

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046459**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.03.15**

(21) Номер заявки  
**202191840**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.12.20**

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)  
**C07K 1/00** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C12N 5/16** (2006.01)  
**C12Q 1/54** (2006.01)  
**C12N 5/07** (2010.01)

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ УСТЕКИНУМАБА**(31) **62/786,821**(32) **2018.12.31**(33) **US**(43) **2021.09.03**(86) **PCT/US2019/067916**(87) **WO 2020/142275 2020.07.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**МОМЕНТА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Цзан Жу (US)**

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

(56) **US-A1-20140271622  
WO-A1-2018024770**

LIU: "Antibody Glycosylation and Its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins", J. Pharm. Sci., 2015, vol. 104(6), p. 1866-1884, entire documentation, especially abstract; pg 1870, col 2, lower para, and fig. 1

HASELBERG et al.: "Heterogeneity assessment of antibody-derived therapeutics at the intact and middle-up level by low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry", Anal. Chim. Acta, 2018 Dec, vol. 1044, p. 181-190, Epub 2018 Aug 15, entire documentation, especially abstract; pg 183, col 1, middle para; pg 186, col 1, lower para; and pg 188, fig. 5

MIMURA et al.: "Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy", Protein Cell, 2018 Jan, vol. 9(1):47-62, Epub 2017 Jun 8, entire documentation, especially abstract; and pg 49, fig. 1

LIU: "Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins", Protein Cell, 2018 Jan, vol. 9(1):15-32, Epub 2017 Apr 19, entire documentation, especially abstract; pg 16, fig. 1; and pg 17, fig. 2

HAMM et al.: "Characterization of N-Linked Glycosylation in a Monoclonal Antibody Produced in NS0 Cells Using Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection", Pharmaceuticals (Basel), 2013, vol. 6(3), p. 393-406, entire documentation, especially abstract; pg 397, fig. 1 and 2; and pg 398, table 1

(57) Описаны способы получения продукта устекинумаба с целевым уровнем одного или более гликанов.

**B1****046459****046459 B1**

### **Перекрестные ссылки на смежные заявки**

Данная заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/786821, поданной 31 декабря 2018 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

### **Перечень последовательностей**

Рассматриваемая заявка содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и полностью включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 20 декабря 2019 г., называется M0168PCT\_SL.txt и имеет размер 6036 байт.

### **Предпосылки создания изобретения**

Терапевтические антитела являются важным классом терапевтических биологических лекарственных средств. Гликозилирование антитела и состав гликанов могут влиять на активность антитела и эффекторные функции. Сохраняется актуальная потребность в усовершенствованных способах контроля профиля гликанов в продуктах антител.

### **Изложение сущности изобретения**

В настоящем изобретении предложены технологические подходы для получения (например, изготовления) устекинумаба с целевым уровнем одного или более гликанов. Настоящее изобретение дает представление о том, что взаимосвязь между концентрацией галактозы в культуральной среде и временем культивирования можно использовать как технологический подход для контроля целевого уровня одного или более гликанов (например, галактозилирование) в устекинумабе в культуре. В настоящем изобретении продемонстрирована обратная зависимость между временем культивирования и концентрацией галактозы в культуральной среде для контроля целевого уровня одного или более гликанов (например, галактозилирование).

В определенных аспектах в изобретении предложены способы изготовления устекинумаба с целевым уровнем одного или более гликанов. Такие способы могут включать в себя обеспечение (например, продукцию, экспрессию (например, в мелкомасштабной или крупномасштабной клеточной культуре) и/или изготовление) или получение (например, поступление и/или приобретение у третьей стороны (в том числе у привлекаемой по контракту третьей стороны или не связанной контрактом (например, независимой) третьей стороны)) исследуемого белка устекинумаба (например, лекарственное вещество устекинумаба, например препарат лекарственного вещества устекинумаба, например партия исследуемого лекарственного вещества устекинумаба).

В некоторых случаях в изобретении предложены способы изготовления фармацевтической композиции, содержащей устекинумаб, имеющий целевой уровень одного или более гликанов, причем способ включает в себя

выбор уровня галактозы и времени культивирования клеток, при этом уровень галактозы и время обратно пропорциональны друг другу;

культивирование популяции клеток, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба в условиях, включающих выбранный уровень галактозы и время;

сбор устекинумаба, экспрессированного популяцией клеток, с получением таким образом препарата устекинумаба; и

очистку, концентрирование и/или определение состава препарата устекинумаба для получения фармацевтической композиции, содержащей устекинумаб, если препарат соответствует целевому уровню одного или более гликанов.

В некоторых вариантах осуществления целевой уровень одного или более гликанов представляет собой целевой уровень гликана, выбранного из группы, состоящей из G0F, сиалилированного гликана и G2F. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень одного или более гликанов представляет собой целевой уровень G0F.

В некоторых случаях в изобретении предложены способы изготовления фармацевтической композиции, содержащей устекинумаб, имеющий целевой уровень гликана G0F, причем способ включает в себя

выбор целевого уровня гликана G0F;

выбор уровня галактозы и времени для культивирования клеток с обеспечением выбранного целевого уровня G0F, при этом уровень галактозы и время обратно пропорциональны друг другу;

культивирование популяции клеток, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба в условиях, включающих выбранный уровень галактозы и время;

сбор устекинумаба, экспрессированного популяцией клеток, с получением таким образом препарата устекинумаба; и

очистку, концентрирование и/или определение состава препарата устекинумаба для получения фармацевтической композиции, содержащей устекинумаб, если препарат соответствует целевому уровню гликана G0F.

В некоторых случаях в изобретении предложены способы получения лекарственного препарата устекинумаба, имеющего целевой уровень одного или более гликанов, причем способ включает в себя

культивирование популяции клеток, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба в определенных условиях, при этом условия характеризуются параметрами, включающими в себя выбранный уровень галактозы и время культивирования клеток, и при этом уровень галактозы и

время обратно пропорциональны друг другу;

сбор устекинумаба, экспрессированного клеткой, с получением таким образом препарата устекинумаба; и

очистку, концентрирование и/или определение состава препарата устекинумаба для получения лекарственного препарата устекинумаба, если препарат устекинумаба соответствует целевому уровню одного или более гликанов.

В некоторых вариантах осуществления целевой уровень одного или более гликанов представляет собой целевой уровень гликана, выбранного из группы, состоящей из G0F, сиалилированного гликана и G2F. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень одного или более гликанов представляет собой целевой уровень G0F.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают в себя культивирование популяции клеток млекопитающих, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба. В некоторых вариантах осуществления клетки млекопитающих выбраны из клеток CHO, клеток HEK 293, клеток фибросаркомы NT 1080, клеток PER.C6, клеток CAP, клеток НКВ-11, клеток HuH-7, клеток NS0 и клеток SP 2/0.

В некоторых вариантах осуществления в предложенных способах стадию культивирования выполняют с использованием непрерывного процесса культивирования. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают в себя культивирование, которое выполняется с использованием процесса перфузионного культивирования (например, процесса перфузионного культивирования с использованием системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF)). В некоторых определенных вариантах осуществления предложенные способы включают в себя культивирование клеток млекопитающих, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба (например, клетки SP 2/0, которые экспрессируют устекинумаб) с использованием процесса перфузионного культивирования.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы, включающие в себя сбор устекинумаба, экспрессированного клетками, дважды или более раз в пределах диапазона времени, соответствующего времени культивирования клеток.

В некоторых вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 80% G0F относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 25 до 65% G0F относительно общего содержания гликана.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы относятся к изготовлению и/или получению устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G0F в диапазоне от 20 до 40% G0F относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления способ получения устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G0F в диапазоне от 20 до 40% G0F относительно общего содержания гликана, включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации 0 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 7 до 15 дней.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы относятся к изготовлению и/или получению устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G0F в диапазоне от 40 до 80% G0F относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления способ получения устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G0F в диапазоне от 40 до 80% G0F относительно общего содержания гликана, включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации в диапазоне от 15 до 30 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 16 до 60 дней. В некоторых определенных вариантах осуществления время культивирования клеток находится в диапазоне от 25 до 42 дней.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают в себя выбор целевого уровня гликана G0F. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 80% G0F относительно общего содержания гликана. В некоторых определенных вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 40% G0F относительно общего содержания гликана, при этом способ включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации 0 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 7 до 15 дней. В некоторых определенных вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 40 до 80% G0F относительно общего содержания гликана, при этом способ включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации в диапазоне от 15 до 30 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 16 до 60 дней.

