

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393142** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.05.31

(51) Int. Cl. *C12P 21/00* (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.03.26

(54) **ОБЩИЕ АФУКОЗИЛИРОВАННЫЕ ГЛИКОФОРМЫ АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫЕ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК**

(31) **62/648,308**

(32) **2018.03.26**

(33) **US**

(62) **202092286; 2019.03.26**

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Бхебе Принс, Джерумс Мэттью, Лю
Айрин, Кунас Курт (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе предусмотрены способы получения композиции на основе антитела, содержащей общие афукозилированные (TAF) гликоформы на требуемом, или предварительно определенном, или предварительно выбранном уровне. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу и/или глюкозу в определенной концентрации, описанной в данном документе, зависящей от требуемого уровня TAF-гликоформ. Также в данном документе предусмотрены соответствующие композиции, содержащие гликозилированные белки и их TAF-гликоформы. Также предусмотрены среды для культивирования клеток.

A1

202393142

202393142

A1

ОБЩИЕ АФУКОЗИЛИРОВАННЫЕ ГЛИКОФОРМЫ АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫЕ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/648308, поданной 26 марта 2018 г. Содержание каждой заявки включено в данный документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки во всей своей полноте, подается одновременно с настоящей заявкой и обозначен следующим образом: файл в формате ASCII (текстовый) размером 28547 байтов под названием "52249A_Seqlisting.txt," созданный 26 марта 2019 г.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

[0004] Было обнаружено, что гликоформа с высоким содержанием маннозы (НМ) оказывает влияние на фармакокинетические свойства некоторых терапевтических антител (Goetze, et al., (2011) *Glycobiology* 21, 949-59; Yu, et al., (2012) *MAbs* 4, 475-87). НМ-гликоформы не только оказывают влияние на скорость клиренса антител в сыворотке крови, но такие гликоформы, в дополнение к афукозилированным (афуко-) гликоформам, способны оказывать влияние на эффекторную функцию антител или опосредованное антителами уничтожение клеток-мишеней, также известное как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC).

[0005] Множество факторов оказывает влияние на структуру гликанов и, следовательно, на конечную гликозилированную форму (гликоформу) белка (гликопротеина). Например, линия клеток, экспрессирующая антитело, среда для культивирования клеток, состав среды для подпитки и график подпиток во время культивирования клеток способны оказывать влияние на получение гликоформ белка.

[0006] Хотя исследовательскими группами было предложено множество путей влияния на уровни конкретных гликоформ антитела, в биофармацевтической

промышленности все еще существует потребность в простых и эффективных способах регулирования и контроля уровней общих афукозилированных (ТАФ) гликоформ во время получения терапевтических антител с помощью технологии рекомбинантной ДНК.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0007] Впервые описаны данные, демонстрирующие, что концентрация фукозы и/или глюкозы в среде для культивирования клеток, содержащей клетки, продуцирующие рекомбинантный гликозилированный белок (например, антитело или связывающий белок на основе антитела), оказывает влияние на уровень ТАФ-гликоформ продуцируемого рекомбинантного гликозилированного белка. В то время как большие изменения уровня ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка (например, антитела или связывающего белка на основе антитела) могут быть достигнуты посредством регулирования концентрации фукозы в среде для культивирования клеток, содержащей клетки, продуцирующие рекомбинантный гликозилированный белок (например, антитело или связывающий белок на основе антитела), меньшие изменения уровня ТАФ-гликоформ могут быть достигнуты посредством изменения концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток, как описано в данном документе. Также данные демонстрируют, что в то время как концентрация глюкозы в среде для культивирования клеток оказывает влияние на уровни гликанов с высоким содержанием маннозы и афукозилированных гликанов, концентрация фукозы в среде для культивирования клеток оказывает влияние на уровни афукозилированных гликанов, но не влияет на уровни гликанов с высоким содержанием маннозы. Открытие того, что каждый из этих сахаров, отличающихся по химической формуле только на один атом кислорода, приводит к разным эффектам в отношении уровней ТАФ-гликоформ, было неожиданным. Без привязки к конкретной теории поддержание клеток, продуцирующих рекомбинантный гликозилированный белок (например, антитело или связывающий белок на основе антитела) в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу и/или глюкозу в концентрациях, указанных в данном документе, обеспечивает получение композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, антитела или связывающего белка на основе антитела), характеризующейся требуемым, или предварительно определенным, или предварительно выбранным уровнем ТАФ-гликоформ (например, гликанов с высоким содержанием маннозы и афукозилированных гликанов). Соответственно, настоящее изобретение относится к способам получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), содержащей ТАФ-гликоформы на требуемом, или предварительно определенном, или предварительно выбранном уровне.

[0008] В настоящем изобретении предусмотрены способы получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела). В иллюстративных вариантах осуществления способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей

фукозу и/или глюкозу в определенной концентрации, описанной в данном документе, зависящей от требуемого уровня ТАФ-гликоформ.

[0009] В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-гликоформ в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) составляет приблизительно 10% или меньше, и в иллюстративных аспектах способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л.

[0010] В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-гликоформ в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) составляет приблизительно 10% или меньше, и в иллюстративных аспектах способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути.

[0011] В настоящем изобретении также предусмотрены способы получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), включающие поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу и глюкозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и добавление глюкозы в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой, при котором обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше.

[0012] В данном документе предусмотрены композиции на основе рекомбинантных гликозилированных белков (например, композиции на основе антител или композиции на основе связывающих белков на основе антител), полученных с помощью способов по настоящему изобретению. Дополнительно предусмотрены соответствующие фармацевтические композиции и среды для культивирования клеток. В иллюстративных аспектах среда для культивирования клеток содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело (например, антитело IgG), и среда для культивирования содержит фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л или от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л. В некоторых случаях компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически

модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. Необязательно компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кето-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимеразу/-4-редуктазу. Среда для культивирования в некоторых аспектах дополнительно содержит глюкозу в концентрации менее приблизительно 10 г/л, необязательно менее приблизительно 9 г/л или приблизительно 6 г/л или меньше (например, от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4 г/л). В иллюстративных случаях значение pH среды для культивирования составляет от приблизительно 6,85 до приблизительно 7,05, например от приблизительно 6,90 до приблизительно 7,00. В некоторых случаях среда для культивирования клеток не содержит маннозу. В определенных аспектах антитело представляет собой антитело IgG1. В иллюстративных аспектах антитело является специфичным к опухолеассоциированному антигену, такому как антиген, содержащий SEQ ID NO: 3.

[0013] В данном документе дополнительно предусмотрены способы изменения или модулирования уровня TAF-гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает: (A) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, для снижения уровня TAF-гликанов; (B) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы менее приблизительно 10 г/л для повышения уровня TAF; или (C) комбинацию как (A), так и (B).

[0014] Также предусмотрены способы модулирования уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает: (A) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, для снижения уровня афукозилированных гликанов; (B) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы приблизительно 10 г/л или меньше для повышения уровня афукозилированных гликанов; или (C) комбинацию как (A), так и (B).

[0015] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ модулирования уровня гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) в композиции на

основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы менее приблизительно 10 г/л для повышения уровня НМ-гликанов.

[0016] В настоящем изобретении также предусмотрены способы модулирования уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающие снижение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 1,2, для снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 2%, или повышение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 1,2, для повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 2%.

[0017] В настоящем изобретении предусмотрены способы снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%, включающие снижение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2.

[0018] Дополнительно предусмотрены способы снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1%, включающие снижение значения рН среды для культивирования клеток на приблизительно 0,03-0,07.

[0019] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%, включающие повышение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от

приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2.

[0020] Также предусмотрены способы повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1%, включающие повышение значения рН среды для культивирования клеток на приблизительно 0,03-0,07.

[0021] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы модулирования уровня TAF-гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающие модулирование, снижение или повышение уровня афукозилированных гликанов в композиции в соответствии с раскрытым в данном документе способом модулирования, снижения или повышения уровня афукозилированных гликанов.

[0022] В настоящем изобретении предусмотрен способ получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), где уровень афукозилированных гликанов в композиции составляет от приблизительно 6,2% до приблизительно 8,4%, при этом способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток при значении рН от более 7,05 до менее 7,2, где (A) значение рН среды для культивирования клеток изменяют на менее 0,15 (необязательно на менее 0,10) в течение периода культивирования, или (B) температуру среды для культивирования клеток изменяют на не более 2 градуса С, или способ не включает культивирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей марганец или бетаин, или (D) комбинацию двух или трех из (A), (B) и (C).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0023] Фиг. 1А представляет собой иллюстрацию трех типов N-гликанов (олигоманнозного, комплексного и гибридного) и обычно применяемых символов для обозначения таких сахаридов.

[0024] Фиг. 1В представляет собой иллюстрацию иллюстративных структур гликанов.

[0025] Фиг. 2 представляет собой диаграмму реутилизационного пути и пути *de novo* метаболизма фукозы. В реутилизационном пути свободная L-фукоза превращается в GDP-фукозу, тогда как в пути *de novo* GDP-фукоза синтезируется посредством трех реакций, катализируемых GMD и FX. GDP-фукоза затем транспортируется из цитозоля в просвет аппарата Гольджи с помощью GDP-Фус-трансферазы и переносится на акцепторные олигосахариды и белки. Другой продукт реакции, GDP, с помощью

функционирующей в просвете нуклеотиддифосфатазы превращается в гуанозин-5-монофосфат (GMP) и неорганический фосфат (Pi). Первый экспортируется в цитозоль (посредством системы антипорта, которая связана с транспортом GDP-фукозы), тогда как последний, как предполагается, покидает просвет аппарата Гольджи через анионный канал аппарата Гольджи, GOLAC. См., например, Nordeen et al. 2000; Hirschberg et al. 2001.

[0026] Фиг. 3 представляет собой график, демонстрирующий (А) концентрацию глюкозы (г/л) в культуре клеток при применении контрольной среды (линия с незакрашенными треугольниками), первой тестовой среды (линия с незакрашенными кругами) и второй тестовой среды (линия с незакрашенными шестиугольниками) в ходе цикла культивирования клеток, (В) концентрацию фукозы (г/л) в культуре клеток при применении второй тестовой среды (линия с незакрашенными квадратами) в ходе цикла культивирования клеток и (С) уровни TAF-гликанов (%) в культуре клеток при применении контрольной среды (пунктирная линия с закрашенными треугольниками), первой тестовой среды (пунктирная линия с закрашенными кругами) и второй тестовой среды (пунктирная линия с закрашенными шестиугольниками) в ходе цикла культивирования клеток.

[0027] Фиг. 4 представляет собой график, демонстрирующий (А) концентрацию глюкозы (г/л) в культуре клеток при применении контрольной среды (линия с незакрашенными треугольниками), первой тестовой среды (линия с незакрашенными кругами) и второй тестовой среды (линия с незакрашенными шестиугольниками) в ходе цикла культивирования клеток и (В) уровни гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) (%) в культуре клеток при применении контрольной среды (пунктирная линия с закрашенными треугольниками), первой тестовой среды (пунктирная линия с закрашенными кругами) и второй тестовой среды (пунктирная линия с закрашенными шестиугольниками) в ходе цикла культивирования клеток.

[0028] Фиг. 5 представляет собой график, демонстрирующий (А) концентрацию глюкозы (г/л) в культуре клеток при применении контрольной среды (линия с незакрашенными треугольниками), первой тестовой среды (линия с незакрашенными кругами) и второй тестовой среды (линия с незакрашенными шестиугольниками) в ходе цикла культивирования клеток и (В) уровни афукозилированных (афук.) гликанов (%) в культуре клеток при применении контрольной среды (пунктирная линия с закрашенными треугольниками), первой тестовой среды (пунктирная линия с закрашенными кругами) и второй тестовой среды (пунктирная линия с закрашенными шестиугольниками) в ходе цикла культивирования клеток.

[0029] Фиг. 6 представляет собой график зависимости уровней TAF-гликанов (%) от концентрации фукозы (г/л) в среде для культивирования клеток, содержащей 0X глюкозы, 1X глюкозы или 2X глюкозы.

[0030] Фиг. 7 представляет собой график зависимости уровней ADCC (выраженных в виде % относительно уровня ADCC контрольного антитела, имеющего такую же

аминокислотную последовательность) от концентрации фукозы (г/л) в среде для культивирования клеток, содержащей 0X глюкозы, 1X глюкозы или 2X глюкозы.

[0031] Фиг. 8 представляет собой график, иллюстрирующий модель эффектов глюкозы и фукозы в отношении уровней TAF-гликанов (%). Показаны минимальный, максимальный и средний уровни TAF в соответствии с QTPP. Уравнение под графиком демонстрирует математическую зависимость между содержанием глюкозы, фукозы и TAF.

[0032] Фиг. 9А представляет собой ряд графиков, демонстрирующих: (i) зависимость уровней TAF-гликанов (%) от концентрации фукозы (г/л) в среде для культивирования клеток (верхний левый квадрант) или от концентрации глюкозы (г/л) в среде для культивирования клеток (верхний правый квадрант) и (ii) зависимость уровней ADCC (выраженных в виде % относительно уровня ADCC контрольного антитела, имеющего такую же аминокислотную последовательность) от концентрации фукозы (г/л) в среде для культивирования клеток (нижний левый квадрант) или от концентрации глюкозы (г/л) в среде для культивирования клеток (нижний правый квадрант). Диапазон уровней TAF-гликанов (%) составляет 3,30684-3,73083, и диапазон уровней ADCC составляет 78,3092-90,4408. При 0,2 г/л фукозы и 3,0 г/л глюкозы уровень TAF-гликанов (%) составлял 3,518836, и уровень ADCC (%) составлял 84,37501.

[0033] Фиг. 9В представляет собой ряд графиков, демонстрирующих: (i) зависимость уровней TAF-гликанов (%) от концентрации фукозы (г/л) в среде для культивирования клеток (верхний левый квадрант) или от концентрации глюкозы (г/л) в среде для культивирования клеток (верхний правый квадрант) и (ii) зависимость уровней ADCC (выраженных в виде % относительно уровня ADCC инновационного или коммерчески доступного антитела) от концентрации фукозы (г/л) в среде для культивирования клеток (нижний левый квадрант) или от концентрации глюкозы (г/л) в среде для культивирования клеток (нижний правый квадрант). Диапазон уровней TAF-гликанов (%) составляет 3,52301-4.0559, и диапазон уровней ADCC составляет 75,6911-90,9385. При 0 г/л фукозы и 0,554 г/л глюкозы уровень TAF-гликанов (%) составлял 3,789458, и уровень ADCC (%) составлял 83,3148.

[0034] Фиг. 9С представляет собой ряд графиков, демонстрирующих: (i) зависимость уровней TAF-гликанов (%) от концентрации фукозы (г/л) в среде для культивирования клеток (верхний левый квадрант) или от концентрации глюкозы (г/л) в среде для культивирования клеток (верхний правый квадрант) и (ii) зависимость уровней ADCC (выраженных в виде % относительно уровня ADCC инновационного или коммерчески доступного антитела) от концентрации фукозы (г/л) в среде для культивирования клеток (нижний левый квадрант) или от концентрации глюкозы (г/л) в среде для культивирования клеток (нижний правый квадрант). Диапазон уровней TAF-гликанов (%) составляет 2,9975-3,68468, и диапазон уровней ADCC составляет 79,2215-98,8836. При 0,492 г/л фукозы и 6,0 г/л глюкозы уровень TAF-гликанов (%) составлял 3,341092, и уровень ADCC (%) составлял 89,05256.

[0035] Фиг. 10 представляет собой график осмоляльности, построенный в виде зависимости от концентрации фукозы.

[0036] Фиг. 11 представляет собой график концентрации фукозы, построенный в виде зависимости от времени (продолжительности) в культуре клеток.

