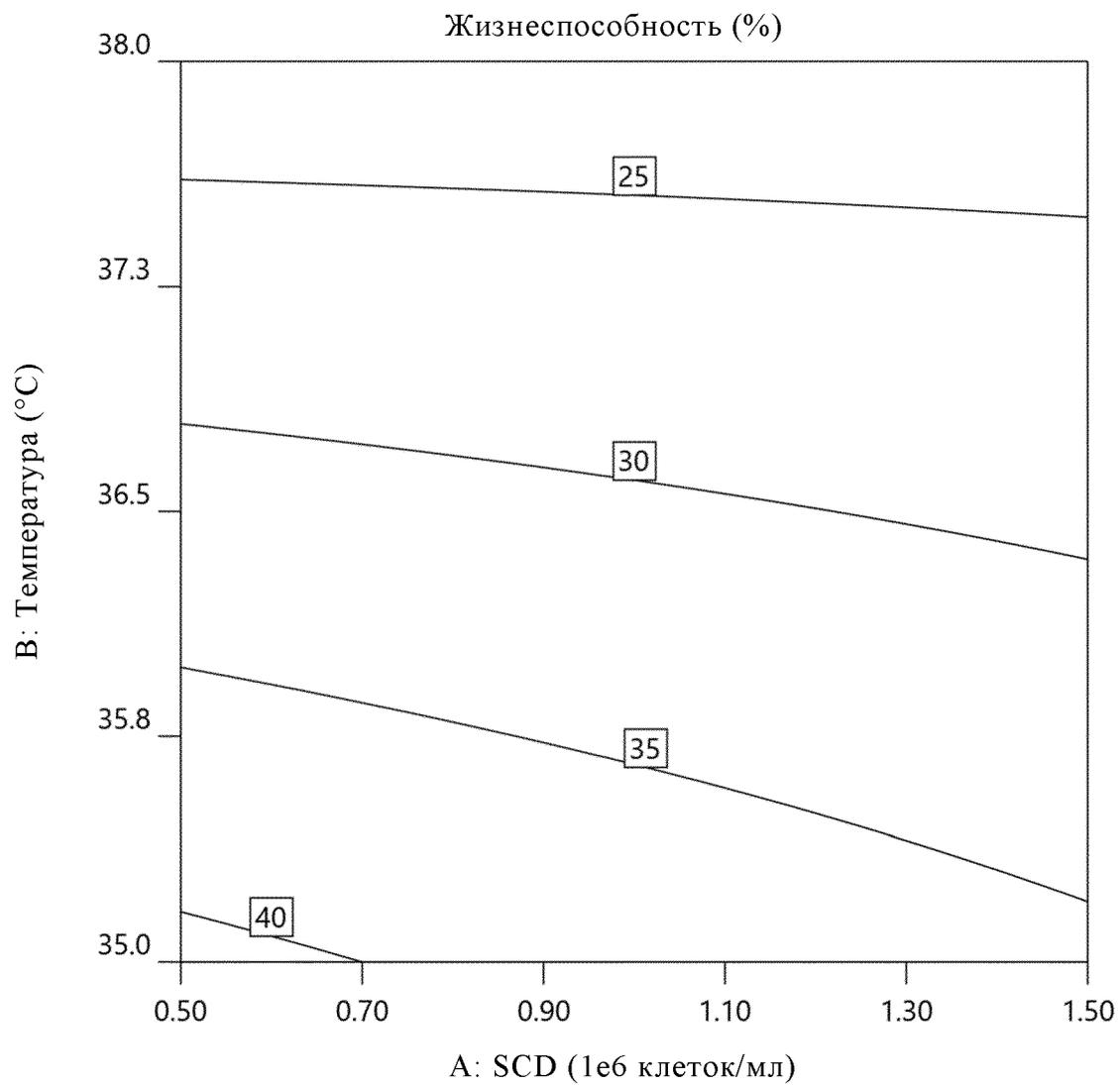
ФИГ. 2

G



ФИГ. 2