В некоторых вариантах осуществления в предложенных способах осуществляется контроль за выбранным уровнем галактозы на протяжении всей стадии культивирования (например, контроль в процессе культивирования с  $t=0$  до сбора).

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы дополнительно включают в себя измерение уровня гликана G0F. В некоторых вариантах осуществления, если измеренный уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 80% G0F относительно общего содержания гликана (например, в диапазоне от 20 до 40% G0F относительно общего содержания гликана, например в диапазоне от 40 до 80% G0F относительно общего содержания гликана), то проводится стадия очистки, концентрирования и/или определения состава препарата устекинумаба.

Эти и другие аспекты изобретения более подробно описаны ниже и в пунктах формулы изобретения.

### Краткое описание графических материалов

Включенные в настоящий документ чертежи, состоящие из следующих фигур, предназначены только для иллюстрации и не носят ограничительного характера.

На фиг. 1 представлено сравнение профилей гликанов различных препаратов и источников устекинумаба. Содержание гликана G0F приведено на левой верхней панели; содержание гликана G1F-A приведено на правой верхней панели; содержание гликана G1F-B приведено на левой нижней панели; а общий уровень сиалилирования приведен на правой нижней панели. Сплошными кружками обозначены стандартные белковые препараты ("RPP") из США (черные сплошные кружки) и Европы (заштрихованные сплошные кружки). Символы в крайней правой части каждой панели относятся к исследуемым препаратам устекинумаба, которые были культивированы в разных объемах. Сплошными заштрихованными квадратами обозначены образцы, культивированные в 3 л, белыми квадратами обозначены образцы из сателлитной культуры, сплошными треугольниками обозначены образцы, культивированные в 100 л, и сплошными ромбами обозначены образцы, культивированные в 250 л. Относительное содержание каждого гликана отражено на соответствующей панели, при этом образцы на каждой панели подразделяли на четыре группы, приведенные по оси x слева направо: группа 1 RPP из стандартных образцов 90 мг/мл (крайняя слева), группа 2 RPP из стандартных образцов 90 мг/мл (вторая слева), 5 мг/мл RPP (третья слева) и исследуемые препараты устекинумаба (крайняя справа).

На фиг. 2 представлено изменение профиля гликана G0F в зависимости от продолжительности сбора. Крайний слева столбец (белый) отражает содержание RPP G0F группы 1, второй столбец слева (черный) обозначает численность RPP G0F группы 2, третий столбец слева обозначает среднее содержание G0F в образцах, культивированных за период от 7 до 42 дней. Заштрихованные столбцы (начиная с четвертого столбца слева и далее до крайнего справа столбца) отражают содержание G0F в образцах, культивированных в течение указанного числа дней в диапазоне от 7 дней (D7) до 42 дней (D42, крайний справа столбец).

На фиг. 3 представлено сравнение профилей основных гликанов и их заряженных вариантов в различных условиях культивирования. Вдоль оси x каждой панели слева направо приведены группа 1 RPP (крайняя слева), группа 2 RPP, устекинумаб, культивированный в 3 л DS, устекинумаб, культивированный в 100 л DS, устекинумаб, культивированный в 250 л DS, препарат устекинумаба NCM-2 и препарат устекинумаба NCM-1 (крайний справа).

### Некоторые определения

Если прямо не указано иное, используемая в настоящем изобретении терминология в целом соответствует ее общепринятым в данной области значениям. Ниже приведены определения некоторых терминов в явной форме; значения этих и других терминов в конкретных случаях в данном изобретении будут очевидны специалистам в данной области из контекста.

Чтобы настоящее изобретение было более понятным, ниже сначала приведены некоторые определения терминов. Дополнительные определения представленных ниже терминов и других терминов приведены в тексте описания.

В настоящем изобретении термины "около" или "приблизительно", применяемые к одной или более интересующим величинам, означает величину, аналогичную указанной стандартной величине. В определенных вариантах осуществления термин "приблизительно" или "около" обозначает диапазон величин, которые находятся в пределах 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или меньше от указанной стандартной величины.

Термины "контрольный", "контролируемый", "контролирующий", используемые в настоящем изобретении в отношении контроля целевого уровня одного или более гликанов (например, галактозы, например, G0F) устекинумаба, означают выбор, сохранение и/или корректировку одного или более условий культивирования для получения устекинумаба. Коррекция может включать в себя увеличение или уменьшение для одного или более условий культивирования при получении устекинумаба. В настоящем изобретении контролируемый целевой уровень одного или более гликанов относится к получению устекинумаба с желаемым уровнем одного или более гликанов с минимальным отклонением продукта. В некоторых вариантах осуществления контролируемый целевой уровень G0F меняется в зависимости от образца для одного и того же производственного цикла и/или партии не более чем на 20, 15, 10 или 5%. В некоторых вариантах осуществления контроль целевого уровня одного или более гликанов обеспечивает однородность характеристик получения устекинумаба (например, однородность характеристик от партии к партии, однородность характеристик образцов, полученных от какого-либо конкретного процесса производства).

В настоящем изобретении термин "гликан" относится к соединению, содержащему по меньшей мере один остаток сахара (например, моносахарид). Гликаны могут представлять собой мономеры или полимеры из остатков сахаров и могут быть линейными или разветвленными. Гликан может включать в себя природные остатки сахаров (например, глюкозу, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилманнозамин, маннозу, фукозу, гексозу, арабинозу, рибозу, ксилозу и т.д.) и/или модифицированные сахара (например, 2'-фторрибозу, 2'-дезоксирибозу, фосфоманнозу, 6'-сульфо-N-ацетилглюкозамин и т.д.). Термин "гликан" включает в себя гомополимеры и гетерополимеры остатков сахаров. Термин "гликан" также охва-

тывает гликановый компонент гликоконъюгата (например, гликопротеин, гликолипид, протеогликан и т.д.). Термин также охватывает свободные гликаны, включая гликаны, которые были отщеплены или иным образом высвобождены из гликоконъюгата.

В настоящем изобретении термин "галактозилированный гликан" относится к гликану, который включает в себя по меньшей мере один остаток сахара галактозы. В некоторых вариантах осуществления галактозилированный гликан представляет собой гликан G1, G2, G1F, G2F, A1 и/или A2. К негалактозилированным гликанам относятся G0F или G0. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень галактозилированного гликана может относиться к наличию галактозилированного гликана (например, G2F) и/или к целевому уровню негалактозилированного гликана (например, G0F).

В настоящем изобретении термин "выделенный" обозначает вещество и/или объект, который был

(1) отделен от по меньшей мере некоторых из компонентов, с которыми он был связан при первоначальном получении (в природе и/или в экспериментальных условиях); и/или

(2) создан, произведен, приготовлен и/или изготовлен человеком.

Выделенные вещества и/или объекты могут быть отделены от приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более чем приблизительно 99% других компонентов, с которыми они были первоначально связаны. В некоторых вариантах осуществления выделенные агенты имеют степень чистоты, равную приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более чем приблизительно 99%. В настоящем изобретении вещество является "чистым", если оно по существу не содержит других компонентов. В некоторых вариантах осуществления, как будет понятно специалистам в данной области, вещество может по-прежнему рассматриваться как "выделенное" или даже "чистое" после объединения с определенными другими компонентами, такими как, например, один или более носителей или эксципиентов (например, буфером, растворителем, водой и т.д.); в таких вариантах осуществления процент выделения или чистоты вещества рассчитывается без включения таких носителей или эксципиентов. В качестве лишь одного примера в некоторых вариантах осуществления биологический полимер, например полипептид или полинуклеотид, встречающийся в природе, считается "выделенным", когда

а) по природе своего происхождения или источника получения он не связан с некоторыми или со всеми компонентами, сопровождающими его интактно в природе;

б) он является по существу свободным от других полипептидов или нуклеиновых кислот того же биологического вида из числа видов, которые его продуцируют в природе;

с) он экспрессируется или иным способом связан с компонентами клетки или иной экспрессионной системы, которая не относится к тем биологическим видам, которые его продуцируют в природе.