[0037] Фиг. 12 представляет собой график % ТАФ и подпитки фукозой, каждый из которых построен в виде зависимости от времени.

[0038] Фиг. 13 представляет собой пару графиков, демонстрирующих, что контролирование уровня глюкозы в целевом диапазоне со дня 6 или ранее приводит к получению эквивалентных результатов по ТАФ.

[0039] Фиг. 14 представляет собой график % афукозилирования, построенный в виде зависимости от времени культивирования.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0040] Многие секретируемые белки претерпевают посттрансляционное гликозилирование, процесс, посредством которого остатки сахаров (например, гликанов, сахаридов) ковалентно присоединяются к конкретным аминокислотам белка. В эукариотических клетках встречаются два типа реакций гликозилирования: (1) Гликозилирование с образованием связи по N, при котором гликаны присоединяются к аспарагину последовательности распознавания Asn-X-Thr/Ser, где "X" представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, и (2) гликозилирование с образованием связи по O, при котором гликаны присоединяются к серину или треонину. Независимо от типа гликозилирования (с образованием связи по N или с образованием связи по O) микрогетерогенность гликоформ белков существует из-за большого диапазона структур гликанов, ассоциированных с каждым сайтом (O или N).

[0041] Все N-гликаны характеризуются общей последовательностью сахара остова: $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$) и относятся к одному из трех типов: (A) тип с высоким содержанием маннозы (HM) или олигоманнозы (OM), в котором N-гликан состоит из двух остатков N-ацетилглюкозамина (GalNAc) и большого количества (например, 5, 6, 7, 8 или 9) остатков маннозы (Man), (B) комплексный тип, в котором N-гликан содержит более двух остатков GlcNAc и любое количество сахаров других типов, или (C) гибридный тип, в котором N-гликан содержит остаток Man на одной стороне ветви и GlcNAc в основании комплексной ветви. На фиг. 1A (взятой из главы 8 в Stanley et al.: *N-Glycans, Essentials of Glycobiology*, 2-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009) показаны три типа N-гликанов.

[0042] N-связанные гликаны, как правило, содержат один или несколько моносахаридов галактозы (Gal), N-ацетилгалактозамина (GalNAc), галактозамина (GalN), глюкозы (Glc), N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), глюкозамина (GlcN), маннозы (Man), N-ацетилманнозамина (ManNAc), маннозамина (ManN), ксилозы (Xyl), N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac), N-гликолилнейраминовой кислоты (Neu5Gc), 2-кето-3-доксиноновой кислоты (Kdn), фукозы (Fuc), глюкуроновой кислоты (GLcA), идуроновой кислоты (IdoA), галактуроновой кислоты (Gal A), маннуровой кислоты

(Man A). Обычно применяемые символы для таких сахаридов показаны на фиг. 1А. Иллюстративные гликаны и их состав показаны на фиг. 1В.

[0043] Гликозилирование с образованием связи по N начинается в эндоплазматическом ретикулуме (ER), где сложная совокупность реакций приводит к присоединению структуры остова гликана, образованной главным образом из двух остатков GlcNAc и трех остатков Man. Гликановый комплекс, образованный в ER, модифицируется под действием ферментов в аппарате Гольджи. Если сахарид является относительно недоступным для ферментов, он, как правило, остается в исходной NM-форме. Если ферменты могут получать доступ к сахариду, то многие остатки Man отщепляются и сахарид дополнительно модифицируется, что приводит к образованию структуры N-гликанов комплексного типа. Например, маннозидаза-1, локализованная в цис-компартементе аппарата Гольджи, способна расщеплять или гидролизовать NM-гликан, тогда как фукозилтрансфераза FUT-8, локализованная в медиальном компартементе аппарата Гольджи, фукозилирует гликан (Hanrue Imai-Nishiya (2007), *BMC Biotechnology*, 7:84).

[0044] Соответственно, сахаридный состав и структурная конфигурация структуры гликана варьируют в зависимости от системы гликозилирования в ER и аппарате Гольджи, доступности структуры гликана ферментам аппарата, порядка действия каждого фермента и стадии, на которой белок высвобождается из системы гликозилирования, среди других факторов.

[0045] Настоящее изобретение, предусмотренное в данном документе, относится к способам получения композиции на основе антитела, содержащей TAF-гликоформы на требуемом, или предварительно определенном, или предварительно выбранном уровне. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу и/или глюкозу в определенной концентрации, описанной в данном документе, зависящей от требуемого уровня TAF-гликоформ. Также настоящее изобретение относится к способу получения композиции на основе антитела, содержащей афукозилированные гликоформы на требуемом, или предварительно определенном, или предварительно выбранном уровне, например уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, составляет от приблизительно 6,2% до приблизительно 8,4%. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток при значении pH от более 7,05 до менее 7,2, где (A) значение pH среды для культивирования клеток изменяют на менее 0,15 (необязательно на менее 0,10) в течение периода культивирования, или (B) температуру среды для культивирования клеток изменяют на не более 2 градуса C, или способ не включает культивирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей марганец или бетаин, или (D) комбинацию двух или трех из (A), (B) и (C). Без привязки к конкретной теории, считается, что способы по настоящему изобретению обеспечивают средства для получения

уникальных композиций, содержащих определенные количества конкретных гликоформ рассматриваемого антитела.

В иллюстративных вариантах осуществления уровни ТАФ-гликанов модулируются. Применяемые в данном документе термины "общие афукозилированные гликаны", или "ТАФ-гликаны", или "общие афукозилированные гликоформы", или "ТАФ-гликоформы" относятся к суммарному количеству гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) и афукозилированных гликанов. В иллюстративных вариантах осуществления уровни НМ-гликанов модулируются. Применяемые в данном документе термины "гликаны с высоким содержанием маннозы", или "НМ-гликаны", или "гликоформы с высоким содержанием маннозы", или "НМ-гликоформы", или "НМ" охватывают гликаны, содержащие 5, 6, 7, 8 или 9 остатков маннозы, сокращенно обозначенных Man5, Man6, Man7, Man8 и Man9 соответственно. В иллюстративных вариантах осуществления уровни афукозилированных гликанов модулируются. Применяемые в данном документе термины "афукозилированный гликан", или "афукогликан", или "афукозилированная гликоформа", или "афук." относятся к гликоформам, в которых отсутствует фукоза при остове, например α 1,6-связанная фукоза при остатке GlcNAc, участвующем в образовании амидной связи с Asn в сайте N-гликозилирования. Афукозилированные гликоформы включают без ограничения A1G0, A2G0, A2G1a, A2G1b, A2G2 и A1G1M5. Дополнительные афукозилированные гликаны включают, например, A1G1a, G0[H3N4], G0[H4N4], G0[H5N4], FO-N[H3N3]. См., например, Reusch и Tejada, *Glycobiology* 25(12): 1325-1334 (2015). В иллюстративных аспектах уровень ТАФ и количества НМ-гликоформ и афукозилированных гликоформ определяют с помощью жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC), как дополнительно описано в данном документе в примере 1. После ферментативного расщепления N-гликанов проводят HILIC с получением хроматограммы с несколькими пиками, каждый пик которой представляет среднее распределение (количество) отдельной гликоформы. Для этих целей, площадь пика в % = площадь пика/общая площадь пиков \times 100%, и общая площадь пиков в % = общая площадь образца/общая площадь стандарта \times 100%. Расчеты, применяемые для целей определения % ТАФ, можно проводить следующим образом:

$\% \text{ афукозилированных гликоформ} = \%A1G0 + \%A2G0 + \%A2G1a + \%A2G1b + \%A2G2 + \%A1G1M5;$

$\% \text{ гликоформ с высоким содержанием маннозы} = \%Man5 \text{ (если поддается выявлению)} + \%Man6 \text{ (если поддается выявлению)} + \%Man7 \text{ (если поддается выявлению)} + \%Man8 \text{ (если поддается выявлению)} + \%Man9 \text{ (если поддается выявлению)}.$

[0046] В настоящем изобретении предусмотрены способы получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка. В иллюстративных вариантах осуществления композиция на основе рекомбинантного гликозилированного белка представляет собой композицию на основе антитела. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу и/или

глюкозу в определенной концентрации, описанной в данном документе, зависящей от требуемого уровня ТАФ-гликоформ.

[0047] *Фукоза*

[0048] В иллюстративных вариантах осуществления способов, раскрытых в данном документе, фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 2,0 г/л, необязательно от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,75 г/л, от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,5 г/л или от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,2 г/л. В иллюстративных случаях фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации приблизительно 1,2 г/л или меньше. В иллюстративных случаях фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л. В иллюстративных случаях среда для культивирования содержит фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 2,0 г/л, от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,75 г/л, от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,5 г/л или от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,2 г/л. В иллюстративных аспектах фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,2 г/л. В иллюстративных случаях фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л. В иллюстративных случаях среда для культивирования содержит фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 2,0 г/л, от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 1,75 г/л, от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 1,5 г/л или от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 1,2 г/л. В иллюстративных случаях фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 1,0 г/л. В иллюстративных случаях фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации приблизительно 1,0 г/л или меньше. Например, в некоторых случаях концентрация фукозы в среде для культивирования составляет приблизительно 0,10 г/л, приблизительно 0,11 г/л, приблизительно 0,12 г/л, приблизительно 0,13 г/л, приблизительно 0,14 г/л, приблизительно 0,15 г/л, приблизительно 0,16 г/л, приблизительно 0,17 г/л, приблизительно 0,18 г/л, приблизительно 0,19 г/л или приблизительно 0,20 г/л. В некоторых случаях концентрация фукозы в среде для культивирования составляет приблизительно 0,3 г/л, приблизительно 0,4 г/л, приблизительно 0,5 г/л, приблизительно 0,6 г/л, приблизительно 0,7 г/л, приблизительно 0,8 г/л или приблизительно 0,9 г/л. В иллюстративных аспектах концентрация фукозы составляет не более 1,0 г/л или приблизительно 1,0 г/л, не более 0,9 г/л или приблизительно 0,9 г/л, не более 0,8 г/л или приблизительно 0,8 г/л или не более 0,7 г/л или приблизительно 0,7 г/л. В иллюстративных случаях фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации приблизительно 0,75 г/л или меньше или от приблизительно 0,25 г/л до приблизительно 0,75 г/л, например от приблизительно 0,4 г/л

до приблизительно 0,5 г/л или приблизительно 0,6 г/л. В иллюстративных аспектах фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации менее приблизительно 0,6 г/л, например от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 0,5 г/л.

[0049] В иллюстративных аспектах способ получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в двух разных средах для культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в первой среде для культивирования клеток в течение начального периода времени и последующее поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток во второй среде для культивирования клеток, необязательно, где первая среда для культивирования клеток не содержит фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и вторая среда для культивирования клеток содержит фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и вторая среда для культивирования клеток содержит фукозу, например в одной из вышеуказанных концентраций. В иллюстративных случаях начальный период времени начинается, когда осуществляют инокуляцию клеток в биореактор, содержащий среду для культивирования клеток, например среду для культивирования клеток. В некоторых аспектах начальный период времени составляет от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 дней, например от приблизительно 24 часов до приблизительно 72 часов. В иллюстративных аспектах начальный период времени составляет более приблизительно 3 дней (приблизительно 72 часов), но менее приблизительно 10 дней (приблизительно 240 часов) или менее приблизительно 156 часов. В иллюстративных аспектах начальный период времени составляет приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8 или приблизительно 9 дней. В иллюстративных аспектах способ включает добавление фукозы в среду для культивирования после начального периода времени. В некоторых аспектах в первую среду для культивирования добавляют фукозу с получением второй среды для культивирования клеток. Например, в различных аспектах способ включает добавление фукозы после от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 дней, после от приблизительно 3 дней, но менее приблизительно 10 дней или после приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8 или приблизительно 9 дней. В иллюстративных аспектах способ включает добавление фукозы в среду для культивирования клеток, например в первую среду для культивирования клеток, на 6-й день, 7-й день, 8-й день или 9-й день после инокуляции культурой клеток. В иллюстративных аспектах фукозу добавляют в конечной концентрации более приблизительно 0,1 г/л, более приблизительно 0,17 г/л или более

приблизительно 0,2 г/л и менее приблизительно 2,0 г/л. В иллюстративных аспектах первая среда для культивирования клеток не содержит фукозу. В иллюстративных аспектах первая среда для культивирования клеток содержит фукозу, но в концентрации, которая является не поддающейся выявлению или не поддающейся измерению, или в концентрации, которая значительно ниже концентрации фукозы во второй среде для культивирования клеток, например значительно ниже 0,1 г/л, ниже приблизительно 0,17 г/л или ниже приблизительно 0,2 г/л.

[0050] В альтернативных аспектах способы включают поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу (например, в концентрации более приблизительно 0,1 г/л, более приблизительно 0,17 г/л или более приблизительно 0,2 г/л и менее приблизительно 2,0 г/л), в течение всего времени поддержания компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре клеток или в течение большей части периода культивирования. В некоторых аспектах способ получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) включает осуществление инокуляции компетентных в отношении гликозилирования клеток в биореактор, содержащий среду для культивирования клеток, содержащую фукозу, и поддержание клеток в среде для культивирования клеток при поддержании концентрации фукозы практически одинаковой на протяжении всего периода культивирования клеток.

[0051] В иллюстративных вариантах осуществления концентрация фукозы незначительно колеблется в ходе культивирования клеток. В иллюстративных аспектах концентрация фукозы колеблется на приблизительно 0,2 г/л или меньше в течение времени поддержания компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу. В иллюстративных аспектах концентрация фукозы колеблется на приблизительно 0,1 г/л или меньше в течение времени поддержания компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу. В иллюстративных аспектах, когда фукозу добавляют в среду для культивирования клеток, например, после начального периода культивирования клеток, фукозу добавляют в среду не более одного или двух раз в течение периода культивирования клеток.

[0052] *Глюкоза*

[0053] В иллюстративных вариантах осуществления способов, раскрытых в данном документе, глюкоза присутствует в среде для культивирования. В иллюстративных аспектах глюкоза присутствует в среде для культивирования в концентрации приблизительно 10 г/л или меньше, приблизительно 9,0 г/л или меньше, или приблизительно 6,0 г/л или меньше. В иллюстративных аспектах глюкоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4,0 г/л. В иллюстративных аспектах глюкоза присутствует в концентрации, составляющей от приблизительно X г/л до приблизительно Y г/л, где X

равняется приблизительно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 или 3,9, и Y равняется приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0, при условии, что X меньше Y.

[0054] В иллюстративных аспектах способ включает поддержание концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток в течение периода времени, который эквивалентен периоду культивирования клеток. В иллюстративных случаях поддержание концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток предусматривает отбор образцов среды для культивирования клеток на регулярной основе, например один раз в час, один раз в два часа, один раз каждые 3, 4, 5 или 6 часов, один раз в день, два раза в день, три раза в день или 4 раза в день и т. п., измерение концентрации глюкозы в отобранных образцах среды для культивирования клеток, а также добавление глюкозы в культуру клеток, если концентрация глюкозы в отобранных образцах среды для культивирования клеток ниже требуемой поддерживаемой концентрации глюкозы. В иллюстративных аспектах поддержание концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток предусматривает измерение концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток с помощью сенсора глюкозы. В иллюстративных аспектах концентрацию глюкозы измеряют с помощью сенсора глюкозы через равные интервалы, например один раз в час, один раз в два часа, один раз каждые 3, 4, 5 или 6 часов, один раз в день, два раза в день, три раза в день или 4 раза в день и т. п., и глюкозу добавляют в культуру клеток, если концентрация глюкозы, определенная с помощью сенсора глюкозы, ниже требуемой поддерживаемой концентрации глюкозы. В альтернативных аспектах способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей глюкозу, но поддержание концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток только после начального периода времени. В иллюстративных вариантах осуществления начальный период времени составляет от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 дней (от приблизительно 24 часов до приблизительно 72 часов). В некоторых случаях начальный период времени составляет приблизительно 6 дней или меньше, необязательно, где начальный период времени составляет 3 дня, или 4 дня, или 5 дней после инокуляции культурой клеток. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей глюкозу, и поддержание концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток на 6-й день после инокуляции и в дальнейшем после этого. В иллюстративных аспектах концентрацию глюкозы поддерживают в течение по меньшей мере приблизительно 4 дней или приблизительно 5 дней после начального периода времени или, необязательно, поддерживают в течение по меньшей мере приблизительно 6 дней после начального периода времени.