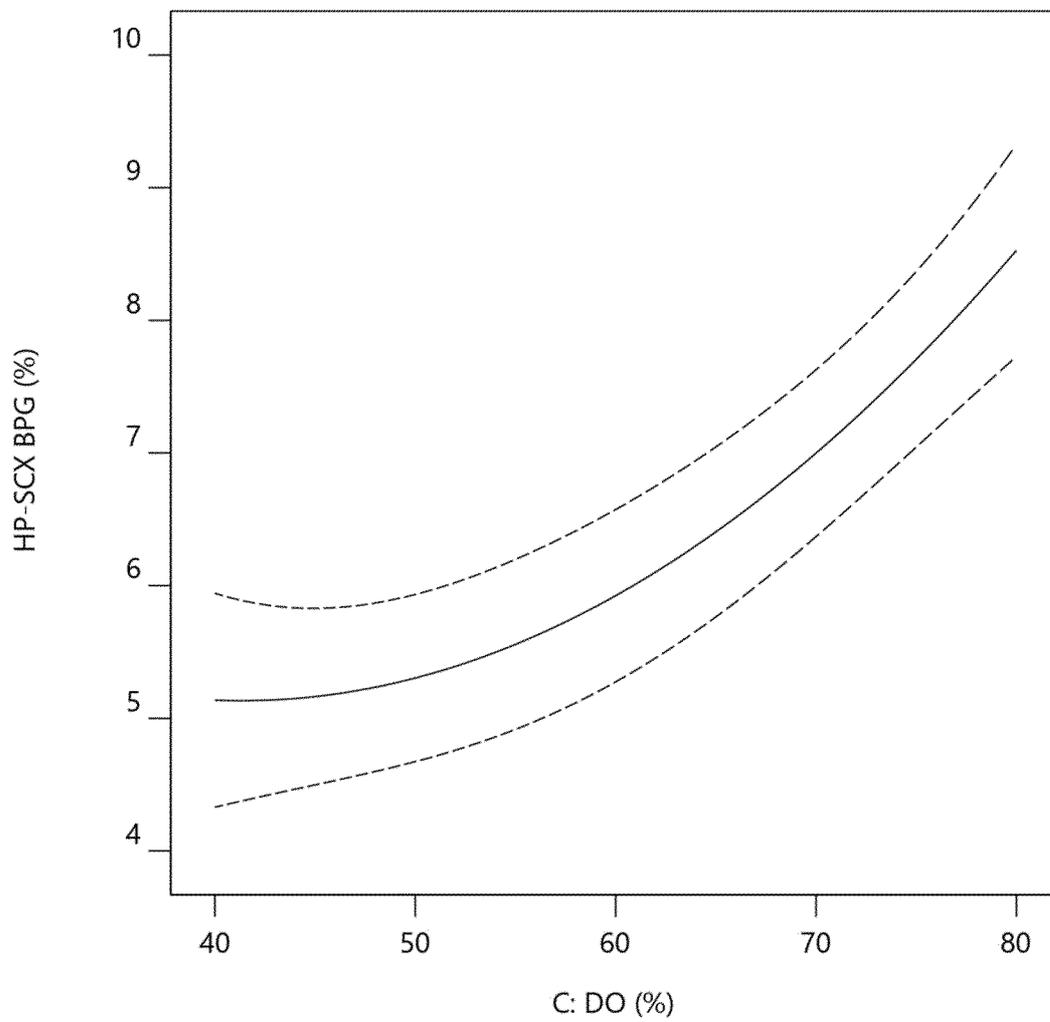
Н



ФИГ. 3

A

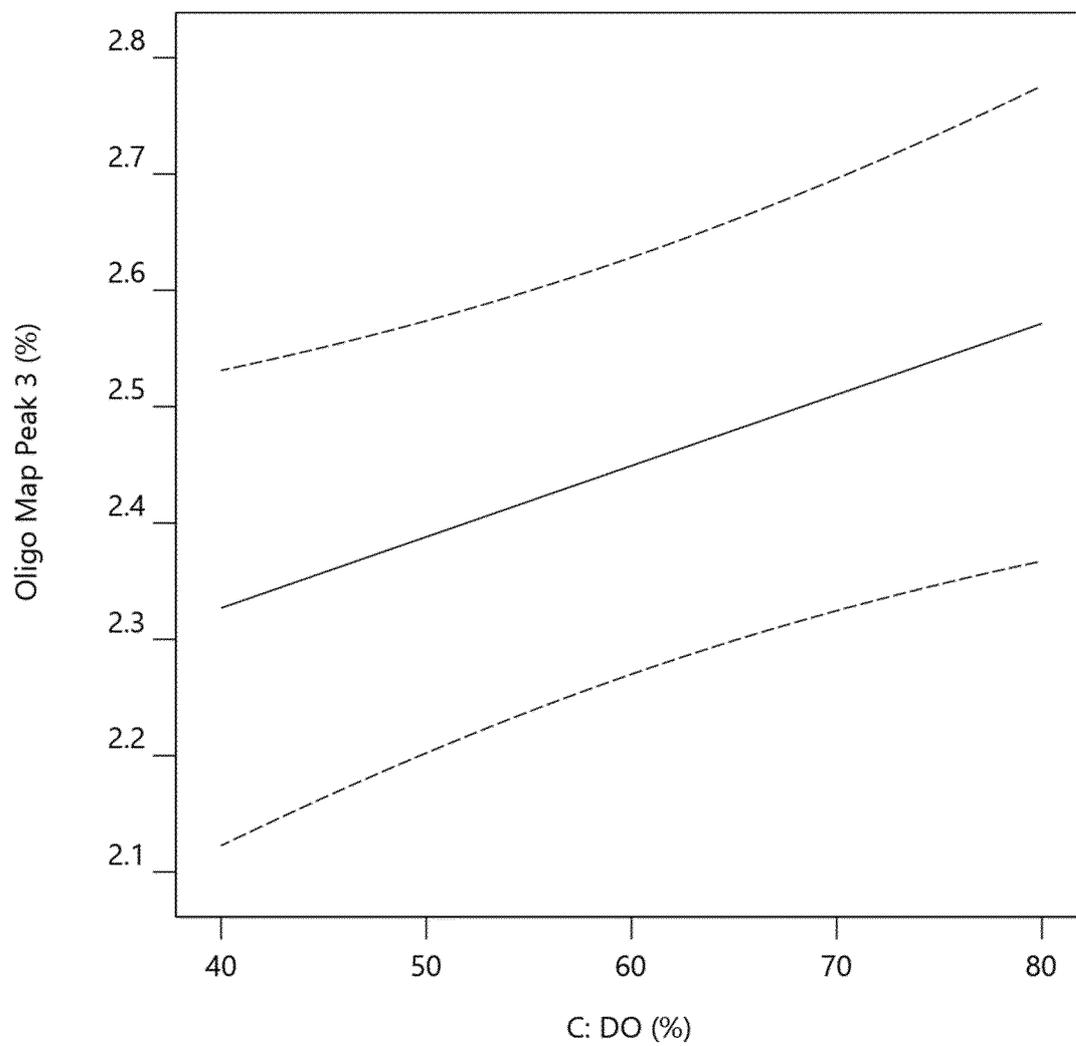