Таким образом, например, в некоторых вариантах осуществления полипептид, полученный путем химического синтеза или синтеза в клеточной системе, отличной от продуцирующей его в природе, считается "выделенным" полипептидом. Альтернативно или дополнительно в некоторых вариантах осуществления полипептид, который был подвергнут очистке с использованием одного или более способов, может рассматриваться как "выделенный" полипептид в соответствии со степенью его отделения от других компонентов,

а) с которыми он связан в природе; и/или

б) с которыми он был связан при первоначальном получении.

В настоящем изобретении термин "технологический подход" относится к элементу процесса культивирования (например, к одному или более условиям культивирования), который можно контролировать для увеличения или уменьшения содержания одного или более гликанов в продукте антитела. В настоящем изобретении предложен новый технологический подход, который опирается на использование установленного соотношения между концентрацией галактозы в культуральной среде и временем культивирования. Как описано в настоящем изобретении, обратно пропорциональное соотношение между концентрацией галактозы в культуральной среде и временем культивирования в культуральной среде можно использовать как технологический подход для получения устекинумаба с целевым уровнем одного или более гликанов (например, галактозилирование). В некоторых вариантах осуществления технологический подход включает в себя выбранный уровень галактозы и время культивирования клеток для контроля уровня одного или более гликанов (например, галактозилирование, например, G0F) устекинумаба (например, уровень одного или более гликанов в культуре или препарате устекинумаба).

В настоящем изобретении термин "сайт N-гликозилирования Fc-области" относится к аминокислотному остатку в Fc-области, с которым N-связан гликан. В некоторых определенных вариантах осуществления сайт N-гликозилирования устекинумаба находится в тяжелой цепи в положении Asn299.

Как правило, в настоящем изобретении термин "белок" означает полипептид (т.е. цепь из по меньшей мере двух аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями). Белки могут включать в

себя фрагменты помимо аминокислот (например, могут представлять собой гликопротеины) и/или могут быть обработаны или модифицированы иным образом. Специалистам в данной области будет очевидно, что "белок" может представлять собой полную полипептидную цепь, продуцируемую клеткой (с сигнальной последовательностью или без нее), или может представлять собой ее функциональный участок. Специалистам в данной области дополнительно будет очевидно, что иногда белок может включать в себя более одной полипептидной цепи, например связанной одной или более дисульфидными связями или связанной другими способами.

В настоящем изобретении термин "извлечение" обозначает процесс перевода агента или объекта в состояние, по существу свободное от других ранее связанных компонентов, например, посредством выделения, например, с использованием методик очистки, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления агент или объект извлекают из природного источника и/или источника, содержащего клетки.

В настоящем изобретении термин "образец (образцы)" относится к отдельно полученным образцам. В некоторых вариантах осуществления оценка отдельных образцов включает в себя оценку образцов из одного и того же цикла культивирования (например, в разные моменты времени в процессе приготовления) или из разных циклов культивирования (например, в разные циклы культивирования).

В настоящем изобретении термин "целевое значение или целевой уровень" обозначает предварительно заданный уровень одного или более конкретных гликанов, таких как галактозилированные гликаны и/или сиалилированные гликаны. В некоторых вариантах осуществления целевое значение представляет собой уровень одного или более конкретных гликанов, таких как галактозилированные гликаны (например, G0, G1, G2, G0F, G1F, G2F или комбинации) и/или сиалилированные гликаны (например, моносиалилированные, дисиалилированные или комбинации), в стандартном продукте устекинумаба или значение приведено в описании или в сводном протоколе сопровождения партии фармацевтического продукта. В некоторых определенных вариантах осуществления целевое значение представляет собой уровень гликанов G0F в продукте устекинумаба.

В некоторых вариантах осуществления целевое значение относится к абсолютному уровню (например, числу молей) одного или более гликанов (например, галактозилированных гликанов (например, одного или более видов галактозилированных гликанов) и/или сиалилированных гликанов (например, одного или более видов сиалилированных гликанов)) в препарате устекинумаба. В некоторых вариантах осуществления целевое значение относится к уровню одного или более гликанов (например, галактозилированных гликанов (например, одного или более видов галактозилированных гликанов) и/или сиалилированных гликанов (например, одного или более видов сиалилированных гликанов)) в препарате устекинумаба по отношению к общему уровню гликана в препарате устекинумаба. В некоторых вариантах осуществления целевое значение выражено как "процент", который относится к числу молей одного или более гликанов (например, гликанов Fc) по отношению к общему числу молей гликанов (например, гликанов Fc) в препарате устекинумаба. В некоторых вариантах осуществления "процент" относится к числу молей одного или более PNGаза F-высвобожденных гликанов Fc по отношению к общему числу молей обнаруженных PNGаза F-высвобожденных гликанов Fc.

В настоящем изобретении термин "препарат устекинумаба" относится к смеси белков устекинумаба, полученных в соответствии с конкретным способом получения. Белки устекинумаба в препарате устекинумаба включают в себя множество копий устекинумаба (т.е. имеющих одинаковую или по существу одинаковую аминокислотную последовательность), но со смесью гликанов, связанных с белком. В некоторых случаях препарат устекинумаба готовят с использованием способа и/или системы, описанной в настоящем изобретении. Способы получения могут включать в себя стадию приготовления с помощью рекомбинантных технологий с использованием культивированных клеток, сконструированных таким образом, чтобы они экспрессировали устекинумаб (или экспрессировали устекинумаб на соответствующем уровне или в соответствующих условиях). В некоторых вариантах осуществления способ получения может включать в себя стадию выделения, в ходе которой устекинумаб отделяют от определенных компонентов сконструированных клеток (например, посредством лизиса клеток и осаждения белкового компонента центрифугированием). В некоторых вариантах осуществления способ получения также может включать в себя стадию очистки, в ходе которой устекинумаб отделяют (например, хроматографией) от других клеточных компонентов, например от других белков или органических компонентов, которые использовали на предшествующих стадиях. Следует понимать, что эти стадии не имеют ограничительного характера и что может быть включено любое число дополнительных стадий получения. Разные препараты устекинумаба могут быть приготовлены одним и тем же способом производства, но в разное время (например, в разных циклах или препаратах). Альтернативно разные препараты устекинумаба могут быть приготовлены разными способами производства. Двум способам получения могут быть присущи любые отличия (например, экспрессионный вектор, тип сконструированных клеток, условия культивирования, процедура выделения, условия очистки и т.д.).

Вся литература и аналогичные материалы, цитируемые в настоящей заявке, включая без ограничений патенты, заявки на патенты, статьи, книги, научные трактаты и веб-страницы, независимо от формата такой литературы и аналогичных материалов, полностью включены в настоящий документ путем

ссылки. В случае если один или более из включенной в настоящий документ литературы и аналогичных материалов отличаются от настоящей заявки или противоречат ей, включая без ограничений определенные термины, использование терминов, описанные методики и т.п., данная заявка имеет преобладающую силу. В настоящем изобретении заголовки разделов служат исключительно для целей структурирования документа и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объект изобретения.

#### **Подробное описание определенных вариантов осуществления**

В настоящем изобретении по меньшей мере частично приведено открытие технологических подходов для получения устекинумаба, имеющего целевые уровни одного или более гликанов (например, галактозилирование, например, гликаны G0F). Контроль состава и уровней гликанов в процессе получения антител по-прежнему является проблемой. Гликозилирование терапевтических антител может влиять на их безопасность и/или эффективность (Zhang et al. (2016), *Drug Discovery Today*, 21(5):740-765). Соответственно важно иметь возможность обеспечить однородность состава гликанов при получении устекинумаба (например, однородность характеристик в разных партиях, однородность характеристик образцов, полученных в каком-либо конкретном производственном процессе). В ходе исследования характеристик стандартного белка продукта устекинумаба ("RPP") были обнаружены две отдельные популяции гликанов RPP устекинумаба.

В настоящем изобретении приведена разработка подходов для контроля состава гликанов в процессе изготовления устекинумаба. В настоящем изобретении описаны технологические подходы для получения устекинумаба с целевыми уровнями конкретных гликанов, при этом идентифицирован профиль гликанов в каждом из RPP. В процессе разработки представленных подходов в настоящем изобретении определяется взаимосвязь между концентрацией галактозы в культуральной среде и временем культивирования. Настоящее изобретение дает представление о том, что взаимосвязь между концентрацией галактозы в культуральной среде и временем культивирования (например, непрерывного культивирования) можно использовать как технологический подход для контроля целевого уровня одного или более гликанов (например, галактозилирование) в устекинумабе в культуре.