[0055] В иллюстративных аспектах среда для культивирования клеток содержит

начальную концентрацию глюкозы в течение начального периода времени. Например, в различных аспектах начальная концентрация глюкозы составляет от приблизительно 1,0 г/л до приблизительно 15 г/л, от приблизительно 1,0 г/л до приблизительно 12 г/л или от приблизительно 1,0 г/л до приблизительно 10 г/л. Начальная концентрация глюкозы в некоторых аспектах составляет приблизительно 1,0 г/л, приблизительно 1,5 г/л, приблизительно 2,0 г/л, приблизительно 2,5 г/л, приблизительно 3,0 г/л, приблизительно 3,5 г/л, приблизительно 4,0 г/л, приблизительно 4,5 г/л, приблизительно 5,0 г/л, приблизительно 5,5 г/л, приблизительно 6,0 г/л, приблизительно 6,5 г/л, приблизительно 7,0 г/л, приблизительно 7,5 г/л, приблизительно 8,0 г/л, приблизительно 8,5 г/л, приблизительно 9,0 г/л, приблизительно 9,5 г/л, приблизительно 10,0 г/л, приблизительно 10,5 г/л, приблизительно 11,0 г/л, приблизительно 11,5 г/л или приблизительно 12,0 г/л. В некоторых аспектах начальная концентрация глюкозы составляет приблизительно 12 г/л \pm 1 г/л, или приблизительно 9 г/л \pm 1 г/л, или приблизительно 6 г/л \pm 1 г/л. В некоторых аспектах начальная концентрация глюкозы составляет менее приблизительно 5,0 г/л или менее приблизительно 4,0 г/л. В иллюстративных аспектах начальная концентрация глюкозы представляет собой концентрацию глюкозы в среде для культивирования клеток, применяемую в течение начального периода времени. В иллюстративных аспектах начальная концентрация глюкозы представляет собой концентрацию глюкозы в среде для культивирования клеток, поддерживаемую в течение начального периода времени.

[0056] В иллюстративных аспектах начальная концентрация глюкозы такая же, как концентрация глюкозы, поддерживаемая после начального периода времени. В альтернативных аспектах начальная концентрация глюкозы отличается от концентрации глюкозы, поддерживаемой после начального периода времени. В иллюстративных аспектах способ включает добавление глюкозы в среду для культивирования клеток после начального периода времени и поддержание глюкозы в концентрации, отличающейся от начальной концентрации глюкозы. В иллюстративных аспектах способ включает добавление глюкозы в среду для культивирования клеток после начального периода времени с поддержанием глюкозы в концентрации, отличающейся от начальной концентрации глюкозы, где в результате стадии добавления глюкозы достигают концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше (например, приблизительно 9 г/л или меньше, приблизительно 6 г/л или меньше, от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4 г/л).

[0057] В иллюстративных аспектах способ включает добавление глюкозы в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой. В некоторых аспектах режим подпитки глюкозой инициируют после начального периода времени. Например, в некоторых аспектах начальный период времени составляет по меньшей мере 3 дня или 4 дня, и режим подпитки глюкозой инициируют после периода времени, составляющего от приблизительно 4 до приблизительно 6 дней после инокуляции культурой клеток, например через приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней после инокуляции культурой клеток. В иллюстративных случаях с

помощью режима подпитки глюкозой обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше (например, приблизительно 9 г/л или меньше, приблизительно 6 г/л или меньше, от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4 г/л). Термин "средняя концентрация глюкозы" относится к средним концентрациям глюкозы в среде для культивирования клеток, определенным с помощью сенсора глюкозы за некоторый период времени (например, 1-2 дня). В иллюстративных случаях с помощью режима подпитки глюкозой обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, исходя из концентрации фукозы в среде для культивирования клеток. В некоторых аспектах среднюю концентрацию глюкозы рассчитывают с использованием формулы I:

$$T=3,354-1,388F+0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

(формула I),

где T представляет собой заданный % общих афукозилированных (TAF) гликанов и составляет от приблизительно 2,5% до приблизительно 6%, от приблизительно 2,75% до приблизительно 5,5% или от приблизительно 3% до приблизительно 5%, F представляет собой концентрацию (г/л) фукозы в среде, и G представляет собой среднюю концентрацию глюкозы (г/л).

[0058] В иллюстративных случаях (i) концентрация фукозы составляет приблизительно $0,2 \pm 0,1$ г/л, и средняя концентрация глюкозы составляет от приблизительно 2 г/л до приблизительно 4 г/л; (ii) концентрация фукозы составляет приблизительно $0,5 \pm 0,1$ г/л, и средняя концентрация глюкозы составляет от приблизительно 3 г/л до приблизительно 6 г/л; или (iii) концентрация фукозы составляет приблизительно $0,75 \pm 0,1$ г/л, и средняя концентрация глюкозы составляет от приблизительно 4,5 до приблизительно 9 г/л.

[0059] *Уровни TAF-, HM- и афукозилированных гликанов*

[0060] В иллюстративных вариантах осуществления с помощью способов, раскрытых в данном документе, получают композицию на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композицию на основе антитела или композицию на основе связывающего белка на основе антитела), где уровень TAF-гликанов в композиции составляет приблизительно 10% или меньше. В иллюстративных аспектах уровень TAF-гликанов в композиции составляет приблизительно 9% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 7% или меньше, приблизительно 6% или меньше, приблизительно 5% или меньше. В иллюстративных аспектах уровень TAF-гликанов в композиции составляет более или приблизительно 4%, например от приблизительно 4% до приблизительно 10%. В некоторых аспектах уровень TAF-гликанов в композиции составляет от приблизительно 2% до приблизительно 6% или от приблизительно 2,5% до приблизительно 5%. В некоторых аспектах уровень TAF-гликанов составляет приблизительно 2,0%, приблизительно 2,5%, приблизительно 3,0%, приблизительно 3,5%, приблизительно 4,0%, приблизительно 4,5%, приблизительно 5%, приблизительно 5,5% или приблизительно 6,0%. В иллюстративных аспектах уровень

ТАФ-гликанов составляет от приблизительно 2% до приблизительно 5% или от приблизительно 2% до приблизительно 4%.

[0061] В иллюстративных аспектах способов получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л или от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и уровень ТАФ-гликанов в композиции составляет менее приблизительно 10%.

[0062] В иллюстративных вариантах осуществления с помощью способов, раскрытых в данном документе, получают композицию на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композицию на основе антитела или композицию на основе связывающего белка на основе антитела), где уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет приблизительно 3,5% или меньше, например приблизительно 3,25% или меньше, приблизительно 3,0% или меньше, приблизительно 2,5% или меньше, приблизительно 2,0% или меньше. В иллюстративных аспектах уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 0,7% до приблизительно 3,0%, необязательно приблизительно 0,7%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,9%, приблизительно 1,0%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,9%, приблизительно 2,0%, приблизительно 2,1%, приблизительно 2,2%, приблизительно 2,3%, приблизительно 2,4%, приблизительно 2,5%, приблизительно 2,6%, приблизительно 2,7%, приблизительно 2,8%, приблизительно 2,9% или приблизительно 3,0%.

[0063] В иллюстративных вариантах осуществления с помощью способов, раскрытых в данном документе, получают композицию на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композицию на основе антитела или композицию на основе связывающего белка на основе антитела), где уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет приблизительно 3,5% или меньше, например приблизительно 3,25% или меньше, приблизительно 3,0% или меньше, приблизительно 2,5% или меньше, приблизительно 2,0% или меньше. В иллюстративных аспектах уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 0,8% до приблизительно 2,8%, необязательно приблизительно 0,8%, приблизительно 0,9%, приблизительно 1,0%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,9%, приблизительно 2,0%, приблизительно 2,1%, приблизительно 2,2%, приблизительно 2,3%, приблизительно 2,4%, приблизительно 2,5%, приблизительно 2,6%, приблизительно 2,7% или приблизительно 2,8%.

[0064] *Способы измерения для оценки гликоформ*

[0065] Из уровня техники известны различные способы для оценки гликоформ, присутствующих в композиции, содержащей гликопротеины, или для определения, выявления или измерения профиля гликоформ в конкретном образце, содержащем гликопротеины. Подходящие способы включают без ограничения MALDI-TOF-анализ в режиме фиксации положительных ионов, MALDI-TOF-анализ в режиме фиксации отрицательных ионов, слабую анионообменную (WAX) хроматографию, нормально-фазовую хроматографию (NP-HPLC), расщепление экзогликозидазами, хроматографию на Bio-Gel P-4, анионообменную хроматографию и одномерную ЯМР-спектроскопию и их комбинации. См., например, Mattu et al., JBC 273: 2260-2272 (1998); Field et al., Biochem J 299(Pt 1): 261-275 (1994); Yoo et al., MAbs 2(3): 320-334 (2010) Wuhrer M. et al., Journal of Chromatography B, 2005, Vol.825, Issue 2, страницы 124-133; Ruhaak L.R., Anal Bioanal Chem, 2010, Vol. 397:3457-3481 и Geoffrey, R. G. et. al. Analytical Biochemistry 1996, Vol. 240, страницы 210-226. Кроме того, в примерах, приведенных в данном документе, описан подходящий способ оценки гликоформ, присутствующих в композиции, содержащей гликопротеины.

[0066] Что касается настоящего изобретения, культуру клеток можно поддерживать в соответствии с любым набором условий, подходящих для получения рекомбинантного гликозилированного белка. Например, в некоторых аспектах культуру клеток поддерживают при конкретном значении pH, температуры, плотности клеток, объема культуры, уровня растворенного кислорода, давления, осмоляльности и т. п. В иллюстративных аспектах культуру клеток перед инокуляцией встряхивают (например, при 70 об./мин.) при 5% CO₂ в условиях стандартной влажности в CO₂-инкубаторе. В иллюстративных аспектах культурой клеток инокулируют среду объемом 1,5 л при плотности засева, составляющей приблизительно 10⁶ клеток/мл.

[0067] В иллюстративных аспектах способы по настоящему изобретению включают поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток при значении pH, составляющем от приблизительно 6,85 до приблизительно 7,05, например, в различных аспектах, приблизительно 6,85, приблизительно 6,86, приблизительно 6,87, приблизительно 6,88, приблизительно 6,89, приблизительно 6,90, приблизительно 6,91, приблизительно 6,92, приблизительно 6,93, приблизительно 6,94, приблизительно 6,95, приблизительно 6,96, приблизительно 6,97, приблизительно 6,98, приблизительно 6,99, приблизительно 7,00, приблизительно 7,01, приблизительно 7,02, приблизительно 7,03, приблизительно 7,04 или приблизительно 7,05. В некоторых аспектах среда для культивирования клеток характеризуется значением pH, составляющим от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,0.

[0068] В иллюстративных аспектах способы включают поддержание культуры клеток при температуре 30-40°C. В иллюстративных вариантах осуществления температура составляет от приблизительно 32°C до приблизительно 38°C или от приблизительно 35°C до приблизительно 38°C.

[0069] В иллюстративных аспектах способы включают поддержание

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

[0070] В иллюстративных аспектах способы включают поддержание уровня растворенного кислорода (DO) в культуре клеток на уровне насыщения кислородом, составляющем от приблизительно 20% до приблизительно 60%, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных случаях способ включает поддержание уровня DO в культуре клеток на уровне насыщения кислородом, составляющем от приблизительно 30% до приблизительно 50% (например, от приблизительно 35% до приблизительно 45%), в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных случаях способ включает поддержание уровня DO в культуре клеток на уровне насыщения кислородом, составляющем приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55% или приблизительно 60%, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах уровень DO составляет от приблизительно 35 мм рт. ст. до приблизительно 85 мм рт. ст., или от приблизительно 40 мм рт. ст. до приблизительно 80 мм рт. ст., или от приблизительно 45 мм рт. ст. до приблизительно 75 мм рт. ст.

[0071] Культуру клеток поддерживают в любой одной или нескольких средах для культивирования. В иллюстративных аспектах культуру клеток поддерживают в среде, подходящей для роста клеток, и/или обеспечивают одной или несколькими средами для подпитки в соответствии с любым подходящим режимом подпитки. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей глюкозу, лактат, аммиак, глутамин и/или глутамат. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей марганец в концентрации приблизительно 1 мкМ или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей от приблизительно 0,25 мкМ до приблизительно 1 мкМ марганца. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей пренебрежимо малые количества марганца. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей медь в концентрации приблизительно 50 ppb или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в

среде, содержащей медь в концентрации приблизительно 40 ppb или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей медь в концентрации приблизительно 30 ppb или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает поддержание культуры клеток в среде, содержащей медь в концентрации приблизительно 20 ppb или меньше, в течение начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах среда содержит медь в концентрации приблизительно 5 ppb или больше или приблизительно 10 ppb или больше. В иллюстративных аспектах среда для культивирования клеток содержит маннозу. В иллюстративных аспектах среда для культивирования клеток не содержит маннозу.

[0072] В иллюстративных вариантах осуществления тип культуры клеток представляет собой периодическую культуру с подпиткой или непрерывную перфузионную культуру. Однако способы по настоящему изобретению преимущественно не ограничены каким-либо конкретным типом культуры клеток.

[0073] *Клетки*

[0074] Настоящее изобретение относится к способам получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), включающим поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток. В иллюстративных аспектах компетентные в отношении гликозилирования клетки представляют собой эукариотические клетки, включая без ограничения клетки дрожжей, клетки мицелиальных грибов, клетки простейших, клетки водорослей, клетки насекомых или клетки млекопитающих. Такие клетки-хозяева описаны в данной области техники. См., например, Frenzel, et al., *Front Immunol* 4: 217 (2013). В иллюстративных аспектах эукариотические клетки представляют собой клетки млекопитающих. В иллюстративных аспектах клетки млекопитающих представляют собой клетки млекопитающих, отличных от человека. В некоторых аспектах клетки представляют собой клетки яичника китайского хомяка (CHO) и их производные (например, CHO-K1, CHO рго-3), клетки миеломы мыши (например, NS0, GS-NS0, Sp2/0), клетки, сконструированные с обеспечением недостаточности активности дигидрофолатредуктазы (DHFR) (например, DUKX-X11, DG44), клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293) или их производные (например, HEK293T, HEK293-EBNA), клетки почки африканской зеленой мартышки (например, клетки линии COS, клетки линии VERO), раковые клетки шейки матки человека (например, HeLa), эпителиальные клетки остеосаркомы из кости человека U2-OS, базальные клетки альвеолярного эпителия аденокарциномы человека A549, клетки фибросаркомы человека HT1080, клетки опухоли головного мозга мыши CAD, клетки эмбриональной карциномы P19, эмбриональные фибробластные клетки мыши NIH 3T3, *фибробластные* клетки мыши L929, клетки нейробластомы мыши N2a, раковые клетки молочной железы человека MCF-7, клетки

ретинобластомы Y79, клетки ретинобластомы человека SO-Rb50, раковые клетки печени человека Hep G2, клетки В-клеточной миеломы мыши J558L или клетки почки новорожденного хомяка (ВНК) (Gaillet et al. 2007; Khan, Adv Pharm Bull 3(2): 257-263 (2013)).