Однофакторный



ФИГ. 3

В

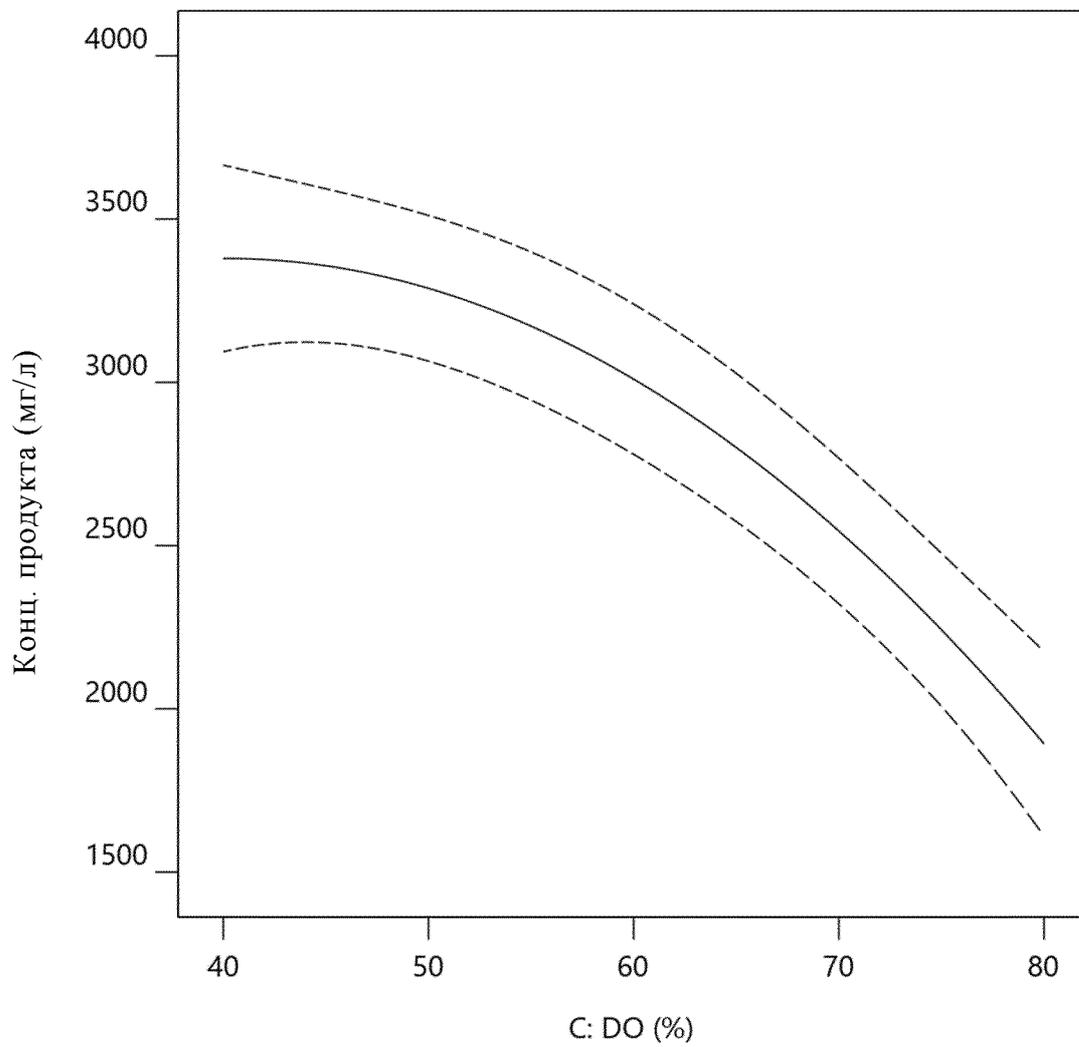