Настоящее изобретение дополнительно дает представление о том, что для контроля уровня гликанов (например, галактозилирование) может использоваться обратная пропорциональная зависимость между уровнем галактозы и временем (т.е. продолжительностью культивирования). Способы культивирования по настоящему изобретению для контроля состава гликанов включают в себя способы непрерывного культивирования (например, перфузионное культивирование).

Устекинумаб.

В настоящем изобретении частично предложены способы и процессы изготовления, приготовления, контроля или иного получения устекинумаба с конкретными профилями гликанов.

Устекинумаб представляет собой антитело, которое специфически связывается с субъединицей p-40 как IL-12, так и IL-23. Исследовали применение устекинумаба при ряде заболеваний человека, включая псориаз, псориатический артрит, болезнь Крона и рассеянный склероз.

В некоторых вариантах осуществления устекинумаб включает в себя последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, которые отличаются не более чем на 3 аминокислотных остатка от последовательностей HCDR, как указано в SEQ ID NO: 1, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, которые отличаются не более чем на 3 аминокислотных остатка от последовательностей LCDR, как указано в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления устекинумаб включает в себя последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, которые отличаются не более чем на 2 аминокислотных остатка или не более чем на 1 аминокислотный остаток от последовательностей HCDR, как указано в SEQ ID NO: 1, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, которые отличаются не более чем на 2 аминокислотных остатка или не более чем на 1 аминокислотный остаток от последовательностей LCDR, как указано в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления устекинумаб включает в себя переменный домен тяжелой цепи, который отличается не более чем на 3 аминокислотных остатка от последовательности, как указано в SEQ ID NO: 1, и переменный домен легкой цепи, который отличается не более чем на 3 аминокислотных остатка от последовательности, как указано в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления устекинумаб включает в себя переменный домен тяжелой цепи, включающий в себя последовательность, которая отличается не более чем на 5 аминокислотных остатков от последовательности, как указано в SEQ ID NO: 1, и переменный домен легкой цепи, включающий в себя последовательность, которая отличается не более чем на 5 аминокислотных остатков от последовательности SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления устекинумаб включает в себя последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 1, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления устекинумаб включает в себя переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления устекинумаб включает в себя тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1, и/или легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 1, последовательность тяжелой цепи устекинумаба (жирным шрифтом выделена по-

следовательность варибельного домена с подчеркнутыми последовательностями CDR):

**EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWIGI**  
**MSPVDSDIRYSPSQGVTTMSVDKSIITAYLQWNSLKASDTAMYCYARRRPGQGY**  
**EDFWGQGTLVTVSSSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA**  
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDK  
 THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKA  
 KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL  
 DSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 2, последовательность легкой цепи устекинумаба (жирным шрифтом выделена последовательность варибельного домена с подчеркнутыми последовательностями CDR):

**DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASS**  
**LQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCOQYNIYPYTFGQGTKLEIKRTVA**  
 APSVFIFFPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Способы культивирования.

В некоторых случаях в изобретении предложены способы изготовления фармацевтической композиции, содержащей устекинумаб, имеющий целевой уровень одного или более гликанов, причем способ включает в себя

выбор уровня галактозы и времени культивирования клеток, при этом уровень галактозы и время обратно пропорциональны друг другу;

культивирование популяции клеток, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба в условиях, включающих выбранный уровень галактозы и время;

сбор устекинумаба, экспрессированного популяцией клеток, с получением таким образом препарата устекинумаба; и

очистку, концентрирование и/или определение состава препарата устекинумаба для получения фармацевтической композиции, содержащей устекинумаб, если препарат соответствует целевому уровню одного или более гликанов.

В некоторых вариантах осуществления целевой уровень одного или более гликанов представляет собой целевой уровень гликана, выбранного из группы, состоящей из G0F, сиалилированного гликана и G2F. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень одного или более гликанов представляет собой целевой уровень G0F.

В некоторых случаях в изобретении предложены способы получения лекарственного препарата устекинумаба, имеющего целевой уровень одного или более гликанов, причем способ включает в себя

культивирование популяции клеток, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба в определенных условиях, при этом условия характеризуются параметрами, включающими в себя выбранный уровень галактозы и время культивирования клеток, и при этом уровень галактозы и время обратно пропорциональны друг другу;

сбор устекинумаба, экспрессированного клеткой, с получением таким образом препарата устекинумаба; и

очистку, концентрирование и/или определение состава препарата устекинумаба для получения лекарственного препарата устекинумаба, если препарат устекинумаба соответствует целевому уровню одного или более гликанов.

В некоторых вариантах осуществления целевой уровень одного или более гликанов представляет собой целевой уровень гликана, выбранного из группы, состоящей из G0F, сиалилированного гликана и G2F. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень одного или более гликанов представляет собой целевой уровень G0F.

В некоторых вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 80% G0F относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 25 до 65% G0F относительно общего содержания гликана.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы относятся к изготовлению и/или получению устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G0F в диапазоне от 20 до 40% G0F относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления способ получения устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G0F в диапазоне от 20 до 40% G0F относительно общего содержания гликана, включает в себя выбранный уровень галактозы при 0 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 7 до 15 дней.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы относятся к изготовлению и/или получению устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G0F в диапазоне от 40 до 80% G0F относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления способ получения устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G0F в диапазоне от 40 до 80% G0F относительно общего со-

держания гликана, включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации в диапазоне от 15 до 30 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 16 до 60 дней. В некоторых определенных вариантах осуществления время культивирования клеток находится в диапазоне от 25 до 42 дней.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы дополнительно включают в себя выбор целевого уровня гликана G0F. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 80% G0F относительно общего содержания гликана. В некоторых определенных вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 40% G0F относительно общего содержания гликана, при этом способ включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации 0 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 7 до 15 дней. В некоторых определенных вариантах осуществления целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 40 до 80% G0F относительно общего содержания гликана, при этом способ включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации в диапазоне от 15 до 30 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 16 до 60 дней.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы дополнительно включают в себя измерение уровня гликана G0F. В некоторых вариантах осуществления, если измеренный уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 80% G0F относительно общего содержания гликана (например, в диапазоне от 20 до 40% G0F относительно общего содержания гликана, например в диапазоне от 40 до 80% G0F относительно общего содержания гликана), то проводится стадия очистки, концентрирования и/или определения состава препарата устекинумаба.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы изготовления и/или получения устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана, в том числе целевой уровень сиалилированного гликана и/или гликана G2F. В табл. 1 ниже предложены условия для устекинумаба с целевыми уровнями сиалилированного гликана и/или гликана G2F.

Таблица 1

Примеры условий получения препаратов устекинумаба с целевыми уровнями G2F и сиалилированных гликанов

Набор гликанов	G2F	Общее сиалилирование
NCM-1 (0 мМ галактозы, время культивирования 7-15 дней)	> 5%-10%	> 15%-30%
NCM-2 (15-30 мМ галактозы, время культивирования 25-60 дней)	1%-5%	5%-15%

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы относятся к изготовлению и/или получению устекинумаба, имеющего целевой уровень сиалилированного гликана в диапазоне от 15 до 30% сиалилированного гликана относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления способ получения устекинумаба, имеющего целевой уровень сиалилированного гликана в диапазоне от 15 до 30% сиалилированного гликана относительно общего содержания гликана, включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации 0 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 7 до 15 дней.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы относятся к изготовлению и/или получению устекинумаба, имеющего целевой уровень сиалилированного гликана в диапазоне от 5 до 15% сиалилированного гликана относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления способ получения устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G0F в диапазоне от 5 до 15% сиалилированного гликана относительно общего содержания гликана, включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации в диапазоне от 15 до 30 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 16 до 60 дней. В некоторых определенных вариантах осуществления время культивирования клеток находится в диапазоне от 25 до 42 дней.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы относятся к изготовлению и/или получению устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G2F в диапазоне от 5 до 10% G2F относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления способ получения устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G2F в диапазоне от 5 до 10% G2F относительно общего содержания гликана, включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации 0 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 7 до 15 дней.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы относятся к изготовлению и/или получению устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G2F в диапазоне от 1 до 5% G0F относительно общего содержания гликана. В некоторых вариантах осуществления способ получения устекинумаба, имеющего целевой уровень гликана G2F в диапазоне от 1 до 5% G2F относительно общего содержания гликана, включает в себя выбранный уровень галактозы при концентрации в диапазоне от 15 до 30 мМ и времени культивирования клеток в диапазоне от 16 до 60 дней. В некоторых определенных вариантах осуществления время культивирования клеток находится в диапазоне от 25 до 42 дней.