[0075] Клетки, которые не являются компетентными в отношении гликозилирования, можно также трансформировать в компетентные в отношении гликозилирования клетки, например, посредством их трансфекции генами, кодирующими соответствующие ферменты, необходимые для гликозилирования. Иллюстративные ферменты включают без ограничения олигосахарилтрансферазы, гликозидазы, глюкозидазу I, глюкозидазу II, кальнексин/кальретикулин, гликозилтрансферазы, маннозидазы, GlcNAc-трансферазы, галактозилтрансферазы и сиалилтрансферазы.

[0076] В иллюстративных вариантах осуществления компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. Эти два пути метаболизма фукозы показаны на фиг. 2. В иллюстративных вариантах осуществления компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности любого одного или нескольких из следующих: фукозилтрансфераза (FUT, например FUT1, FUT2, FUT3, FUT4, FUT5, FUT6, FUT7, FUT8, FUT9), фукозокиназа, GDP-фукозопирофосфорилаза, GDP-D-манноза-4,6-дегидратаза (GMD) и GDP-кето-6-дезоксиманноза-3,5-эпимераза-4-редуктаза (FX). В иллюстративных вариантах осуществления компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего FX.

[0077] В иллюстративных вариантах осуществления компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GNTIII) или GDP-6-дезоксид-ликсо-4-гексулозоредуктазы (RMD). В иллюстративных аспектах компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения сверхэкспрессии GNTIII или RMD.

[0078] *Рекомбинантные гликозилированные белки*

[0079] В иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантный гликозилированный белок содержит аминокислотную последовательность, содержащую одну или несколько консенсусных последовательностей N-гликозилирования формулы:

$$\text{Asn-Xaa}_1\text{-Xaa}_2,$$

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

[0080] В иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантный гликозилированный белок содержит полипептид, представляющий собой кристаллизующийся фрагмент (Fc). Применяемый в данном документе термин "Fc-полипептид" включает нативные и мутантные формы полипептидов, полученных из Fc-

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

[0081] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой антитело. Применяемый в данном документе термин "антитело" относится к белку в общепринятом формате иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему переменные и константные участки. Например, антитело может представлять собой IgG, который характеризуется "Y-образной" структурой из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну "легкую" (как правило, имеющую молекулярный вес, составляющий приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, имеющую молекулярный вес, составляющий приблизительно 50-70 кДа). Антитело имеет переменный участок и константный участок. В форматах IgG переменный участок обычно содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три участка, определяющих комплементарность (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается от других антител, которые связываются с различными антигенами. См., например, Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999).

[0082] Вкратце, в остове антитела CDR встроены в каркас переменного участка тяжелой и легкой цепей, где они составляют участки, преимущественно отвечающие за связывание и распознавание антигена. Переменный участок содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепи (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Бетесда, штат Мэриленд; см. также Chothia и Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883) в пределах каркасного участка (обозначенные как каркасные участки 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4, по Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше).

[0083] Легкие цепи человека классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon-цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая без ограничения IgM1 и IgM2. Варианты осуществления настоящего изобретения включают все такие классы или изотипы антител. Константный участок легкой цепи может представлять собой, например, константный участок легкой цепи

каппа- или лямбда-типа, например константный участок легкой цепи каппа- или лямбда-типа человека. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой, например, константные участки тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например константный участок тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа человека. Соответственно, в иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, включая любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

[0084] В различных аспектах антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. В некоторых аспектах антитело содержит последовательность, которая практически аналогична последовательности встречающегося в природе антитела, продуцируемого млекопитающим, например мышью, крысой, кроликом, козой, лошастью, курицей, хомяком, свиньей, человеком и т. п. В этом отношении антитело можно рассматривать как антитело млекопитающего, например антитело мыши, антитело крысы, антитело кролика, антитело козы, антитело лошади, антитело курицы, антитело хомяка, антитело свиньи, антитело человека и т. п. В определенных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой моноклональное антитело человека. В определенных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Термин "химерное антитело" применяется в данном документе для обозначения антитела, содержащего константные домены от одного вида и переменные домены от второго или, в более общем случае, содержащего отрезки аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Термин "гуманизированное" при применении в отношении антител относится к антителам, содержащим по меньшей мере участки CDR из источника, отличного от человека, сконструированные таким образом, что они характеризуются структурой и иммунологической функцией, более сходными с таковыми у настоящих антител человека, чем у антител из исходного источника. Например, гуманизация может включать прививание CDR из антитела, отличного от антитела человека, такого как антитело мыши, на антитело человека. Гуманизация также может включать селективные аминокислотные замены, чтобы сделать последовательность, отличную от последовательности человека, более сходной с последовательностью человека.

[0085] В различных аспектах антитело расщепляется на фрагменты под действием ферментов, таких как, например, папаин и пепсин. Папаин расщепляет антитело с образованием двух Fab-фрагментов и одного Fc-фрагмента. Пепсин расщепляет антитело с образованием F(ab')₂-фрагмента и pFc'-фрагмента. В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой фрагмент антитела, например Fab, Fc, F(ab')₂ или pFc', в котором остается по меньшей мере один сайт гликозилирования. Что касается способов по настоящему изобретению, антитело может не содержать определенных частей антитела и может представлять собой фрагмент антитела. В различных аспектах фрагмент антитела содержит сайт гликозилирования. В

некоторых аспектах фрагмент представляет собой "гликозилированный Fc-фрагмент", который содержит по меньшей мере часть Fc-участка антитела, которая посттрансляционно гликозилирована в эукариотических клетках.

[0086] Архитектура антител была использована для создания возрастающего диапазона альтернативных форматов антител, который охватывает диапазон молекулярного веса, составляющий по меньшей мере или приблизительно 12-150 кДа, и диапазон валентности (n) от мономерных (n=1), димерных (n=2) и тримерных (n=3) до тетрамерных (n=4) и потенциально выше; такие альтернативные форматы антител называются в данном документе "белковыми продуктами на основе антител" или "связывающими белками на основе антител".

[0087] Белковые продукты на основе антител могут являться таковыми, антигенсвязывающий формат которых основан на фрагментах антител, например scFv, Fab и V_{HH}/V_H, которые сохраняют полную способность к связыванию антигена. Наименьшим антигенсвязывающим фрагментом, у которого сохраняется его полный антигенсвязывающий сайт, является Fv-фрагмент, который полностью состоит из переменных (V) участков. Растворимый гибкий аминокислотный пептидный линкер применяют для присоединения V-участков к scFv-фрагменту (одноцепочечный переменный фрагмент) для стабилизации молекулы, или константные (C) домены добавляют к V-участкам с получением Fab-фрагмента [антигенсвязывающего фрагмента]. Как scFv, так и Fab являются широко применяемыми фрагментами, которые можно легко получать в прокариотических хозяевах. Другие белковые продукты на основе антител включают scFv, стабилизированный дисульфидными связями (ds-scFv), одноцепочечный Fab (scFab), а также ди- и мультимерные форматы антител, такие как диа-, триа- и тетрамера, или миниантитела (мини-Ab), которые включают различные форматы, состоящие из scFv, связанных с олигомеризационными доменами. Наименьшие фрагменты представляют собой V_{HH}/V_H из тяжелой цепи Ab верблюдовых, а также однодоменные Ab (sdAb). Структурным элементом, который наиболее часто применяется для создания новых форматов антител, является фрагмент антитела, представляющий собой одноцепочечный переменный (V) домен (scFv), который содержит V-домены из тяжелой и легкой цепей (домены V_H и V_L), связанные посредством пептидного линкера из ~ 15 аминокислотных остатков. Пептитело или продукт слияния пептид-Fc представляет собой еще один белковый продукт на основе антитела. Структура пептитела состоит из биологически активного пептида, привитого на Fc-домен. Пептитела хорошо описаны в данной области техники. См., например, Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012).

[0088] Другие белковые продукты на основе антител включают одноцепочечное антитело (SCA); диатело; триатело; тетраатело; биспецифические или триспецифические антитела и т. п. Биспецифические антитела можно разделить на пять основных классов: BsIgG, дополненные IgG, фрагменты BsAb, биспецифические слитые белки и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., Molecular Immunology 67(2) Part A: 97-106 (2015).

[0089] В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок

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

[0090] Рекомбинантный гликозилированный белок может представлять собой белковый продукт на основе антитела в мономерной форме или в полимерной, олигомерной или мультимерной форме. В определенных вариантах осуществления, в которых антитело содержит два или более различных участка, представляющих собой антигенсвязывающие фрагменты, антитело считается биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим, или бивалентным, тривалентным или поливалентным, в зависимости от количества различных эпитопов, которые распознаются и связываются антителом.

[0091] Преимущественно, способы не ограничены специфичностью антитела к антигену. Соответственно, антитело обладает любой специфичностью связывания с фактически любым антигеном. В иллюстративных аспектах антитело связывается с гормоном, фактором роста, цитокином, рецептором на клеточной поверхности или любым его лигандом. В иллюстративных аспектах антитело связывается с белком, экспрессируемым на клеточной поверхности клетки иммунной системы. В иллюстративных аспектах антитело связывается с молекулой кластера дифференцировки, выбранной из группы, состоящей из следующих: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11A, CD11B, CD11C, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD45RA, CD45RB, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD76, CD79 α , CD79 β , CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CD109, CD114, CD 115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CDw128,

CD129, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 и CD182.

[0092] В иллюстративных аспектах антитело представляет собой одно из антител, описанных в патенте США № 7947809 и публикации заявки на патент США № 20090041784 (рецептор глюкогона), патенте США № 7939070, патенте США № 7833527, патенте США № 7767206 и патенте США № 7786284 (рецептор А IL-17), патенте США № 7872106 и патенте США № 7592429 (склеростин), патенте США № 7871611, патенте США № 7815907, патенте США № 7037498, патенте США № 7700742 и публикации заявки на патент США № 20100255538 (рецептор IGF-1), патенте США № 7868140 (B7RP1), патенте США № 7807159 и публикации заявки на патент США № 20110091455 (миостатин), патенте США № 7736644, патенте США № 7628986, патенте США № 7524496 и публикации заявки на патент США № 20100111979 (делеционные мутанты по рецептору эпидермального фактора роста), патенте США № 7728110 (коронавирус SARS), патенте США № 7718776 и публикации заявки на патент США № 20100209435 (OPGL), патенте США № 7658924 и патенте США № 7521053 (ангиопоэтин-2), патенте США № 7601818, патенте США № 7795413, публикации заявки на патент США № 20090155274, публикации заявки на патент США № 20110040076 (NGF), патенте США № 7579186 (рецептор TGF- β типа II), патенте США № 7541438 (фактор роста соединительной ткани), патенте США № 7438910 (IL1-R1), патенте США № 7423128 (пропердин), патенте США № 7411057, патенте США № 7824679, патенте США № 7109003, патенте США № 6682736, патенте США № 7132281 и патенте США № 7807797 (CTLA-4), патенте США № 7084257, патенте США № 7790859, патенте США № 7335743, патенте США № 7084257 и публикации заявки на патент США № 20110045537 (интерферон гамма), патенте США № 7932372 (MAdCAM), патенте США № 7906625, публикации заявки на патент США № 20080292639 и публикации заявки на патент США № 20110044986 (амилоид), патенте США № 7815907 и патенте США № 7700742 (инсулиноподобный фактор роста I), патенте США № 7566772 и патенте США № 7964193 (интерлейкин-1 β), патенте США № 7563442, патенте США № 7288251, патенте США № 7338660, патенте США № 7626012, патенте США № 7618633 и публикации заявки на патент США № 20100098694 (CD40), патенте США № 7498420 (c-Met), патенте США № 7326414, патенте США № 7592430 и патенте США № 7728113 (M-CSF), патенте США № 6924360, патенте США № 7067131 и патенте США № 7090844 (MUC18), патенте США № 6235883, патенте США № 7807798 и публикации заявки на патент США № 20100305307 (рецептор эпидермального фактора роста), патенте США № 6716587, патенте США № 7872113, патенте США № 7465450, патенте США № 7186809, патенте США № 7317090 и патенте США № 7638606 (рецептор интерлейкина-4), публикации заявки на патент США № 20110135657 (БЕТА-КЛОТО), патенте США № 7887799 и патенте США № 7879323 (полипептиды, подобные фактору роста фибробластов), патенте США № 7867494 (IgE), публикации заявки на патент США

№ 20100254975 (АЛЬФА-4 БЕТА-7), публикации заявки на патент США № 20100197005 и патенте США № 7537762 (КИНАЗА-1, ПОДОБНАЯ РЕЦЕПТОРУ АКТИВИНА), патенте США № 7585500 и публикации заявки на патент США № 20100047253 (IL-13), публикации заявки на патент США № 20090263383 и патенте США № 7449555 (CD148), публикации заявки на патент США № 20090234106 (АКТИВИН А), публикации заявки на патент США № 20090226447 (ангиопоэтин-1 и ангиопоэтин-2), публикации заявки на патент США № 20090191212 (ангиопоэтин-2), публикации заявки на патент США № 20090155164 (С-FMS), патенте США № 7537762 (киназа-1, подобная рецептору активина), патенте США № 7371381 (галанин), публикации заявки на патент США № 20070196376 (ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА), патенте США № 7267960 и патенте США № 7741115 (LDCAM), US7265212 (CD45RB), патенте США № 7709611, публикации заявки на патент США № 20060127393 и публикации заявки на патент США № 20100040619 (DKK1), патенте США № 7807795, публикации заявки на патент США № 20030103978 и патенте США № 7923008 (остеопротегерин), публикации заявки на патент США № 20090208489 (OV064), публикации заявки на патент США № 20080286284 (PSMA), патенте США № 7888482, публикации заявки на патент США № 20110165171 и публикации заявки на патент США № 20110059063 (PAR2), публикации заявки на патент США № 20110150888 (ГЕПЦИДИН), патенте США № 7939640 (B7L-1), патенте США № 7915391 (с-Kit), патенте США № 7807796, патенте США № 7193058 и патенте США № 7427669 (ULBP), патенте США № 7786271, патенте США № 7304144 и публикации заявки на патент США № 20090238823 (TSLP), патенте США № 7767793 (SIGIRR), патенте США № 7705130 (HER-3), патенте США № 7704501 (атаксин-1-подобный полипептид), патенте США № 7695948 и патенте США № 7199224 (TNF- α -превращающий фермент), публикации заявки на патент США № 20090234106 (АКТИВИН А), публикации заявки на патент США № 20090214559 и патенте США № 7438910 (IL1-R1), патенте США № 7579186 (рецептор типа II TGF- β), патенте США № 7569387 (молекулы, подобные рецептору TNF), патенте США № 7541438, (фактор роста соединительной ткани), патенте США № 7521048 (рецептор-2 TRAIL), патенте США № 6319499, патенте США № 7081523 и публикации заявки на патент США № 20080182976 (рецептор эритропоэтина), публикации заявки на патент США № 20080166352 и патенте США № 7435796 (B7RP1), патенте США № 7423128 (пропердин), патенте США № 7422742 и патенте США № 7141653 (интерлейкин-5), патенте США № 6740522 и патенте США № 7411050 (RANKL), патенте США № 7378091 (опухолевый антиген, представляющий собой карбоангидразу IX (CA IX)), патенте США № 7318925 и патенте США № 7288253 (паратиреоидный гормон), патенте США № 7285269 (TNF), патенте США № 6692740 и патенте США № 7270817 (ACPL), патенте США № 7202343 (моноцитарный хемоаттрактантный белок-1), патенте США № 7144731 (SCF), патенте США № 6355779 и патенте США № 7138500 (4-1BB), патенте США № 7135174 (PDGFD), патенте США № 6630143 и патенте США № 7045128 (лиганд Flt-3), патенте США № 6849450 (ингибитор металлопротеиназы), патенте США № 6596852 (LERK-5), патенте США № 6232447 (LERK-6), патенте США № 6500429

(нейротрофический фактор головного мозга), патенте США № 6184359 (Т-клеточный фактор, полученный из эпителия), патенте США № 6143874 (нейротрофический фактор NNT-1), публикации заявки на патент США № 20110027287 (пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9)), публикации заявки на патент США № 20110014201 (РЕЦЕПТОР IL-18) и публикации заявки на патент США № 20090155164 (С-FMS). Приведенные выше патенты и опубликованные заявки на патенты включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для целей раскрытия полипептидов переменных доменов, нуклеиновых кислот, кодирующих переменные домены, клеток-хозяев, векторов, способов получения полипептидов, кодирующих указанные переменные домены, фармацевтических композиций и способов лечения заболеваний, связанных с соответствующей мишенью антигенсвязывающего белка, содержащего переменный домен, или антитела.