Однофакторный



ФИГ. 3

С

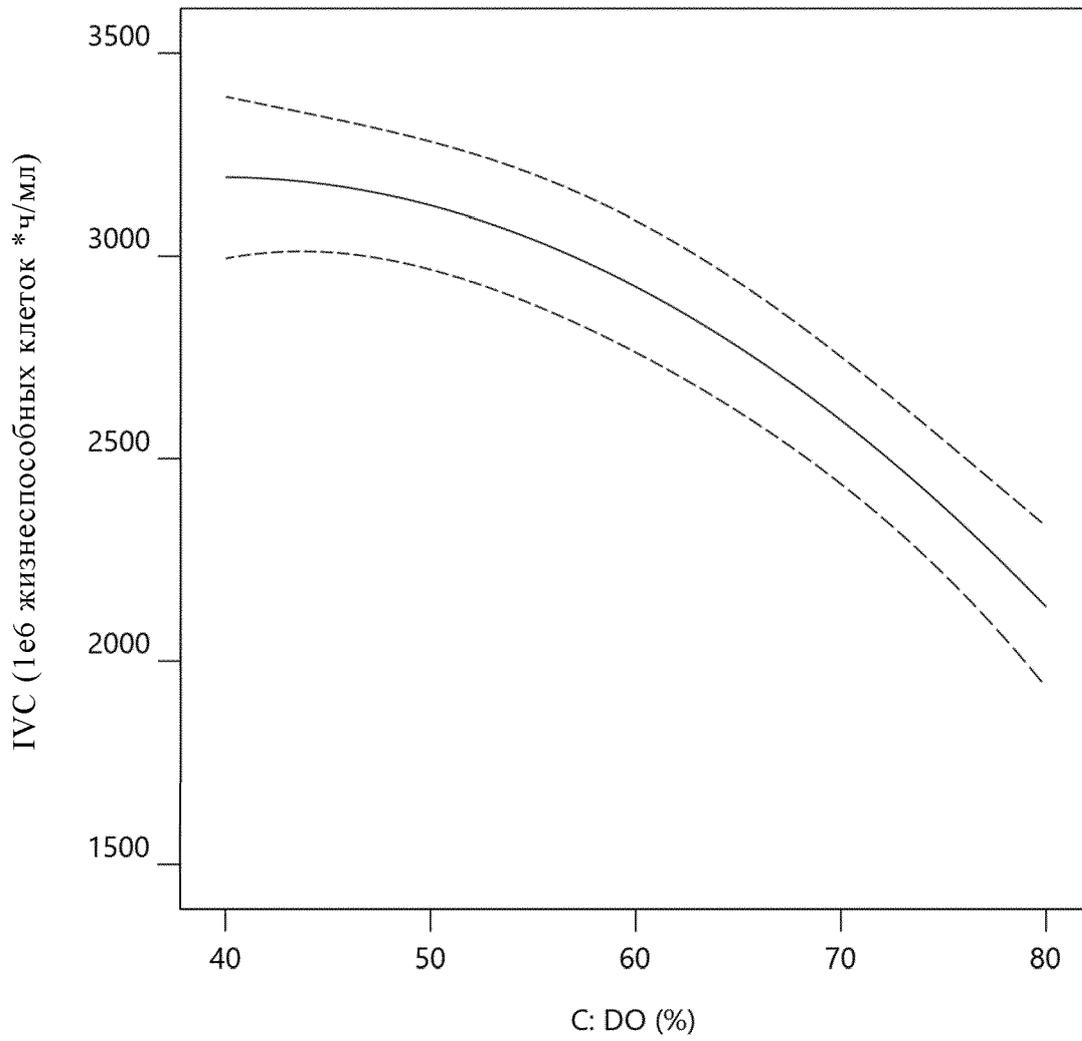