В некоторых вариантах осуществления в предложенных способах осуществляется контроль за вы-

бранным уровнем галактозы на протяжении всей стадии культивирования (например, контроль в процессе культивирования с  $t=0$  до сбора).

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают в себя культивирование популяции клеток млекопитающих, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба. В некоторых вариантах осуществления клетки млекопитающих выбраны из клеток CHO, клеток НЕК 293, клеток фибросаркомы HT 1080, клеток PER.C6, клеток CAP, клеток НКВ-11, клеток НуН-7, клеток NS0 и клеток SP 2/0.

В некоторых вариантах осуществления в предложенных способах стадию культивирования выполняют с использованием непрерывного процесса культивирования. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают в себя культивирование, которое выполняется с использованием процесса перфузионного культивирования (например, процесса перфузионного культивирования с использованием системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF)). В некоторых определенных вариантах осуществления предложенные способы включают в себя культивирование клеток млекопитающих, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба (например, клетки SP 2/0, которые экспрессируют устекинумаб) с использованием процесса перфузионного культивирования.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы, включающие в себя сбор устекинумаба, экспрессированного клетками, дважды или более раз в пределах диапазона времени, соответствующего времени культивирования клеток.

В некоторых вариантах осуществления целевое значение представляет собой предварительно заданную спецификацию фармацевтического продукта или критерий контроля качества для фармацевтического препарата, например сертификат анализа (CoFA), сертификат испытаний (CoIT) или сводный протокол сопровождения партии. В некоторых вариантах осуществления спецификация продукта представляет собой описание продукта на листке-вкладыше Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США, листке-вкладыше для врача, в статье Фармакопеи США или статье Европейской фармакопеи.

По существу способы культивирования клеток настоящего изобретения включают в себя культивирование при температуре в диапазоне от 25 до 40°C и при силе тяжести, действующей на поверхности земли. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы культивирования популяции клеток достаточны для экспрессии продукта устекинумаба. Среда для культивирования клеток по существу содержит соответствующий источник энергии и соединения, регулирующие клеточный цикл. По существу культуральная среда включает в себя, например, аминокислоты, витамины, неорганические соли и глюкозу, известные специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления pH клеточной культуральной среды составляет от 6 до 8. Среды для культивирования животных клеток хорошо известны в данной области и постоянно оптимизируются специалистами в данной области для конкретной цели и/или типа клеток.

В некоторых вариантах осуществления способы настоящего изобретения включают в себя культивирование популяции клеток посредством системы непрерывного культивирования клеток (например, системы перфузионного культивирования клеток). В некоторых вариантах осуществления система непрерывного культивирования клеток включает в себя резервуар биореактора и устройство для удержания клеток. В некоторых вариантах осуществления система непрерывного культивирования клеток включает в себя резервуар биореактора, устройство для удержания клеток, источник среды и сток для сбора отходов. В некоторых вариантах осуществления система непрерывного культивирования клеток включает в себя популяцию клеток (например, популяцию клеток, сконструированную для экспрессии устекинумаба, например, популяцию клеток, состоящую из клеток, сконструированных для экспрессии устекинумаба) и клеточные культуральные среды.

В некоторых вариантах осуществления устройство для удержания клеток представляет собой или включает в себя непрерывную центрифугу, фильтр переменного тангенциального потока (ATF), мембранный фильтр тангенциального потока (TFF), динамический фильтр, центробежный фильтр, ультразвуковой и диэлектрофоретический сепаратор или гравитационный отстойник. В некоторых конкретных вариантах осуществления устройство удержания клеток представляет собой или включает в себя ATF.

В некоторых вариантах осуществления система биореактора включает в себя резервуар биореактора с мешалкой, устройство для удержания клеток, источник среды и сток для сбора отходов.

В некоторых вариантах осуществления система биореактора (например, система перфузионного биореактора) включает в себя барботер. В некоторых вариантах осуществления система биореактора включает в себя барботер с просверленными отверстиями. В некоторых вариантах осуществления система биореактора включает в себя барботер с открытой трубкой. В некоторых вариантах осуществления система биореактора включает в себя шоттовский барботер.

В некоторых вариантах осуществления способы настоящего изобретения включают в себя культивирование популяции клеток (например, популяции клеток, сконструированных для экспрессии устекинумаба, например, популяции клеток, состоящей из клеток, сконструированных для экспрессии устекинумаба) в объеме в диапазоне от 1 до 3000 л. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают в себя культивирование клеток млекопитающих, полученных методами генной инженерии.

рии для экспрессии устекинумаба в объеме по меньшей мере 25, 50, 100, 200, 250, 400, 500, 600, 800, 1000 или 2000 л. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают в себя культивирование клеток млекопитающих, полученных методами генной инженерии для экспрессии устекинумаба в объеме от приблизительно 25 л до приблизительно 250 л.

#### Оценка гликанов.

В некоторых вариантах осуществления гликаны устекинумаба анализируют (например, измеряют) любым доступным подходящим способом. В некоторых случаях структуру и композицию гликанов, описанных в настоящем изобретении, анализируют, например, с помощью одного или более из ферментных, хроматографических, масс-спектрометрических (МС), хроматографических с последующей МС, электрофоретических методов, электрофоретических методов с последующей МС, методов ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и их комбинаций. Примеры ферментативных способов включают в себя взаимодействие препарата устекинумаба с одним или более ферментами в условиях и в течение времени, достаточных для высвобождения одного или более гликана(ов) (например, одного или более доступного (-ых) гликана(ов)). В некоторых случаях один или более ферментов включают в себя PNGазу F. Примеры хроматографических способов включают в себя, без ограничений, активную анионообменную хроматографию с импульсным амперометрическим датчиком (SAX-PAD), жидкостную хроматографию (ЖХ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), сверхэффективную жидкостную хроматографию (СВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), колоночную амидную хроматографию и их комбинации. Примеры масс-спектрометрии (МС) включают в себя, без ограничений, тандемную МС, ЖХ-МС, ЖХ-МС/МС, масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS), масс-спектрометрию с преобразованием Фурье (FTMS), разделение по ионной подвижности с масс-спектрометрией (IMS-MS), диссоциацию с переносом электронов (ETD-MS) и их комбинации. Примеры электрофоретических способов включают в себя, без ограничений, капиллярный электрофорез (КЭ), КЭ-МС, гель-электрофорез, электрофорез в агарозном геле, электрофорез в акриламидном геле, электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) с последующим вестерн-блоттингом с использованием антител, которые распознают конкретные структуры гликанов, и их комбинации. Примеры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) включают в себя, без ограничений, одномерный ЯМР (1D-ЯМР), двухмерный ЯМР (2D-ЯМР), ЯМР с вращением образца под магнитическим углом с корреляционной спектроскопией (COSY-NMR), ЯМР с полной корреляционной спектроскопией (TOCSY-NMR), ЯМР с гетероядерной одноквантовой когерентностью (HSQC-NMR), ЯМР с гетероядерной многоквантовой когерентностью (HMQC-NMR), ротационный ЯМР со спектроскопией ядерного эффекта Оверхаузера (ROESY-NMR), спектроскопию ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY-NMR) и их комбинации.