[0093] В иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой одно из следующего: муромонаб-CD3 (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Orthoclone Okt3®), абциксимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Reopro®), ритуксимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой MabThera®, Rituxan®), базиликсимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Simulect®), даклизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Zenarax®), паливизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Synagis®), инфликсимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Remicade®), трастузумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Herceptin®), алемтузумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой MabCampath®, Campath-1H®), адалимумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Humira®), тозитумомаб-I131 (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Vectra®), эфализумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Raptiva®), цетуксимаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Erbitux®), тиуксетан ибритумомаба (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Zevalin®), омализумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Xolair®), бевацизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Avastin®), натализумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Tysabri®), ранибизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Lucentis®), панитумумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Vectibix®), экулизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Soliris®), пэгол цертолизумаба (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Cimzia®), голимумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Simponi®), канакинумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Paria®), катумаксумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Removab®), устекинумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Stelara®), тоцилизумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой RoActemra®, Actemra®), офатумумаб (продукт, представленный на рынке под торговой

маркой Arzerra®), деносумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Prolia®), белимумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Benlysta®), раксибакумаб, ипилимумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Yervoy®), и пертузумаб (продукт, представленный на рынке под торговой маркой Perjeta®). В иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой одно из антител к TNF альфа, такое как адалимумаб, инфликсимаб, этанерцепт, голимумаб и пэгол цертолизумаба; антител к IL1.бета, такое как канакинумаб; антител к IL12/23 (p40), такое как устекинумаб и бриакинумаб; и антител к IL2R, такое как даклизумаб. В иллюстративных аспектах антитело связывается с опухолеассоциированным антигеном и представляет собой противораковое антитело. Примеры подходящих противораковых антител включают без ограничения антитела к BAFF, такие как белимумаб; антитела к CD20, такие как ритуксимаб; антитела к CD22, такие как эспратузумаб; антитела к CD25, такие как даклизумаб; антитела к CD30, такие как иратумумаб, антитела к CD33, такие как гемтузумаб, антитела к CD52, такие как алемтузумаб; антитела к CD152, такие как ипилимумаб; антитела к EGFR, такие как цетуксимаб; антитела к HER2, такие как трастузумаб и пертузумаб; антитела к IL6, такие как силтуксимаб; и антитела к VEGF, такие как бевацизумаб; антитела к рецептору IL6, такие как тоцилизумаб. В иллюстративных аспектах опухолеассоциированный антиген представляет собой CD20, и антитело представляет собой антитело к CD20. В иллюстративных аспектах опухолеассоциированный антиген содержит SEQ ID NO: 3. В иллюстративных случаях антитело содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В иллюстративных аспектах антитело представляет собой антитело к CD20, например моноклональное антитело к CD20. В альтернативных аспектах антитело IgG1 представляет собой ритуксимаб или его биоаналог. Термин ритуксимаб относится к химерному IgG1 каппа мыши/человека, моноклональному антителу, которое связывает антиген CD20 (см. номер CAS: 174722-31-7; DrugBank - DB00073; запись D02994 в Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)). В иллюстративных аспектах антитело содержит легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в таблице А. В иллюстративных аспектах антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в таблице А. В различных случаях антитело содержит VH и VL или содержит последовательности VH-IgG1 и VL-IgG каппа, представленные в таблице А.

ТАБЛИЦА А. Аминокислотные последовательности ритуксимаба

Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR1 LC	RASSSVSYIH	4
CDR2 LC	ATSNLAS	5
CDR3 LC	QQWTSNPPT	6
CDR1 HC	SYNMH	7
CDR2 HC	AIYPGNGDTSYNQKFKG	8

CDR3 HC	STYYGGDWYFNV	9
VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGS SPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK	10
VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSA	11
VL-IgG каппа	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGS SPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSLTTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	12
VH-IgG1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAP ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	13

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

[0094] В иллюстративных аспектах антитело представляет собой антитело к EGFR, например моноклональное антитело к HER2. В иллюстративных аспектах антитело представляет собой трастузумаб или его биоаналог. Термин трастузумаб относится к гуманизированному IgG1 каппа, моноклональному антителу, которое связывает антиген HER2/neu (см. номер CAS: 180288-69-1; DrugBank - DB00072; запись D03257 в Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)). В иллюстративных аспектах антитело содержит легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в таблице В. В иллюстративных аспектах антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2

и CDR3, представленные в таблице В. В различных случаях антитело содержит VH и VL или содержит последовательности VH-IgG1 и VL-IgG каппа, представленные в таблице В.

ТАБЛИЦА В. Аминокислотные последовательности трастузумаба

Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR1 LC	QDVNTA	14
CDR2 LC	SAS	15
CDR3 LC	QQHYTTPPT	16
CDR1 HC	GFNIKDTY	17
CDR2 HC	IYPTNGYT	18
CDR3 HC	SRWGGDGFYAMDY	19
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIK	20
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS	21
VL-IgG каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	22
VH-IgG1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNH	23

	YTQKSLSLSPG	
--	-------------	--

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

[0095] *Дополнительные стадии*

[0096] Способы, раскрытые в данном документе, в различных аспектах включают дополнительные стадии. Например, в некоторых аспектах способы включают одну или несколько предшествующих стадий или последующих стадий, используемых для получения, очистки и составления рекомбинантного гликозилированного белка. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает стадии получения клеток-хозяев, которые экспрессируют рекомбинантный гликозилированный белок (например, антитело или связывающий белок на основе антитела). Клетки-хозяева в некоторых аспектах представляют собой прокариотические клетки-хозяева, например *E. coli* или *Bacillus subtilis*, или клетки-хозяева в некоторых аспектах представляют собой эукариотические клетки-хозяева, например клетки дрожжей, клетки мицелиальных грибов, клетки простейших, клетки насекомых или клетки млекопитающих (например, клетки CHO). Такие клетки-хозяева описаны в данной области техники. См., например, Frenzel, et al., *Front Immunol* 4: 217 (2013) и в данном документе в разделе "Клетки". Например, в некоторых случаях способы включают введение в клетки-хозяева вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный гликозилированный белок или его полипептидную цепь.

[0097] В иллюстративных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают стадии выделения и/или очистки рекомбинантного гликозилированного белка (например, рекомбинантного антитела) из культуры. В иллюстративных аспектах способ включает одну или несколько стадий хроматографии, включая без ограничения, например, аффинную хроматографию (например, аффинную хроматографию с применением белка А), ионообменную хроматографию и/или хроматографию гидрофобных взаимодействий. В иллюстративных аспектах способ включает стадии получения кристаллических биомолекул из раствора, содержащего рекомбинантные гликозилированные белки.

[0098] Способы по настоящему изобретению в различных аспектах включают одну или несколько стадий получения композиции, включая в некоторых аспектах фармацевтическую композицию, содержащую очищенный рекомбинантный гликозилированный белок. Такие композиции рассмотрены ниже.

[0099] *Композиции*

[00100] В данном документе предусмотрены композиции, содержащие рекомбинантные гликозилированные белки. В иллюстративных вариантах осуществления композиции получают с помощью способов получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка по настоящему изобретению, описанного в данном документе. В иллюстративных аспектах рекомбинантный гликозилированный белок представляет собой антитело. Соответственно, в данном документе предусмотрены

композиции на основе антител. В иллюстративных вариантах осуществления композиция на основе антитела содержит различные гликоформы антитела. В иллюстративных вариантах осуществления композиция на основе антитела содержит ТАФ-гликоформы, НМ-гликоформы и/или афукозилированные гликоформы антитела. Также предусмотрены композиции, содержащие фрагменты антител или белковые продукты на основе антител. В различных аспектах фрагменты антител, белковые продукты на основе антител, гликозилированные Fc-фрагменты или продукты на основе антитела с гликозилированным Fc-фрагментом содержат сайт гликозилирования. В иллюстративных вариантах осуществления композицию на основе антитела получают с помощью способа, включающего поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л. В иллюстративных вариантах осуществления композицию на основе антитела получают с помощью способа, включающего поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. В иллюстративных вариантах осуществления композицию на основе антитела получают с помощью способа, включающего поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу и глюкозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и добавление глюкозы в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой, при котором обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше. В иллюстративных вариантах осуществления композицию на основе антитела получают при практическом применении способа модулирования уровня ТАФ-гликанов, афукозилированных гликанов или гликана с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток. В иллюстративных аспектах композицию на основе антитела получают при практическом применении способа модулирования уровня ТАФ-гликанов, включающего (А) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, для снижения уровня ТАФ-гликанов; (В) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы менее приблизительно 10 г/л для повышения уровня ТАФ-гликанов; или (С) как (А), так и (В). В иллюстративных аспектах композицию на основе антитела получают при практическом

применении способа модулирования уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающего (А) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, для снижения уровня афукозилированных гликанов; (В) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы приблизительно 10 г/л или меньше для повышения уровня афукозилированных гликанов; или (С) как (А), так и (В). В иллюстративных случаях композицию на основе антитела получают при практическом применении способа модулирования уровня гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающего добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы приблизительно 10 г/л или меньше для повышения уровня гликанов с высоким содержанием маннозы.

[00101] В иллюстративных аспектах приблизительно 50% или меньше (например, приблизительно 40% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше) рекомбинантного гликозилированного белка в композиции составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах менее приблизительно 10% (например, приблизительно 9% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 7% или меньше, приблизительно 6% или меньше, приблизительно 5% или меньше, приблизительно 4% или меньше, приблизительно 3% или меньше, приблизительно 2% или меньше) рекомбинантного гликозилированного белка в композиции составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах от приблизительно 4% до приблизительно 10% рекомбинантного гликозилированного белка в композиции составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах от приблизительно 2% до приблизительно 6% рекомбинантного гликозилированного белка в композиции составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах от приблизительно 2,5% до приблизительно 5% рекомбинантного гликозилированного белка в композиции составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах приблизительно 4% или меньше рекомбинантного гликозилированного белка в композиции составляют ТАФ-гликоформы. В дополнительных иллюстративных аспектах от приблизительно 4% или меньше до приблизительно 2% или больше рекомбинантного гликозилированного белка в композиции составляют ТАФ-гликоформы.

[00102] В иллюстративных аспектах композиции по настоящему изобретению характеризуются профилем гликоформ, в котором приблизительно 50% или меньше (например, приблизительно 40% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15%

или меньше) составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах композиции по настоящему изобретению характеризуются профилем гликоформ, в котором приблизительно 10% или меньше (например, приблизительно 9% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 7% или меньше, приблизительно 6% или меньше, приблизительно 5% или меньше, приблизительно 4% или меньше, приблизительно 3% или меньше, приблизительно 2% или меньше) составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах композиции по настоящему изобретению характеризуются профилем гликоформ, в котором от приблизительно 4% до приблизительно 10% составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах композиции по настоящему изобретению характеризуются профилем гликоформ, в котором от приблизительно 2% до приблизительно 6% составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах композиции по настоящему изобретению характеризуются профилем гликоформ, в котором от приблизительно 2,5% до приблизительно 5% составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах композиции по настоящему изобретению характеризуются профилем гликоформ, в котором приблизительно 4% или меньше составляют ТАФ-гликоформы. В иллюстративных аспектах композиции по настоящему изобретению характеризуются профилем гликоформ, который составляет приблизительно 4% или меньше и приблизительно 2% или больше ТАФ-гликоформ.

[00103] В иллюстративных аспектах приблизительно 5% или меньше рекомбинантного гликозилированного белка (например, антитела или связывающего белка на основе антитела) в композиции составляют афукозилированные гликоформы. В иллюстративных аспектах приблизительно 4% или меньше рекомбинантного гликозилированного белка (например, антитела или связывающего белка на основе антитела) в композиции составляют афукозилированные гликоформы. В иллюстративных аспектах приблизительно 3,5% или меньше рекомбинантного гликозилированного белка (например, антитела или связывающего белка на основе антитела) в композиции составляют афукозилированные гликоформы. В иллюстративных аспектах от приблизительно 0,8% до приблизительно 2,8% рекомбинантного гликозилированного белка в композиции составляют афукозилированные гликоформы. В некоторых аспектах уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет приблизительно 0,8%, приблизительно 0,9%, приблизительно 1,0%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,9%, приблизительно 2,0%, приблизительно 2,1%, приблизительно 2,2%, приблизительно 2,3%, приблизительно 2,4%, приблизительно 2,5%, приблизительно 2,6%, приблизительно 2,7% или приблизительно 2,8%.

[00104] В иллюстративных аспектах приблизительно 5% или меньше рекомбинантного гликозилированного белка (например, антитела или связывающего белка на основе антитела) в композиции составляют гликоформы с высоким содержанием маннозы. В иллюстративных аспектах приблизительно 4% или меньше рекомбинантного

гликозилированного белка (например, антитела или связывающего белка на основе антитела) в композиции составляют гликоформы с высоким содержанием маннозы. В иллюстративных аспектах приблизительно 3,5% или меньше рекомбинантного гликозилированного белка (например, антитела или связывающего белка на основе антитела) в композиции составляют гликоформы с высоким содержанием маннозы. В иллюстративных аспектах от приблизительно 0,7% до приблизительно 3,0% рекомбинантного гликозилированного белка в композиции составляют гликоформы с высоким содержанием маннозы. В некоторых аспектах уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет приблизительно 0,7%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,9%, приблизительно 1,0%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,9%, приблизительно 2,0%, приблизительно 2,1%, приблизительно 2,2%, приблизительно 2,3%, приблизительно 2,4%, приблизительно 2,5%, приблизительно 2,6%, приблизительно 2,7%, приблизительно 2,8%, приблизительно 2,9% или приблизительно 3,0%.

[00105] В иллюстративных вариантах осуществления композицию объединяют с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом. Соответственно, в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие композицию на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композицию на основе антитела или композицию на основе связывающего белка на основе антитела), описанного в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. Применяемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой из стандартных фармацевтических носителей, таких как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии, такие как эмульсия типа "масло в воде" или "вода в масле", и различные типы смачивающих средств.

[00106] Среда для культивирования клеток

[00107] В данном документе предусмотрена среда для культивирования клеток, содержащая: (a) компетентные в отношении гликозилирования клетки, содержащие экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело; и (b) среду для культивирования, содержащую фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л или от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л. Компетентные в отношении гликозилирования клетки могут представлять собой любую клетку, описанную в данном документе. В иллюстративных случаях компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути, необязательно, где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кето-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимеразу/-4-редуктазу. В иллюстративных вариантах осуществления среда для культивирования дополнительно содержит глюкозу. В

некоторых аспектах среда для культивирования содержит глюкозу в концентрации менее приблизительно 10 г/л или менее приблизительно 9 г/л, например приблизительно 6 г/л или меньше или от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4 г/л. В некоторых аспектах среда для культивирования содержит фукозу. В иллюстративных аспектах значение pH среды для культивирования составляет от приблизительно 6,85 до приблизительно 7,05, необязательно от приблизительно 6,90 до приблизительно 7,00. В иллюстративных случаях компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. Например, компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кето-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимеразу, -4-редуктазу. В иллюстративных аспектах антитело представляет собой антитело IgG, необязательно антитело IgG1. Антитело IgG1 в иллюстративных аспектах является специфичным к опухолеассоциированному антигену, например CD20. В иллюстративных аспектах среда для культивирования клеток не содержит маннозу.