Однофакторный



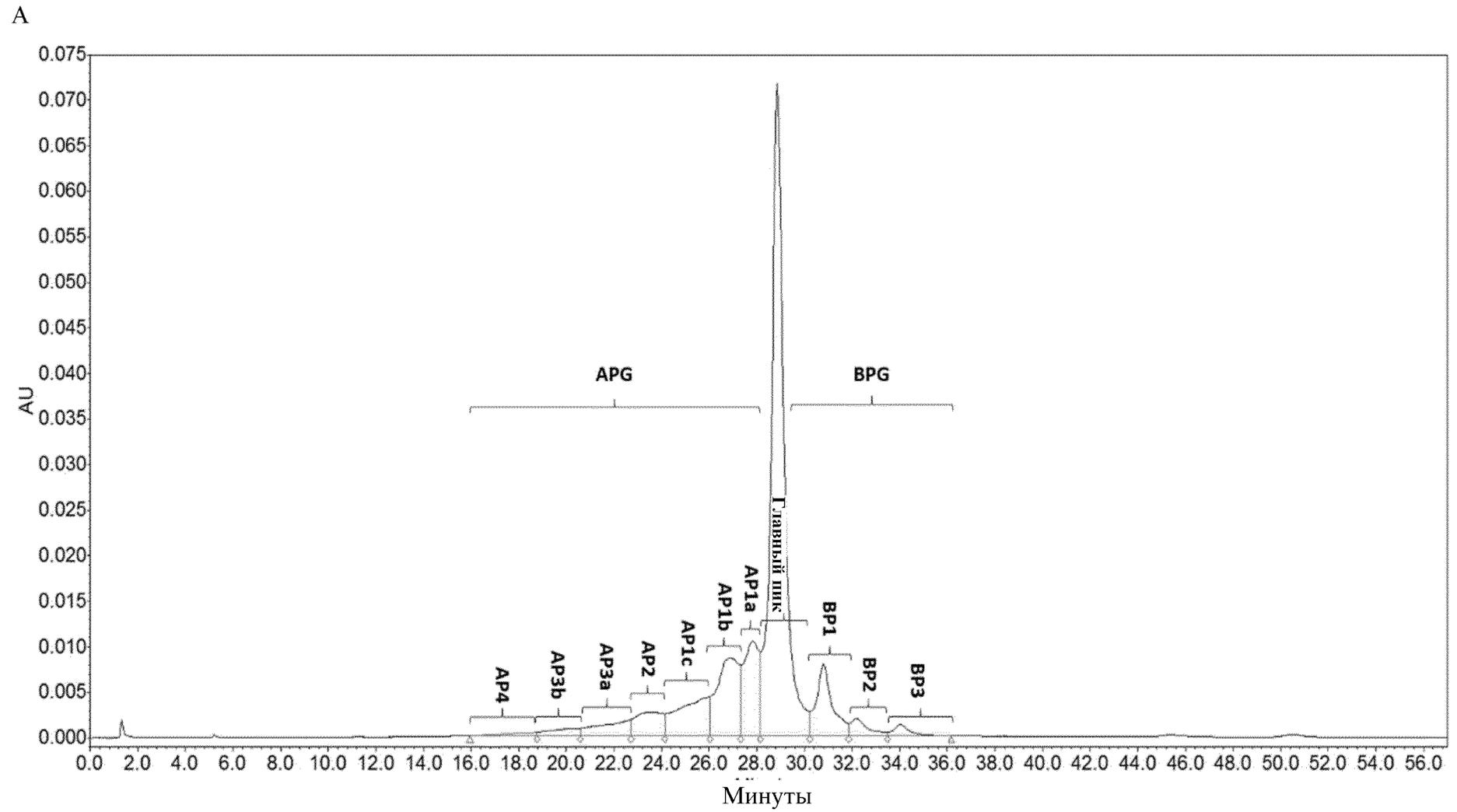
ФИГ. 3