#### Клетки.

В способах, описанных в настоящем изобретении, может использоваться любая клетка-хозяин, которая может использоваться для экспрессии устекинумаба. В некоторых вариантах осуществления клетка, сконструированная для экспрессии устекинумаба, содержит одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих продукт устекинумаба, который включает в себя вариабельный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1, и/или вариабельный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления клетка, сконструированная для экспрессии устекинумаба, содержит одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих продукт устекинумаба, который включает в себя тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1, и/или легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления клетка, сконструированная для экспрессии устекинумаба, содержит одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих продукт устекинумаба, который включает в себя последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 1, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления клетка, сконструированная для экспрессии устекинумаба, содержит одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих продукт устекинумаба, который имеет ту же первичную аминокислотную последовательность, что и одобренный белок, например, в рамках процедуры вторичного одобрения, терапевтического или диагностического использования у людей или животных. В некоторых вариантах осуществления клетка, сконструированная для экспрессии устекинумаба, содержит одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих продукт устекинумаба, который отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 остатков от одобренного терапевтического или диагностического белка. В некоторых вариантах осуществления клетка, сконструированная для экспрессии устекинумаба, содержит одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих белок, который имеет по меньшей мере 90, 95, 98, 99 или 100%-ную идентичность последовательности с одобренным терапевтическим или диагностическим белком. Термины "та же первичная аминокислотная последовательность", "первичная аминокислотная последовательность, которая отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 остатков", "последовательности, которые имеют по меньшей мере 98%-ную или более идентичность последовательности" или аналогичные термины относятся к уровню идентичности между первичными аминокислотными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления препарат или продукт белка содержит аминокислотные варианты, например молекулы, которые отличаются кон-

цевыми остатками, например одним или двумя концевыми остатками. В некоторых вариантах осуществления таких случаев идентичность сопоставляемой последовательности представляет собой идентичность между первичной аминокислотной последовательностью наиболее распространенных (например, наиболее распространенных активных) молекул в каждом из сравниваемых продуктов. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности относится к аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеиновой кислотой, которая может использоваться для получения продукта устекинумаба.

В некоторых вариантах осуществления клетки, сконструированные для экспрессии устекинумаба, представляют собой клетки млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления клетки, сконструированные для экспрессии устекинумаба, представляют собой мышинные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка, сконструированная для экспрессии устекинумаба, получена из мышинной клеточной линии. К мышинным (например, полученным от мыши) клеточным линиям относятся, например клеточные линии мышинной миеломы, например, клетки NS0 и клетки SP 2/0.

В некоторых вариантах осуществления клетки, сконструированные для экспрессии устекинумаба, представляют собой человеческие клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка, сконструированная для экспрессии устекинумаба, получена из человеческой клеточной линии. К человеческим клеточным линиям относятся, например, НЕК 293: эмбриональные клетки почки человека 293; HT-1080: из фибросаркомы с эпителиальным фенотипом; PER.C6: из эмбриональных клеток сетчатки человека, иммортализованных трансфекцией гена аденовируса E1; CAP: из амниоцитов человека, иммортализованных геном аденовируса типа 5 E1; НКВ-11: полученные слиянием НЕК293-S и линии В-клеток человека в присутствии полиэтиленгликоля; и NuH-7: из гепатоцеллюлярной карциномы человека. В некоторых определенных вариантах осуществления чувствительные к сдвиговому воздействию клетки млекопитающих выбраны из клеток НЕК 293, клеток фибросаркомы HT 1080, клеток PER.C6, клеток CAP, клеток НКВ-11 и клеток NuH-7.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, экспрессирующих продукт устекинумаба, как описано в настоящем изобретении, получают с использованием рекомбинантных способов. Рекомбинантная экспрессия гена, такого как ген, кодирующий полипептид, например одиночное антитело, описанный в настоящем изобретении, может включать в себя конструирование экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий полипептид. После получения полинуклеотида вектор продукции полипептида может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием известных в данной области методик. Для конструирования экспрессионных векторов, содержащих последовательности, кодирующие полипептид, и соответствующих сигналов контроля транскрипции и трансляции могут использоваться известные способы. К таким способам относятся, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методики и генетическая рекомбинация *in vivo*.

После получения описанного в настоящем изобретении продукта устекинумаба с помощью рекомбинантной экспрессии его можно очищать любым способом, известным специалистам в данной области, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной и колоночной хроматографии с распределением по размерам), центрифугирования, дифференциальной растворимости или с помощью любой другой стандартной методики очистки белков. Например, устекинумаб можно выделять и очищать посредством соответствующего отбора и комбинации аффинных колонок, например, колонки с белком А, с хроматографическими колонками, фильтрацией, ультрафильтрацией, с помощью процедур высаливания и диализа (см. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Дополнительно, как описано в настоящем изобретении, чтобы упростить очистку, продукт устекинумаба может быть слит с гетерологичными полипептидными последовательностями.

Фармацевтические композиции.

Продукт устекинумаба, полученный или изготовленный с использованием любых из способов, систем и/или процессов, описанных в настоящем изобретении, может быть включен в состав фармацевтической композиции. Такую фармацевтическую композицию можно использовать для профилактики и/или лечения заболеваний. Фармацевтические композиции, содержащие устекинумаб, могут быть составлены способами, известными специалистам в данной области (см., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2000). Фармацевтическую композицию можно вводить парентерально в форме состава для инъекций, содержащего стерильный раствор или суспензию в воде или другую фармацевтически приемлемую жидкость. Например, фармацевтическую композицию можно составить, соответствующим образом комбинируя клеточный продукт (например, рекомбинантный белок, например, гликопротеин, например, отдельное антитело) с фармацевтически приемлемыми носителями или средами, такими как стерильная вода и физиологический солевой раствор, растительное масло, эмульгатор, суспендирующий агент, поверхностно-активное вещество, стабилизатор, ароматизирующий эксципиент, разбавитель, носитель, консервант, связующее вещество, с последующим смешиванием в форме однократной дозы, необходимой для общепринятой фармацевтической практики. Количество активного ингредиента, включенного в фармацевтический препарат, является таким, чтобы обеспечить подходящую дозу в указанном диапазоне.

В некоторых вариантах осуществления препарат устекиномаба включает в себя сахарозу в качестве стабилизатора/регулятора тоничности. В некоторых вариантах осуществления препарат устекиномаба включает в себя гистидин (например, L-гистидин) в качестве буфера. В некоторых вариантах осуществления препарат устекиномаба включает в себя полисорбат-80 в качестве поверхностно-активного вещества. В некоторых определенных вариантах осуществления препарат устекиномаба включает в себя гистидин (например, L-гистидин), сахарозу и полисорбат-80.

В некоторых вариантах осуществления состав препарата устекиномаба предназначен для парентерального введения, например внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления состав препарат устекиномаба предназначен для подкожного введения.

Изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами. Такие примеры приведены исключительно в целях иллюстрации. Их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем или содержание изобретения.

### Примеры

**Пример 1.** Определение сдвига в составе гликанов в продуктах устекиномаба.

В этом примере выявлен значительный сдвиг в составе гликанов в партиях доступных в продаже стандартных белков продуктов устекиномаба ("RPP"). В частности, в настоящем примере продемонстрировано, что изменения в составе гликанов среди партий доступного в продаже устекиномаба можно подразделить на два различных профиля гликанов. Эти две группы вариантов гликанов в настоящем изобретении называются "группой 1", для которой характерен относительно высокий уровень гликана G0F, и "группой 2", для которой характерен относительно низкий уровень гликана G0F.

Анализировали 30 (тридцать) партий устекиномаба RPP. Из этих 30 партий 28 партий были из препаратов с концентрацией 90 мг/мл, а 2 партии были препаратами с концентрацией 5 мг/мл. Было установлено, что из 28 партий с 90 мг/мл устекиномаба RPP в 8 (восьми) из этих партий отмечался профиль гликанов группы 1, а в 20 (двадцати) партий отмечался профиль гликанов группы 2. См. фиг. 1.

Сводная информация о среднем содержании основных соединений гликанов для образцов группы 1 и группы 2 приведена ниже в табл. 2.

Таблица 2

Содержание основных гликанов в образцах устекиномаба группы 1 и группы 2

Гликан (%)	Группа 1	Группа 2
4,3,1,0,0 (G0F)	27,7	62,1
4,4,1,0,0 A (G1F-A)	28,1	14,1
4,4,1,0,0 B (G1F-B)	6,6	3,5
4,4,1,0,1 A	5,4	4,1
4,4,1,0,1 B	3,2	2,9
4,5,1,0,0 (G2F)	8,4	2,3
4,6,1,0,0	1,4	0,2
4,5,1,0,1	6,7	2,1
4,5,1,0,2	2,0	0,9
4,6,1,0,1 B	3,4	0,7
Сумма вышеперечисленного	92,9	92,9

Также анализировали исследуемые продукты устекиномаба, полученные культивированием (например, с помощью процесса перфузионного культивирования с ATF) с 5 мМ галактозы в течение 42 дней при разных объемах в диапазоне от 3 до 250 л. Содержание гликанов в этих исследовательских продуктах устекиномаба показана в крайней справа группе на каждой панели на фиг. 1. Профили гликанов в исследуемых продуктах устекиномаба находились в пределах диапазона для RPP группы 1 и группы 2. Таким образом, в настоящем примере идентифицированы две различные группы профилей гликанов для доступного в продаже устекиномаба RPP и показано, что в современных условиях культивирования получают исследуемые продукты устекиномаба с промежуточными значениями содержания гликанов в пределах диапазонов, характерных для этих двух групп.