[00108] *Способы модулирования*

[00109] В данном документе дополнительно предусмотрены способы изменения или модулирования уровней TAF-гликанов в рекомбинантном гликозилированном белке (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученном с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает: (A) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, для снижения уровня TAF-гликанов; (B) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы менее приблизительно 10 г/л для повышения уровня TAF-гликанов; или (C) как (A), так и (B).

[00110] В настоящем изобретении также предусмотрены способы модулирования уровня афукозилированных гликанов в рекомбинантном гликозилированном белке (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученном с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток. В иллюстративных аспектах способы включают (A) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, для снижения уровня афукозилированных гликанов; (B) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы менее приблизительно 10 г/л для повышения уровня афукозилированных гликанов; или (C) как (A), так и (B).

[00111] Также предусмотрены способы модулирования уровня гликанов с высоким содержанием маннозы в рекомбинантном гликозилированном белке (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученном с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток. В иллюстративных вариантах осуществления способы включают добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы менее приблизительно 10 г/л для повышения уровня НМ-гликанов.

[00112] Соответственно, в некоторых иллюстративных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению относятся к повышению уровней ТАФ-, НМ- или афукозилированных гликанов в белке, например, антителе, получаемом с помощью клеток в культуре клеток. В иллюстративных аспектах уровни НМ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка повышаются относительно таковых в контрольной культуре клеток. В иллюстративных аспектах уровни одного или нескольких из Man5, Man6, Man7, Man8 и/или Man9 в рекомбинантном гликозилированном белке повышаются относительно контрольной культуры клеток. В иллюстративных аспектах уровни афукозилированных гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка повышаются относительно таковых в контрольной культуре клеток. В иллюстративных аспектах уровни одного или нескольких из A1G0, A2G0, A2G1a, A2G1b, A2G2 и A1G1M5 в рекомбинантном гликозилированном белке повышаются относительно таковых в контрольной культуре клеток. В иллюстративных аспектах уровни одного или нескольких из A1G1a, G0[H3N4], G0[H4N4], G0[H5N4] и FO-N[H3N3] в рекомбинантном гликозилированном белке повышаются относительно таковых в контрольной культуре клеток. В некоторых аспектах повышение представляет собой повышение относительно контрольной культуры клеток, определенное с помощью жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC). В некоторых аспектах повышение представляет собой повышение относительно контрольной культуры клеток, определенное с помощью способов, известных специалисту в данной области техники.

[00113] В некоторых аспектах с помощью способов по настоящему изобретению повышают уровни ТАФ-, НМ- или афуко-гликоформы до любой степени или уровня относительно таковых в контрольной культуре клеток. Например, в некоторых аспектах повышение, обеспечиваемое с помощью способов по настоящему изобретению, представляет собой повышение на величину от по меньшей мере или приблизительно 1% до приблизительно 10% (например, повышение на по меньшей мере или приблизительно 1%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 2%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 3%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 4%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 5%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 6%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 7%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 8%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 9%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 9,5%,

повышение на по меньшей мере или приблизительно 9,8%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 10%) относительно контрольной культуры клеток. В иллюстративных вариантах осуществления повышение, обеспечиваемое с помощью способов по настоящему изобретению, представляет собой повышение на более 100%, например 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или даже 1000%, относительно контрольной культуры клеток. В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-, НМ- или афукозилированных гликоформ белка повышается в по меньшей мере приблизительно 1,5 раза относительно такого в контрольной культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-, НМ- или афукозилированных гликоформ белка повышается в по меньшей мере приблизительно 2 раза относительно такого в контрольной культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-, НМ- или афукозилированных гликоформ белка повышается в по меньшей мере приблизительно 3 раза относительно такого в контрольной культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-, НМ- или афукозилированных гликоформ белка повышается в по меньшей мере приблизительно 4 раза или в приблизительно 5 раз относительно такого в контрольной культуре клеток.

[00114] В иллюстративных аспектах повышенный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять уже на 1-й день после изменения концентрации фукозы и/или глюкозы. В иллюстративных аспектах повышенный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять уже на 2-й день после изменения. В иллюстративных аспектах повышенный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять уже на 3-й день после изменения. В иллюстративных аспектах повышенный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять уже на приблизительно 4-й день после изменения. В иллюстративных аспектах повышенный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять уже после приблизительно 5-го дня после изменения. В иллюстративных аспектах повышенный уровень ТАФ-гликоформ белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять во время сбора рекомбинантного гликозилированного белка из культуры клеток.

[00115] В иллюстративных аспектах повышенный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают дольше, чем до приблизительно 4-го, 5-го или 6-го дня культивирования клеток или дольше. В иллюстративных аспектах повышенный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают в течение 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней культивирования клеток (после инокуляции) или дольше (например, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца,

приблизительно 3 месяца, приблизительно 6 месяцев или приблизительно 1 год). В иллюстративных аспектах повышенный уровень TAF-гликоформ белка наблюдается во время сбора белка из культуры клеток.

[00116] В других аспектах способы по настоящему изобретению относятся к снижению уровней TAF-гликоформ белка, получаемом с помощью клеток в культуре клеток. В иллюстративных аспектах уровни НМ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка являются пониженными относительно таковых в контрольной культуре клеток. В иллюстративных аспектах уровни одного или нескольких из Man5, Man6, Man7, Man8 и/или Man9 в рекомбинантном гликозилированном белке являются пониженными относительно таковых в контрольной культуре клеток. В иллюстративных аспектах уровни афукозилированных гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка являются пониженными относительно таковых в контрольной культуре клеток. В иллюстративных аспектах уровни одного или нескольких из A1G0, A2G0, A2G1a, A2G1b, A2G2 и A1G1M5 в рекомбинантном гликозилированном белке являются пониженными относительно таковых в контрольной культуре клеток. В иллюстративных аспектах уровни одного или нескольких из A1G1a, G0[H3N4], G0[H4N4], G0[H5N4] и FO-N[H3N3] в рекомбинантном гликозилированном белке являются пониженными относительно таковых в контрольной культуре клеток. В иллюстративных аспектах способ представляет собой способ снижения уровня TAF-гликоформ на величину от приблизительно 1% до приблизительно 4%, и способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в первой среде для культивирования клеток и повышение концентрации фукозы до значения, составляющего от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л. В некоторых аспектах снижение представляет собой снижение относительно контрольной культуры клеток, определенное с помощью HPLC. В некоторых аспектах снижение представляет собой снижение относительно контрольной культуры клеток, определенное с помощью способов, известных специалисту в данной области техники.

[00117] В некоторых аспектах с помощью способов по настоящему изобретению снижают уровень(уровни) TAF-, НМ- или афукозилированной гликоформы до любой степени или уровня относительно таковых в контрольной культуре клеток. Например, снижение, обеспечиваемое с помощью способов по настоящему изобретению, представляет собой снижение на величину от по меньшей мере или приблизительно 0,1% до приблизительно 1% (например, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,1%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,2%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,3%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,4%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,5%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,6%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,7%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,8%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,9%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,95%, снижение на по меньшей мере или приблизительно 0,98%, снижение на по меньшей мере

или приблизительно 1,0%) относительно уровня в контрольной культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления снижение, обеспечиваемое с помощью способов по настоящему изобретению, представляет собой снижение на более приблизительно 100%, например приблизительно 200%, приблизительно 300%, приблизительно 400%, приблизительно 500%, приблизительно 600%, приблизительно 700%, приблизительно 800%, приблизительно 900% или даже приблизительно 1000% относительно уровня в контрольной культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-, НМ- или афукозилированных гликоформ белка является пониженным в по меньшей мере или приблизительно 1,5 раза относительно такового в контрольной культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-, НМ- или афукозилированных гликоформ белка является пониженным в по меньшей мере приблизительно 2 раза относительно такового в контрольной культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-, НМ- или афукозилированных гликоформ белка является пониженным в по меньшей мере приблизительно 3 раза относительно такового в контрольной культуре клеток. В иллюстративных вариантах осуществления уровень ТАФ-, НМ- или афукозилированных гликоформ белка является пониженным в по меньшей мере приблизительно 4 раза или в по меньшей мере приблизительно 5 раз относительно такового в контрольной культуре клеток.

[00118] В иллюстративных аспектах пониженный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять уже на приблизительно 1-й день после инокуляции. В иллюстративных аспектах пониженный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять уже на приблизительно 2-й день после инокуляции. В иллюстративных аспектах пониженный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять уже на приблизительно 3-й день после инокуляции. В иллюстративных аспектах пониженный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять уже на приблизительно 4-й день после инокуляции. В иллюстративных аспектах пониженный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять после приблизительно 5-го дня после инокуляции. В иллюстративных аспектах пониженный уровень ТАФ-гликоформ рекомбинантного гликозилированного белка наблюдают или могут наблюдать или выявляют или могут выявлять приблизительно во время сбора белка из культуры клеток.

[00119] В иллюстративных аспектах пониженный уровень ТАФ-гликоформ белка наблюдают дольше, чем до приблизительно 4-го, приблизительно 5-го или приблизительно 6-го дня культивирования клеток или после начального периода культивирования клеток. В иллюстративных аспектах пониженный уровень ТАФ-гликоформ белка наблюдают в течение приблизительно 7, приблизительно 8,

приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11 или приблизительно 12 дней культивирования клеток (после инокуляции) или дольше (например, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 6 месяцев или приблизительно 1 год). В иллюстративных аспектах пониженный уровень ТАФ-гликоформ белка наблюдают приблизительно во время сбора белка из культуры клеток.

[00120] Что касается способов по настоящему изобретению, модулирование, повышение или снижение, на которые оказывают влияние такие способы, приводят относительно "контроля" или "контрольной культуры клеток." В иллюстративных аспектах контрольным является уровень ТАФ-гликоформ белка, наблюдаемый когда не осуществляют стадий способа по настоящему изобретению. В иллюстративных аспектах контрольным является уровень ТАФ-гликоформ белка, наблюдаемый когда осуществляют известный способ получения с помощью технологии рекомбинантной ДНК. В иллюстративных аспектах контрольным является уровень ТАФ-гликоформ, наблюдаемый когда известная концентрация глюкозы или фукозы поддерживается во время получения с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Применяемый в данном документе термин "контрольная культура клеток" означает культуру клеток, поддерживаемую таким же образом, как и культура клеток, в отношении которой осуществляют стадии способа по настоящему изобретению (например, культура клеток согласно раскрытым способам), за исключением концентрации фукозы/глюкозы. В иллюстративных аспектах контрольная культура клеток представляет собой культуру клеток, поддерживаемую при известных рабочих или стандартных параметрах, включая контрольную концентрацию фукозы/глюкозы. Применяемый в данном документе термин "контрольная концентрация фукозы" или "контрольная концентрация глюкозы" может относиться к известной рабочей концентрации фукозы/глюкозы, например к концентрации фукозы/глюкозы в культуре клеток, поддерживаемой в первый момент времени или в момент времени перед осуществлением способов по настоящему изобретению. В иллюстративных аспектах контрольная концентрация фукозы/глюкозы представляет собой концентрацию фукозы/глюкозы в культуре клеток, для которой уровни ТАФ известны или определены.

[00121] В иллюстративных аспектах способов модулирования по настоящему изобретению компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. Необязательно компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кето-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимераз, -4-редуктазу.

[00122] В иллюстративных аспектах после осуществления способов по настоящему изобретению уровень ТАФ-гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 10%, например от приблизительно 2% до приблизительно 6%, от приблизительно 2% до приблизительно 5% или от приблизительно 2% до приблизительно 4%.

[00123] В иллюстративных аспектах после осуществления способов по настоящему изобретению уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 3,5%, необязательно от приблизительно 0,7% до приблизительно 3,0%.

[00124] В иллюстративных аспектах после осуществления способов по настоящему изобретению уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 3,5%, необязательно от приблизительно 0,8% до приблизительно 2,8%.

[00125] Что касается способов модулирования, описанных в данном документе, включающих добавление фукозы, конечная концентрация фукозы в среде для культивирования клеток в различных аспектах составляет от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л или от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 0,5 г/л. Однако рассматривается любая из концентраций фукозы, описанных в данном документе.

[00126] Что касается способов модулирования, описанных в данном документе, включающих добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, в некоторых аспектах глюкозу добавляют в соответствии с режимом подпитки глюкозой, при котором обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше или приблизительно 9 г/л или меньше. В некоторых аспектах средняя концентрация глюкозы составляет менее приблизительно 6,0 г/л, необязательно менее приблизительно 4,0 г/л. В некоторых случаях средняя концентрация глюкозы основана на концентрации фукозы в среде для культивирования клеток. Например, среднюю концентрацию глюкозы можно рассчитать на основе формулы I:

$$T=3,354-1,388F+0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

Формула I,

где T представляет собой заданный % TAF-гликанов и составляет от 2,5% до приблизительно 6%, от приблизительно 2,75% до приблизительно 5,5% или от приблизительно 3% до приблизительно 5%; F представляет собой концентрацию (г/л) фукозы в среде; и G представляет собой среднюю концентрацию глюкозы (г/л).

[00127] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы модулирования (снижения или повышения) уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает снижение значения pH среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 1,2 (например, от 0,05 до приблизительно 1,0), для снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 2% (например, от 0,5% до приблизительно 1,5%,

от 0,5% до приблизительно 1,0%, от 1,0% до приблизительно 2%, от 1,5% до приблизительно 2,0%), или повышение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 1,2 (например, от 0,05 до приблизительно 1,0), для повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 2% (например, от 0,5% до приблизительно 1,5%, от 0,5% до приблизительно 1,0%, от 1,0% до приблизительно 2%, от 1,5% до приблизительно 2,0%). В иллюстративных аспектах способ включает снижение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2 (например, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 1,1, 1,11, 1,12, 1,13, 1,14, 1,15, 1,16, 1,17, 1,18, 1,19, 1,20), для снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2% (например, от 1,0% до 1,5%, от 1,5% до 2,0%), или повышение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2 (например, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 1,1, 1,11, 1,12, 1,13, 1,14, 1,15, 1,16, 1,17, 1,18, 1,19, 1,20), для повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2% (например, от 1,0% до 1,5%, от 1,5% до 2,0%). В различных случаях способ включает снижение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,07 (например, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07), для снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1% (например, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 1,0%, 1,01%, 1,02%, 1,03%, 1,04%, 1,05%, 1,06%, 1,07%, 1,08%, 1,09%, 1,10%), или повышение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,07 (например, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07), для повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1% (например, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 1,0%, 1,01%, 1,02%, 1,03%, 1,04%, 1,05%, 1,06%, 1,07%, 1,08%, 1,09%, 1,10%).

[00128] В данном документе также предусмотрены способы снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного

гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает снижение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2. Необязательно способ включает снижение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,07, для снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 1% или снижение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,09 до приблизительно 1,2, для снижения уровня афукозилированных гликанов на более приблизительно 1,5%. В различных аспектах способ включает культивирование клеток при значении рН, составляющем от приблизительно 7,10 до приблизительно 7,20, необязательно от приблизительно 7,12 до приблизительно 7,19.

[00129] Кроме того, предусмотрены способы снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1%. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает снижение значения рН среды для культивирования клеток на приблизительно 0,03-0,07. В различных аспектах способ включает снижение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,06, для снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 0,8%. В некоторых аспектах способ включает снижение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,07, для снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 1%. В различных случаях способ включает культивирование клеток при значении рН, составляющем от приблизительно 7,05 до приблизительно 7,15, необязательно от приблизительно 7,07 до приблизительно 7,13.