D

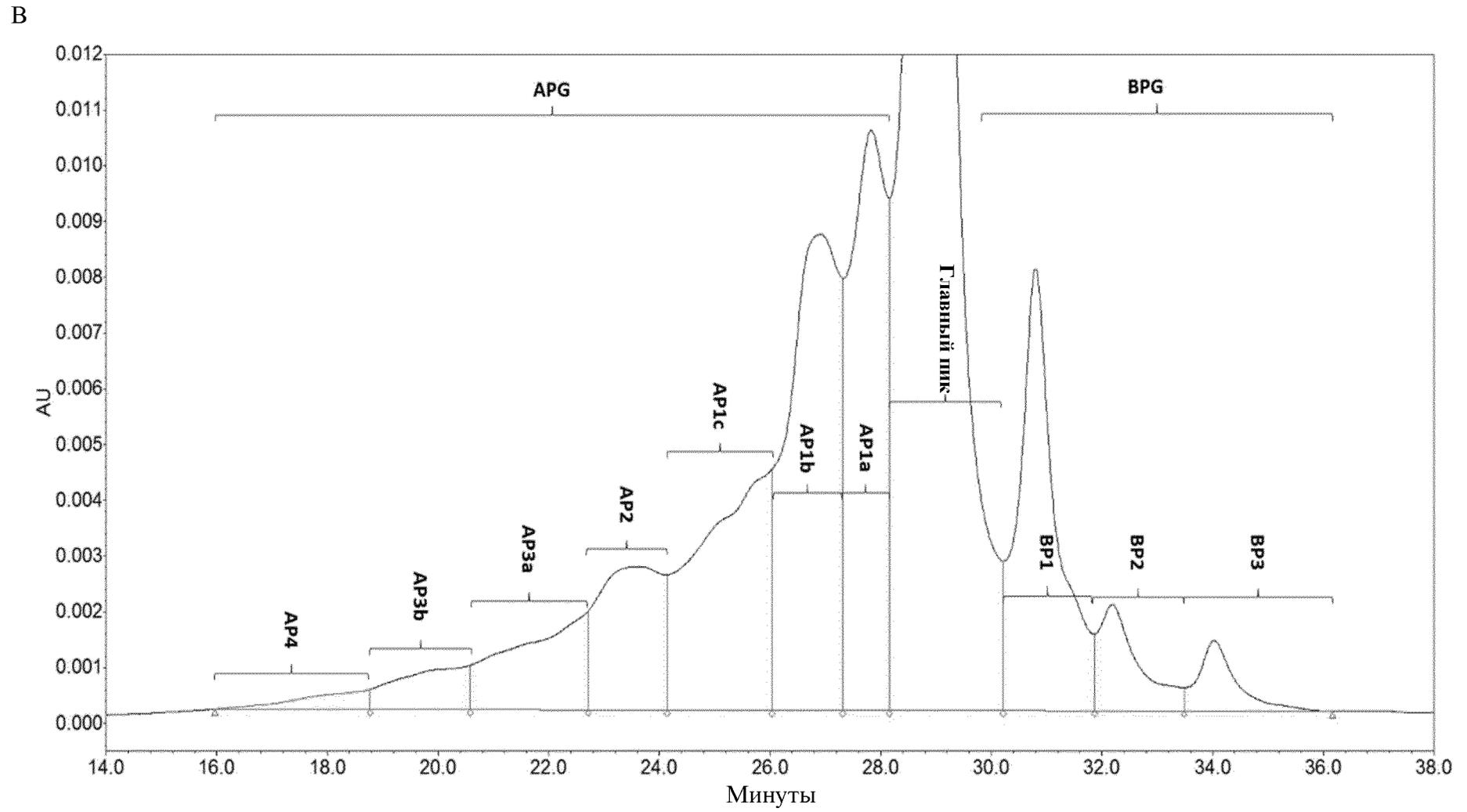
Однофакторный