**Пример 2.** Время культивирования влияет на состав гликанов в устекиномабе.

В настоящем примере продемонстрировано, что момент сбора является одним из элементов контроля состава гликанов в устекиномабе. Как показано на фиг. 2, содержание гликана G0F относительно общего содержания гликанов обычно снижается по мере увеличения времени культивирования. Например, препараты устекиномаба, собранные через 13 дней культивирования, содержали почти 50% гликанов G0F, тогда как образцы, собранные после 34 или более дней культивирования, содержали менее 30%

гликанов G0F по отношению к общему содержанию гликанов.

Интересно, что в настоящем изобретении приведено подтверждение того, что уменьшение продолжительности культивирования (т.е. времени до сбора) сопровождается увеличением уровня G0F, в то время как увеличение продолжительности культивирования (т.е. времени до сбора) сопровождается снижением уровня G0F.

Таким образом, настоящий пример демонстрирует, что увеличение времени культивирования может привести к уменьшению содержания гликанов G0F по сравнению с общим содержанием гликанов, и дополнительно описано, что время культивирования может меняться для контроля состава гликанов в устекинумабе.

Пример 3. Получение продуктов устекинумаба с профилями гликанов группы 1 и группы 2.

В настоящем примере выявлена обратно пропорциональная зависимость между временем культивирования и концентрацией галактозы в культуральной среде, которая может служить технологическим подходом для контроля уровней гликанов в устекинумабе (например, галактозилирование). В настоящем примере продемонстрировано получение не соответствующих требованиям материалов (т.е. не соответствующих требованиям препаратов устекинумаба) со сконструированными профилями гликанов. В частности, в настоящем примере рассматривается получение двух не соответствующих требованиям препаратов устекинумаба, называемых в настоящем изобретении NCM-1 и NCM-2, которые были сконструированы таким образом, чтобы их профили гликанов совпадали с характеристиками группы 1 RPP и группы 2 RPP соответственно, как описано выше в примере 1.

В частности, препараты NCM-1 получали культивированием (например, с помощью процесса перфузионного культивирования с ATF) в среде без галактозы (0 мМ галактозы) со сбором устекинумаба до 16-го дня культивирования (сбор в моменты времени в пределах диапазона от 7- до 15-го дня). Напротив, препараты NCM-2 получали культивированием (например, с помощью процесса перфузионного культивирования с ATF) в присутствии галактозы в диапазоне от 15 до 30 мМ со сбором устекинумаба после 25-го дня культивирования (например, сбор в моменты времени в пределах диапазона от 34- до 45-го дня). Как показано на фиг. 3, профили гликанов NCM-1 хорошо коррелируют с профилями гликанов группы 1 RPP, а профили гликанов NCM-2 хорошо коррелируют с профилями гликанов группы 2 RPP для каждой из проанализированных молекул гликанов, включая G0F, G1FA, G1FB, G2F, общее сиалилирование, основные, кислые и щелочные гликаны. В табл. 3 приведены примеры целевых диапазонов для каждого гликана, сконструированных посредством контроля на основе технологических подходов с использованием концентрации галактозы и времени культивирования.

Таблица 3

Примеры целевых диапазонов гликанов для препаратов устекинумаба NCM-1 и NCM-2

Набор гликанов	G0F	G1F-A	G1F-B	G2F	Общее сиалилирование
NCM-1 (0 мМ галактозы, время культивирования 7-15 дней)	20%-40%	> 25%-35%	> 5,5%-10%	> 5%-10%	> 15%-30%
NCM-2 (15-30 мМ галактозы, время культивирования 25-60 дней)	> 40%-80%	10%-25%	2%-5,5%	1%-5%	5%-15%

Таким образом, в настоящем примере продемонстрировано, что связанные обратной пропорциональной зависимостью элементы концентрации галактозы и времени культивирования можно использовать в качестве технологических подходов для контроля состава гликанов, а также их можно использовать для получения не соответствующих требованиям препаратов устекинумаба с целевыми уровнями гликанов.

Эквиваленты.

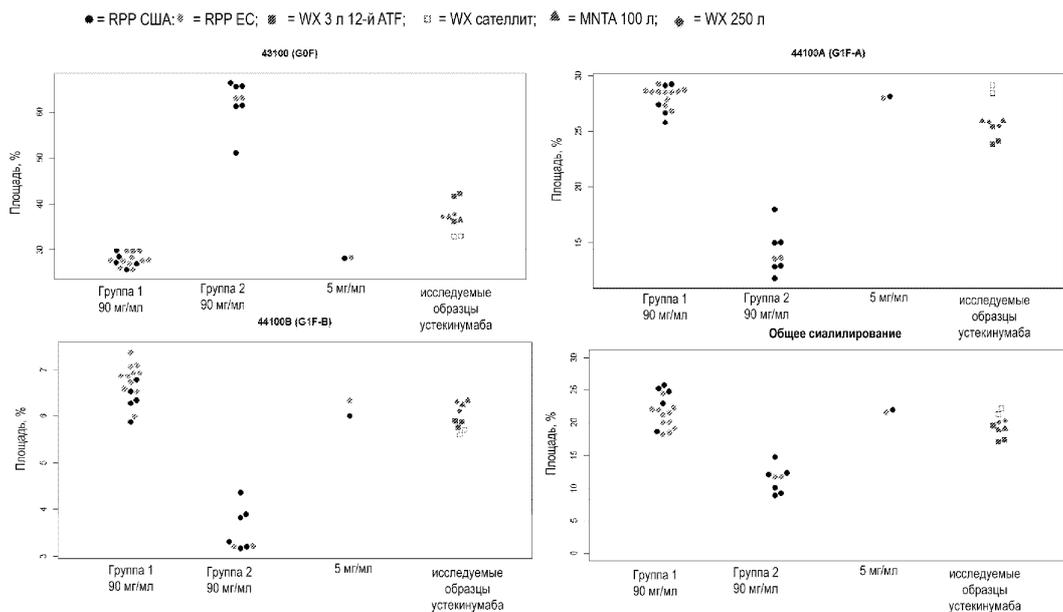
Следует понимать, что несмотря на подробное изложение в настоящем изобретении приведенное выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем настоящего изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей устекинумаб, имеющий целевой уровень гликана G0F, включающий в себя

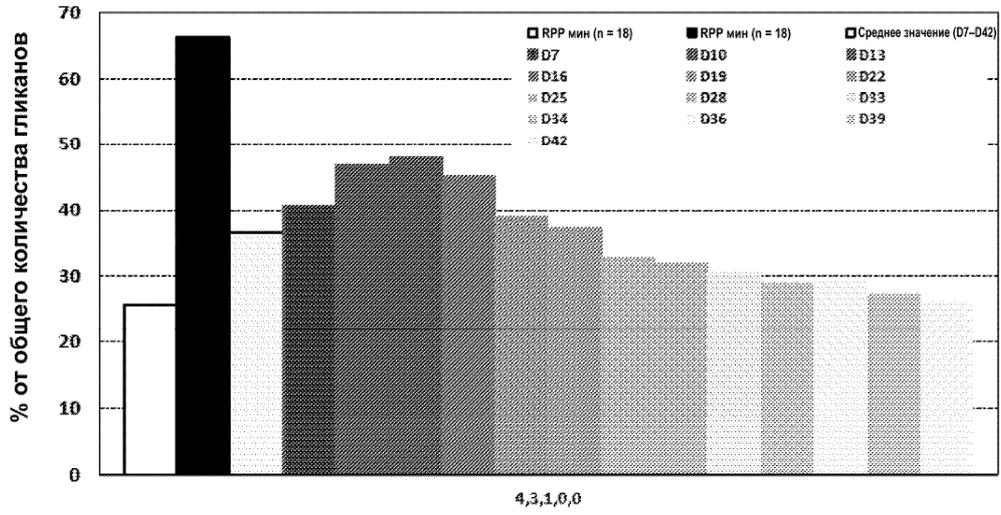
(а) выбор целевого уровня гликана G0F, в котором целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 80% G0F относительно общего содержания гликана;