[00130] В настоящем изобретении предусмотрены способы повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает повышение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2. Необязательно способ включает повышение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,07, для снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 1% или повышение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,09 до приблизительно 1,2, для снижения уровня афукозилированных гликанов на более

приблизительно 1,5%. В некоторых аспектах способ включает культивирование клеток при значении рН, составляющем от приблизительно 7,10 до приблизительно 7,20, необязательно от приблизительно 7,12 до приблизительно 7,19.

[00131] В настоящем изобретении также предусмотрены способы повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1%. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает повышение значения рН среды для культивирования клеток на приблизительно 0,03-0,07, или повышение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,06, для снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 0,8%, или повышение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,07, для снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 1%. В различных случаях способ включает культивирование клеток при значении рН, составляющем от приблизительно 7,05 до приблизительно 7,15, необязательно от приблизительно 7,07 до приблизительно 7,13.

[00132] В любом из вышеуказанных способов значение рН среды для культивирования клеток на всем протяжении культивирования составляет более 7,0, необязательно от более 7,05 до менее 7,2. В некоторых аспектах уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) составляет менее приблизительно 10%, например от приблизительно 6,2% до приблизительно 8,4%. В любом из вышеуказанных способов температура изменяется на менее 2 градуса С в течение периода культивирования. Например, в некоторых аспектах температура культуры изменяется на не более 1,5 или 1,0 градуса С. В любом из вышеуказанных способов среда для культивирования клеток не содержит каких-либо поддающихся выявлению количеств марганца или бетаина. Среда для культивирования клеток в некоторых аспектах содержит от приблизительно 0,10 г/л до приблизительно 1,0 г/л фукозы, необязательно от приблизительно 0,17 до приблизительно 1,0 г/л фукозы. Необязательно фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации менее приблизительно 0,75 г/л, менее приблизительно 0,6 г/л или от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 0,5 г/л. Добавление или присутствие фукозы в среде для культивирования может соответствовать любому из принципов, предусмотренных в данном документе. В иллюстративных аспектах компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. В любом из вышеуказанных способов глюкозу добавляют в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой, при котором обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей

приблизительно 10 г/л или меньше. Глюкозу можно добавлять в соответствии с любым из принципов, предусмотренных в данном документе.

[00133] Как рассмотрено выше, ТАФ-гликаны представляют собой суммарное количество НМ-гликанов и афукозилированных гликанов. Соответственно, раскрытые в данном документе способы модулирования афукозилированных гликанов будут в различных случаях обеспечивать модулирование уровня ТАФ-гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела). Соответственно, в данном документе предусмотрены способы модулирования уровня ТАФ-гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает модулирование уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) в соответствии с раскрытым в данном документе способом модулирования уровня афукозилированных гликанов. В иллюстративных вариантах осуществления способ модулирования ТАФ-гликанов включает снижение уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) в соответствии с раскрытым в данном документе способом снижения уровня афукозилированных гликанов или повышение уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) в соответствии с раскрытым в данном документе способом повышения уровня афукозилированных гликанов.

[00134] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен способ получения композиции на основе антитела, где уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 6,2% до приблизительно 8,4%. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток при значении рН от более 7,05 до менее 7,2,

где необязательно:

(А) значение рН среды для культивирования клеток изменяют на менее 0,15 (необязательно на менее 0,10) в течение периода культивирования, или

(В) температуру среды для культивирования клеток изменяют на не более 2 градуса С, или

(С) способ не включает культивирование клеток в среде для культивирования клеток, содержащей марганец или бетаин, или

(D) комбинация двух или трех из (A), (B) и (C).

[00135] В различных аспектах значение рН поддерживают на уровне рН от приблизительно 7,07 до приблизительно 7,19 (например, 7,08, 7,09, 7,10, 7,11, 7,12, 7,13, 7,14, 7,15, 7,16, 7,17, 7,18 или 7,19) в течение периода культивирования, необязательно, где значение рН поддерживают на уровне от приблизительно 7,07 или больше до менее 7,10, или от приблизительно 7,10 или больше до менее 7,15, или от приблизительно 7,15 или больше до приблизительно 7,19. В различных аспектах уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 10%, необязательно от приблизительно 6,2% до приблизительно 8,4%. В различных случаях температура изменяется на менее 2 градуса С в течение периода культивирования, необязательно температура культуры изменяется на не более 1,5 или 1,0 градуса С. В различных аспектах среда для культивирования клеток не содержит каких-либо поддающихся выявлению количеств марганца или бетаина. В иллюстративных аспектах среда для культивирования клеток содержит от приблизительно 0,10 г/л до приблизительно 1,0 г/л фукозы, необязательно от приблизительно 0,17 до приблизительно 1,0 г/л фукозы, необязательно фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации менее приблизительно 0,75 г/л, менее приблизительно 0,6 г/л или от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 0,5 г/л. В некоторых аспектах компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути, и в некоторых аспектах глюкозу добавляют в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой, при котором обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше.

[00136] *Иллюстративные варианты осуществления*

[00137] В настоящем изобретении предусмотрены способы получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела). В иллюстративных вариантах осуществления способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу и/или глюкозу в определенной концентрации, описанной в данном документе, зависящей от требуемого уровня TAF-гликоформ. В иллюстративных вариантах осуществления уровень TAF-гликоформ в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) составляет приблизительно 10% или меньше, и в иллюстративных аспектах способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л. В иллюстративных вариантах осуществления уровень TAF-гликоформ в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела

или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) составляет приблизительно 10% или меньше, и в иллюстративных аспектах способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. В настоящем изобретении также предусмотрены способы получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), включающие поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу и глюкозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и добавление глюкозы в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой, при котором обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше. В иллюстративных аспектах фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации менее приблизительно 0,75 г/л, необязательно менее приблизительно 0,6 г/л. В иллюстративных случаях фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 0,5 г/л. В некоторых аспектах фукоза присутствует в среде для культивирования в течение всего времени поддержания компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре клеток. В иллюстративных случаях способ получения композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела) включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в первой среде для культивирования клеток в течение начального периода времени и последующее поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток во второй среде для культивирования клеток, где первая среда для культивирования клеток не содержит фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и вторая среда для культивирования клеток содержит фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л. В некоторых случаях начальный период времени составляет от приблизительно 24 часов до приблизительно 72 часов. В альтернативных аспектах начальный период времени составляет приблизительно 72 часа или более приблизительно 72 часов, но менее 156 часов или приблизительно 156 часов. В некоторых аспектах фукозу добавляют в первую среду для культивирования на 6-й день после инокуляции культурой клеток с получением второй среды для культивирования клеток. Концентрация фукозы колеблется на приблизительно 0,2 г/л или меньше (например, 0,1 г/л или меньше) в течение времени поддержания компетентных в

отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу. В некоторых аспектах среда для культивирования клеток содержит начальную концентрацию глюкозы в течение начального периода времени. Необязательно начальная концентрация глюкозы составляет от приблизительно 1 г/л до приблизительно 15 г/л, например приблизительно 12 г/л \pm 1 г/л. В иллюстративных аспектах способ дополнительно включает добавление глюкозы в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой. В иллюстративных аспектах режим подпитки глюкозой инициируют после периода времени, составляющего от приблизительно 4 дней до приблизительно 6 дней после инокуляции культурой клеток. Например, режим подпитки глюкозой можно инициировать через приблизительно 6 дней после инокуляции культурой клеток. В иллюстративных случаях с помощью режима подпитки глюкозой обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше (например, приблизительно 9 г/л или меньше, приблизительно 6 г/л или меньше в среде для культивирования клеток, от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4 г/л). В иллюстративных случаях с помощью режима подпитки глюкозой обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, исходя из концентрации фукозы в среде для культивирования клеток. В иллюстративных аспектах среднюю концентрацию глюкозы рассчитывают с использованием формулы I:

$$T=3,354-1,388F+0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

(формула I),

где T представляет собой заданный % общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела и составляет от приблизительно 2,5% до приблизительно 6%, от приблизительно 2,75% до приблизительно 5,5% или от приблизительно 3% до приблизительно 5%, F представляет собой концентрацию (г/л) фукозы в среде, и G представляет собой среднюю концентрацию глюкозы (г/л) в среде. В иллюстративных аспектах (i) концентрация фукозы составляет приблизительно 0,2 \pm 0,1 г/л, и средняя концентрация глюкозы составляет от приблизительно 2 г/л до приблизительно 4 г/л; (ii) концентрация фукозы составляет приблизительно 0,5 \pm 0,1 г/л, и средняя концентрация глюкозы составляет от приблизительно 3 г/л до приблизительно 6 г/л; или (iii) концентрация фукозы составляет приблизительно 0,75 \pm 0,1 г/л, и средняя концентрация глюкозы составляет от приблизительно 4,5 до приблизительно 9 г/л. В иллюстративных аспектах значение pH среды для культивирования клеток составляет от приблизительно 6,85 до приблизительно 7,05 (например, от приблизительно 6,90 до приблизительно 7,00). В некоторых аспектах компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. Например, компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кето-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимеразу, 4-редуктазу. В иллюстративных случаях уровень общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 10% (например, от

приблизительно 2% до приблизительно 6%, от приблизительно 2% до приблизительно 5%, от приблизительно 2% до приблизительно 4%). В иллюстративных случаях уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 3,5% (например, от приблизительно 0,7% до приблизительно 3,0%). В иллюстративных случаях уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 3,5% (например, от приблизительно 0,8% до приблизительно 2,8%). В некоторых аспектах компетентные в отношении гликозилирования клетки продуцируют антитела IgG, необязательно антитела IgG1. В некоторых аспектах антитела IgG1 являются специфичными к опухолеассоциированному антигену (например, CD20). В иллюстративных аспектах среда для культивирования не содержит маннозу.

[00138] Среда для культивирования клеток, содержащая: (а) компетентные в отношении гликозилирования клетки, содержащие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело; и (b) среду для культивирования, содержащую фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л или от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л. В иллюстративных аспектах компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути, необязательно, где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кето-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимеразу, 4-редуктазу. В иллюстративных аспектах среда для культивирования дополнительно содержит глюкозу в концентрации менее приблизительно 10 г/л, например менее приблизительно 9 г/л, менее приблизительно 6 г/л или от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4 г/л. В иллюстративных аспектах значение pH среды для культивирования составляет от приблизительно 6,85 до приблизительно 7,05, например от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,0. В некоторых аспектах среда для культивирования клеток не содержит маннозу. В иллюстративных аспектах антитело представляет собой антитело IgG, например антитело IgG1. В иллюстративных случаях антитело IgG1 является специфичным к опухолеассоциированному антигену, например CD20.

[00139] В данном документе дополнительно предусмотрены способы изменения или модулирования уровня TAF-гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток. В иллюстративных аспектах способ включает: (A) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л для снижения уровня TAF-гликанов; (B) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении

гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы менее приблизительно 10 г/л для повышения уровня TAF-гликанов; или (С) как (А), так и (В). Также предусмотрены способы модулирования уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает: (А) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, для достижения концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, для снижения уровня афукозилированных гликанов; (В) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, для достижения концентрации глюкозы приблизительно 10 г/л или меньше для повышения уровня афукозилированных гликанов; или (С) как (А), так и (В). В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ модулирования уровня гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе рекомбинантного гликозилированного белка (например, композиции на основе антитела или композиции на основе связывающего белка на основе антитела), полученного с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы менее приблизительно 10 г/л для повышения уровня НМ-гликанов. В иллюстративных аспектах способов модулирования компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути. Например, компетентные в отношении гликозилирования клетки в некоторых аспектах не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кето-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимеразу,-4-редуктазу. В некоторых аспектах уровень TAF-гликанов в композиции на основе антитела составляет приблизительно 10% или меньше (например, от приблизительно 2% до приблизительно 6%, от приблизительно 2% до приблизительно 5%, от приблизительно 2% до приблизительно 4%). В некоторых аспектах уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет приблизительно 3,5% или меньше (например, от приблизительно 0,7% до приблизительно 3,0%). В некоторых аспектах уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет приблизительно 3,5% или меньше (например, от приблизительно 0,8% до приблизительно 2,8%). В иллюстративных аспектах концентрация фукозы составляет от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л, необязательно от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 0,5 г/л. В некоторых аспектах способ дополнительно включает добавление глюкозы в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой, с помощью

которого обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л (например, менее приблизительно 9,0 г/л, менее приблизительно 6,0 г/л, менее приблизительно 4,0 г/л). В некоторых случаях средняя концентрация глюкозы основана на концентрации фукозы в среде для культивирования клеток. Например, в некоторых аспектах среднюю концентрацию глюкозы рассчитывают с использованием формулы I:

$$T=3,354-1,388F+0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

Формула I,

где T представляет собой заданный % общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела и составляет от приблизительно 2,5% до приблизительно 6%, от приблизительно 2,75% до приблизительно 5,5% или от приблизительно 3% до приблизительно 5%, F представляет собой концентрацию (г/л) фукозы в среде, и G представляет собой среднюю концентрацию глюкозы (г/л).

[00140] Следующие примеры даны лишь для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают каким-либо образом его объем.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

[00141] В данном примере описываются осуществляемые способы и материалы, применяемые в экспериментах в примере 2.

[00142] Линии клеток, культура клеток и среды

[00143] Все эксперименты проводили с применением клона, экспрессирующего антитело, содержащее легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 2. Все эксперименты проводили с применением отдельного флакона с клетками, культивируемыми в течение 25 дней. Следующие параметры сохраняли постоянными: продолжительность (12 дней), растворенный кислород (от 48 мм рт. ст. до 74 мм рт. ст.), значение pH (от 6,85 до 7,05), перемешивание (350 об./мин., 20 Вт/м³), температура (36,0°C).

[00144] Карта гликанов, составленная с помощью жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC)

[00145] Карту гликанов, представляющих собой ферментативно высвобожденные N-связанные гликаны, составляли с применением HILIC. Вкратце, гликаны инкубировали с раствором, содержащим PNGазу F и натрий-фосфатный буфер (pH 7,5), в течение ~2 часов при ~37°C. Раствор для мечения, содержащий 2-аминобензойную кислоту (2-AA) и цианоборгидрид натрия, затем добавляли к обработанным PNGазой F гликанам и смесь инкубировали при ~80°C в течение приблизительно 75 минут. После инкубации смеси центрифугировали с получением осадка осажденного белка. Образцы надосадочной жидкости собирали и помещали во флаконы.

[00146] Гликаны разделяли с помощью HILIC со встроенным детектором флуоресценции: гликаны вводили в колонку и связывали с ней в условиях с высоким содержанием органических веществ (подвижная фаза А и подвижная фаза В представляли

собой формиат аммония и ацетонитрил соответственно), а затем элюировали с применением возрастающего градиента буфера на основе водного раствора формиата аммония. Высокого разрешения достигали с применением формата колонки с небольшими частицами диаметром 1,7 мкм и длины колонки, составляющей 150 мм. Общее время прогона, включая повторное уравнивание колонки, составляло 155 минут.

ПРИМЕР 2

[00147] В данном примере продемонстрированы эффекты повышения уровней глюкозы и фукозы в среде для культивирования в отношении % TAF.

[00148] Клетки, экспрессирующие антитело, содержащее легкую цепь под SEQ ID NO: 1 и тяжелую цепь под SEQ ID NO: 2, добавляли в биореактор, содержащий одну из трех сред для культивирования: контрольную среду для культивирования, первую тестируемую среду для культивирования и вторую тестируемую среду для культивирования. Первая тестируемая среда для культивирования была идентична контрольной среде для культивирования, за исключением того, что она содержала двойное количество глюкозы, и вторая тестируемая среда для культивирования представляла собой контрольную среду для культивирования с 0,5 г/л фукозы. Каждая из сред для культивирования не содержала маннозу. Культуру клеток поддерживали в течение 12 дней при значении pH в диапазоне 6,85-7,05.