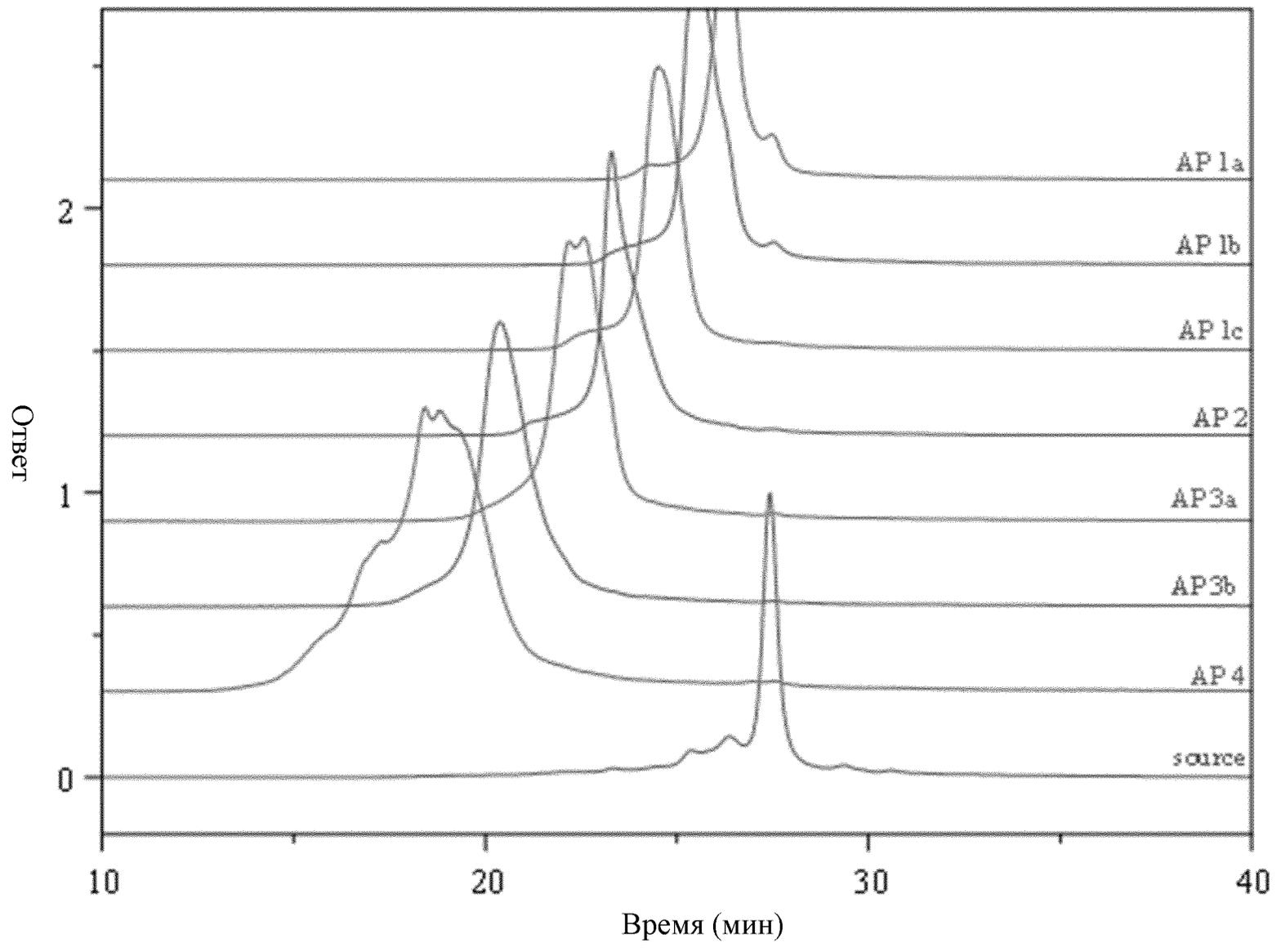


ФИГ. 4



ФИГ. 4





С

ФИГ. 4

ФИГ. 5