- (b) выбор уровня галактозы и времени культивирования клеток, чтобы обеспечить выбранный уровень гликана G0F, причем  
уровень галактозы находится в диапазоне от 0 до 30 мМ; и  
время культивирования клеток находится в диапазоне от 7 до 60 дней;
- (c) культивирование популяции клеток, полученных методами генной инженерии, для экспрессии устекинумаба в условиях, включающих выбранный уровень галактозы и время;
- (d) сбор устекинумаба, экспрессированного популяцией клеток, с получением таким образом препарата устекинумаба; и
- (e) очистку, концентрирование и/или определение состава препарата устекинумаба для получения фармацевтической композиции, содержащей устекинумаб, если препарат соответствует целевому уровню гликана G0F.
2. Способ по п.1, в котором культивирование выполняется с использованием процесса перфузионного культивирования.
  3. Способ по п.1 или 2, в котором уровень галактозы составляет 0 мМ.
  4. Способ по п.1 или 2, в котором уровень галактозы составляет от 15 до 30 мМ.
  5. Способ по п.1 или 2, в котором время культивирования клеток находится в диапазоне от 7 до 15 дней.
  6. Способ по п.1 или 2, в котором время культивирования клеток находится в диапазоне от 16 до 60 дней.
  7. Способ по п.1 или 2, в котором целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 20 до 40% G0F относительно общего содержания гликана, при этом выбранный уровень галактозы составляет 0 мМ и при этом время культивирования клеток находится в диапазоне от 7 до 15 дней.
  8. Способ по п.1 или 2, в котором целевой уровень гликана G0F находится в диапазоне от 40 до 80% G0F относительно общего содержания гликана, при этом выбранный уровень галактозы находится в диапазоне от 15 до 30 мМ и при этом время культивирования клеток находится в диапазоне от 16 до 60 дней.
  9. Способ по п.8, в котором время культивирования клеток находится в диапазоне от 25 до 60 дней.
  10. Способ по п.8, в котором время культивирования клеток находится в диапазоне от 25 до 42 дней.
  11. Способ по любому из пп.1-10, дополнительно включающий в себя измерение уровня гликана G0F.
  12. Способ по любому из пп.1-11, в котором популяция клеток, модифицированная методами генной инженерии для экспрессии устекинумаба, представляет собой клетки млекопитающих.
  13. Способ по п.12, в котором клетки млекопитающих выбраны из клеток CHO, клеток НЕК 293, клеток фибросаркомы НТ 1080, клеток PER.C6, клеток САР, клеток НКВ-11, клеток НуН-7, клеток NS0 и клеток SP 2/0.
  14. Способ по любому из пп.1-13, в котором выбранный уровень галактозы контролируется в процессе культивирования с момента  $t=0$  до сбора.
  15. Способ по любому из пп.1-14, в котором устекинумаб, экспрессируемый клетками, собирают два или более раз в пределах диапазона времени культивирования клеток.

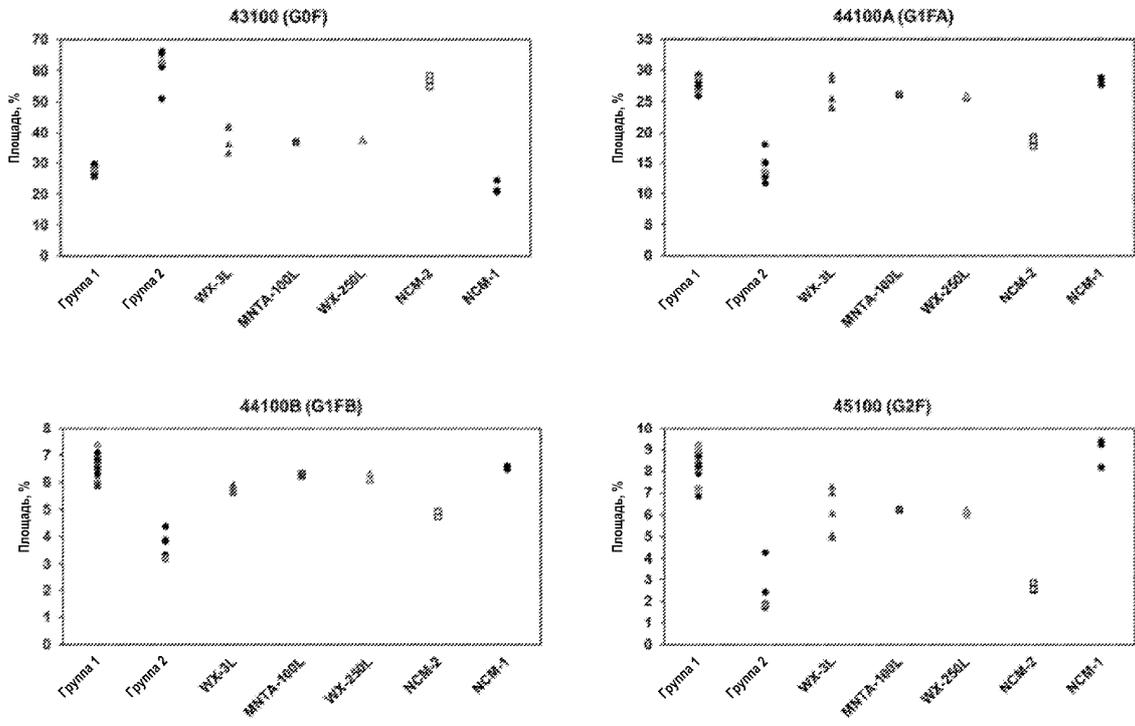


Фиг. 1

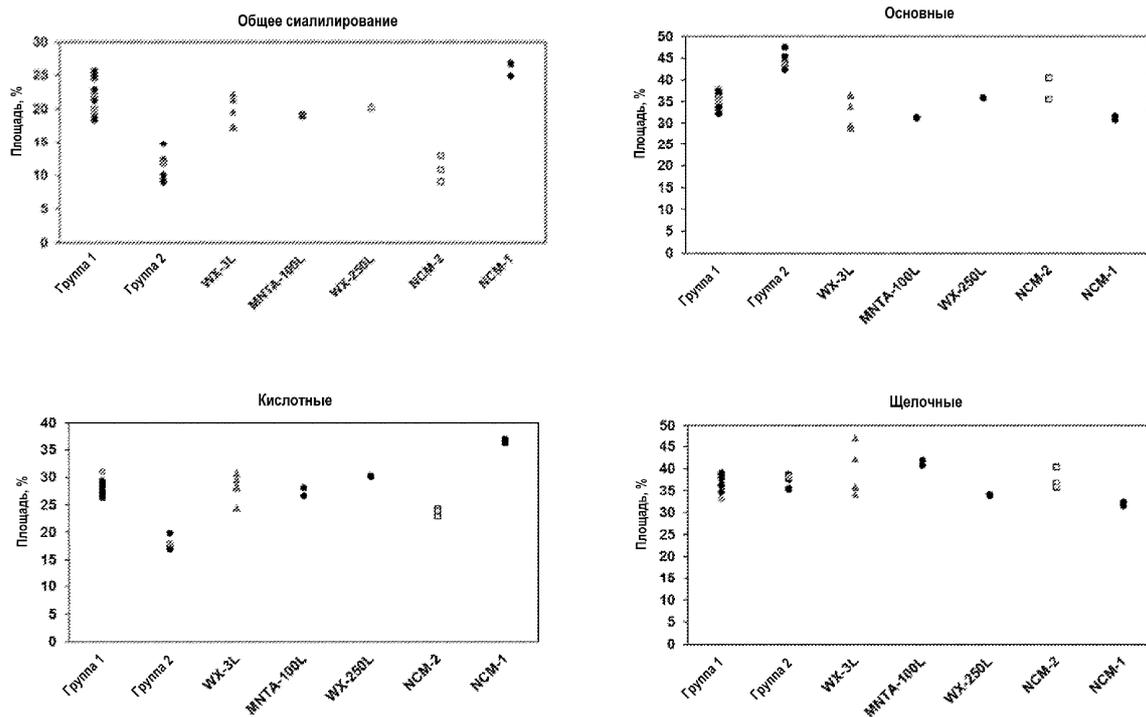
MM16F G0F-R02 репрезентативный цикл



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 3 (продолжение)