[00149] Образцы сред периодически отбирали из биореакторов для измерения концентрации глюкозы, уровней TAF и уровней ADCC. Уровни TAF- и/или афукозилированных (афук-) гликанов анализировали с помощью процедуры картирования N-гликанов с помощью HILIC, а способность к стимуляции ADCC тестировали с применением анализа *in vitro*. Результаты показаны в таблице 1 ниже.

ТАБЛИЦА 1

<u>Среда для культивирования</u>	<u>Уровень TAF (%)</u>	<u>ADCC (%)</u>
Заданный диапазон	2,0-4,2%	69-97%
Контроль	4,00 ± 0,23%	~100%
Первый тест	5,87 ± 0,23%	152 ± 15%
Второй тест	~3,4%	~85%

Уровни ADCC выражали в виде % относительно уровня ADCC, достигнутого с помощью контроля, который представляет собой коммерчески доступное антитело, характеризующееся такой же аминокислотной последовательностью.

[00150] Концентрации глюкозы определяли на всем протяжении цикла культивирования и результаты этих измерений наносили на график в виде зависимости от времени и относительно уровней TAF в антителах, полученных с применением каждого типа среды для культивирования клеток. Результаты показаны на фиг. 3. Как показано на данной фиг., антитела, продуцируемые клетками, культивируемыми в первой тестируемой

культуре, демонстрировали повышение уровня TAF, при этом данное повышение соответствовало повышению уровней глюкозы в культуре клеток. Эти результаты (и результаты из таблицы 1) указывают на то, что глюкоза способна оказывать влияние на уровни TAF и ADCC.

[00151] Антитела, продуцируемые клетками, культивируемыми во второй тестируемой среде для культивирования, содержащей 0,5 г/л фукозы, демонстрировали ~1% снижение уровня TAF (фиг. 3). Как показано на фиг. 3, концентрация фукозы не изменилась значительно в течение 12 дней прогона, вероятно из-за того, что поглощение фукозы клетками было незначительным.

[00152] Проводили дополнительный анализ отдельных видов гликанов в антителах, полученных с применением каждой из различных сред для культивирования. Интересно, что, как показано на фиг. 4, % гликанов с высоким содержанием маннозы (НМ) повышался, если клетки культивировали в первой тестируемой среде, которая содержала в 2 раза большее количество глюкозы по сравнению с контрольной средой. Это повышение % НМ-гликанов не было достигнуто с помощью клеток, культивируемых во второй тестируемой среде, содержащей фукозу. Как показано на фиг. 4, % НМ-гликанов в антителах, продуцируемых клетками, культивируемыми во второй тестируемой среде, содержащей фукозу, был приблизительно таким же, как % НМ-гликанов в антителах, продуцируемых клетками, культивируемыми в контрольной среде.

[00153] Эффекты культивирования в среде, содержащей двойное количество глюкозы (первая тестируемая среда) или содержащей фукозу (вторая тестируемая среда), в отношении % афукозилированных гликанов, были аналогичны эффектам таковых в отношении % TAF-гликанов. Как показано на фиг. 5, клетки, культивируемые в первой тестируемой среде, содержащей более высокую концентрацию глюкозы, демонстрировали повышение уровня афукозилированных гликанов, тогда как клетки, культивируемые во второй тестируемой среде, содержащей фукозу, продуцировали антитела с пониженным уровнем афукозилированных гликанов.

[00154] В данном примере продемонстрировано, что глюкоза и фукоза являются рычагами, которые можно применять для модулирования уровней гликанов с высоким содержанием маннозы и афукозилированных гликанов, а также для влияния на ADCC.

ПРИМЕР 3

[00155] В данном примере продемонстрированы дополнительные исследования, демонстрирующие, что глюкоза и фукоза являются рычагами для модулирования уровней TAF и ADCC.

[00156] Проспективный многомерный полнофакторный эксперимент разрабатывали для (1) выяснения основных эффектов, эффектов взаимодействия и квадратичных эффектов для переменных, представляющих собой фукозу и глюкозу, и (2) установления количеств этих переменных, которые приводили бы к изменению уровней TAF-гликанов и ADCC. Фукозу оценивали в среде для культивирования в концентрациях, составляющих 0 г/л, 0,5 г/л и 1 г/л. Глюкозой подпитывали при нормах 0X, 1X (контроль)

и 2X. 0X означало, что к культурам не добавляли исходный раствор глюкозы, и в результате этого остаточная концентрация глюкозы после дня 6 культивирования клеток составляла ~ 1 г/л. Глюкозу подавали только при применении сред, которые содержали 12 г/л сахара. При 1X-подпитке глюкозу поддерживали в средней концентрации, составляющей 3 ± 1 г/л после начала подпитки глюкозой. При 2X-подпитке средние уровни глюкозы поддерживали на уровне 6 ± 1 г/л. Результаты указывают на то, что концентрации фукозы можно изменять для обеспечения влияния на уровни TAF (фиг. 6) и уровни ADCC (фиг. 7).

[00157] В этих экспериментах концентрацию глюкозы контролировали на уровне 3 ± 1 г/л после начала подпитки (т. е. после дня 6). Если концентрации глюкозы превышали 4 г/л, дополнительную глюкозу не добавляли, и клетки должны были использовать остаточную глюкозу в биореакторе и глюкозу, поступающую через перфузионную среду, до тех пор, пока уровень глюкозы не попадал в пределы контрольного диапазона. На основе этих экспериментов были предсказаны значения TAF для различных концентраций фукозы и глюкозы в соответствии с моделью, показанной на фиг. 8. Модель демонстрирует, что целевой профиль качества продукта (QTP) может быть достигнут при культивировании клеток в среде для культивирования, содержащей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л фукозы и/или от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4,0 г/л глюкозы. С применением данной модели были предсказаны значения TAF для следующих различных концентраций фукозы и глюкозы: 0,2 г/л фукозы и 3 г/л глюкозы, 0 г/л фукозы и 0,554 г/л глюкозы; и 0,492 г/л фукозы и 6 г/л глюкозы. Фиг. 9А-9С. Эти результаты указывают на то, что существует несколько путей достижения требуемых уровней TAF и уровней ADCC.

[00158] Для подтверждения предсказаний из фиг. 9А-9С проводили дополнительные эксперименты. Краткое описание экспериментов представлено в таблице 2.

ТАБЛИЦА 2

Условия	Фукоза (г/л)	Глюкоза (г/л)	TAF (95% CI)	Фактический уровень TAF	ADCC (95% CI)	Фактический уровень ADCC
1	0	0X	3,50- 4,06	3,50	75,7-90,9	80,13
2 (контроль)	0	1X	3,68- 4,22	3,84	84,5-101,1	100,3
3	0,2	1X	3,30- 3,73	3,35	78,3-90,4	85,9
4	0,5	1X	2,67-	2,94	66,8-83,14	76,2

			3,30			
--	--	--	------	--	--	--

0X - измеренная концентрация глюкозы составляла ~ 1 г/л после дня 6; 1X - измеренная концентрация глюкозы составляла ~ 3 ± 1 г/л; 2X - измеренная концентрация глюкозы составляла ~ 6 ± 1 г/л.

[00159] В данном примере продемонстрировано, что как концентрация глюкозы, так и концентрация фукозы являются переменными, которыми можно манипулировать для изменения уровней TAF и ADCC.

ПРИМЕР 4

[00160] В данном примере продемонстрировано влияние фукозы на культуры клеток.

[00161] Дополнительные анализы проводили на культурах клеток, описанных выше. Например, для культур клеток измеряли осмоляльность, и она находилась в диапазоне от приблизительно 175 мОсм/кг до приблизительно 345 мОсм/кг. Наблюдали отсутствие корреляции между осмоляльностью культур клеток и концентрацией фукозы. См. фиг. 10. Как показано на данной фиг., добавление фукозы в среду для культивирования, по-видимому, не оказывает влияния на осмоляльность каким-либо конкретным образом. То, что осмоляльность сильно варьировала в контрольных условиях (без фукозы), указывает на то, что компоненты в среде для культивирования (отличные от фукозы) активно оказывают влияние на осмоляльность.

[00162] В одном эксперименте этого исследования в отношении фукозы клетками инокулировали один из пяти биореакторов, два из которых содержали среду для культивирования без фукозы (ctrl_a и ctrl_b), и три из которых содержали среду для культивирования с 0,5 г/л фукозы (fuc_a, fuc_b и fuc_c). Образцы сред из пяти культур клеток собирали на протяжении всего 12-дневного периода культивирования: в день 0, день 3, день 5, день 7, день 9 и день 12. В образцах измеряли концентрацию фукозы. Как показано на фиг. 11, концентрация фукозы практически не изменялась на всем протяжении культивирования, указывая на небольшое и/или медленное потребление фукозы в течение данного процесса культивирования.

[00163] В другом эксперименте этого исследования в отношении фукозы клетки поддерживали в культуре клеток в течение 12 дней в среде для культивирования, не содержащей фукозу. В этом конкретном эксперименте обеспечили отклонение значения рН культуры клеток от 7,1, что вызвало повышение % TAF до приблизительно 5,5% со дня 5 до ~дня 8. % TAF измеряли ежедневно, начиная со дня 5. В попытке модулировать уровни TAF обратно до заданного значения 4,0% фукозу добавляли в день 9 культивирования при скорости подпитки, составляющей 0,9 г/л в день. Как показано на фиг. 12, % TAF снижался от приблизительно 5,5% при добавлении фукозы в среду для культивирования. % TAF продолжал снижаться до ~3,8% в день 12. Эти данные указывают на то, что добавление фукозы может происходить в конце периода культивирования и все еще обуславливать модулирование % TAF.

[00164] В данном примере продемонстрировано влияние концентрации фукозы в

среде для культивирования на уровне ТАФ.

ПРИМЕР 5

[00165] В данном примере продемонстрировано, что поддержание уровня глюкозы в заданном диапазоне может происходить в конце периода культивирования.

[00166] Три эксперимента проводили для отслеживания времени достижения заданного диапазона глюкозы в течение 12-дневного периода культивирования. Для каждого эксперимента начальная концентрация глюкозы в каждой культуре клеток находилась в диапазоне от приблизительно 5,0 г/л до приблизительно 6,0 г/л. Концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток отслеживали ежедневно. Как показано на фиг. 13, каждая из культур клеток достигла заданной концентрации глюкозы (0,5 г/л - 4,0 г/л) в разные дни периода культивирования. В одном эксперименте (линия с незакрашенными квадратами) заданный диапазон был достигнут в день 2. Во втором эксперименте (пунктирная линия с незакрашенными ромбами) заданный диапазон был достигнут в день 4, тогда как в третьем эксперименте (пунктирная линия с незакрашенными кругами) заданный диапазон был достигнут в день 6. Несмотря на такие различия, каждая культура клеток достигла заданного диапазона % ТАФ (от ~2,0% до ~4,3%) (см. левый график на фиг. 13; третий эксперимент представлен незакрашенными кругами; второй эксперимент представлен незакрашенными ромбами; первый эксперимент представлен незакрашенными квадратами). Эти данные указывают на то, что снабжение глюкозы можно осуществлять в конце периода культивирования с достижением таких же уровней ТАФ, как в культурах, снабжение которых осуществляют ранее в течение периода культивирования.

[00167] Эти данные демонстрируют, что ранний и поздний контроль концентраций глюкозы приводит к аналогичным уровням ТАФ.

ПРИМЕР 6

[00168] В данном примере продемонстрированы эффекты снижения значения pH в культуре клеток в отношении уровня афукозилирования антитела с добавлением фукозы и без такового.

[00169] Образец культуры клеток отбирали из биореактора объемом 2000 л и применяли для инокуляции параллельных биореакторов объемом 3 л. Биореакторы объемом 2000 л и 3 л подпитывали с применением способа непрерывного культивирования с подпиткой с помощью подпитки А и подпитки В в течение 12 дней. Два из биореакторов объемом 3 л подпитывали фукозой до достижения конечной концентрации, составляющей 1,0 г/л, в день 5. Уровень афукозилирования измеряли, как описано в примере 1, и результаты представлены в таблице 3.

ТАБЛИЦА 3

Значение pH	Добавление фукозы	% афукозилирования
7,09	-	6,29
7,09	-	6,317

7,07	-	6,559
7,07	+	4,384
7,12	-	7,13
7,13	-	7,24
7,18	-	8,365
7,19	-	7,917
7,18	+	6,183

[00170] Как показано в таблице 3, в отсутствие добавления фукозы, если значение рН было ниже 7,1, средний % афукозилирования составлял 6,39, в то время как если значение рН было выше 7,10, но ниже 7,15, средний % афукозилирования был выше (% афукозилирования=7,185). Если значение рН было выше 7,15, средний % афукозилирования был еще выше (% афукозилирования=8,276). Таким образом, более низкое значение рН было соотнесено с более низким % афукозилирования.

[00171] Если фукозу добавляли в среду для культивирования (с достижением конечной концентрации, составляющей 1,0 г/л фукозы), % афукозилирования существенно снижался как при более низком значении рН (7,07), так и при более высоком значении рН (7,18). Для каждого из этих уровней рН, если добавляли фукозу, среднее снижение % афукозилирования составляло 2,18%.

[00172] Эти результаты указывают на то, что снижение значения рН среды для культивирования клеток и/или добавление фукозы в среду для культивирования клеток приводит к снижению процента афукозилирования. При одновременном снижении значения рН и добавлении фукозы в среду для культивирования клеток наблюдали большее снижение процента афукозилирования.

ПРИМЕР 7

[00173] В данном примере дополнительно продемонстрированы эффекты снижения рН в культуре клеток в отношении уровня афукозилирования антитела с добавлением фукозы и без такового.

[00174] Образец культуры клеток из биореактора объемом 2000 л применяли для инокуляции параллельных биореакторов объемом 3 л. Биореакторы объемом 2000 л и 3 л подпитывали с применением способа непрерывного культивирования с подпиткой с помощью подпитки А и подпитки В в течение 12 дней. Некоторые из биореакторов (т. е. культуру клеток) подпитывали фукозой до конечной концентрации, составляющей 0,25, 0,5 или 1 г/л в день 5. Уровни афукозилирования измеряли, как описано в примере 1, и результаты представлены на фиг. 14.

[00175] Как показано на фиг. 14, контрольный биореактор объемом 3 л (контрольное значение рН 7,1) демонстрировал уровень афукозилирования, аналогичный таковому в исходном биореакторе объемом 2000 л. Оба реактора демонстрировали % афукозилирования, составляющий приблизительно 6,5% или больше. Добавление фукозы при любом из тестируемых уровней приводило к существенному снижению %

афукозилирования (5,5% или ниже). Процент афукозилирования являлся наиболее низким при добавлении 0,25 г/л фукозы.

[00176] Также, как показано на фиг. 14, снижение значения pH с 7,1 до 7,0 без добавления фукозы в среду для культивирования также приводило к снижению афукозилирования на по меньшей мере приблизительно 1,0%.

[00177] Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждый документ был отдельно и конкретно указан как включенный посредством ссылки и был представлен во всей своей полноте в данном документе.

[00178] Применение терминов в единственном числе, множественном числе и аналогичных определений в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное число, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или это явно не противоречит контексту. Термины "предусматривающий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует толковать как открытые термины (т. е., означающие "включающий без ограничения"), если не указано иное.

[00179] Предусматривается, что приведение диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения индивидуального указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон, и каждой конечной точки, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение и конечная точка включены в настоящее описание, как если бы они были индивидуально упомянуты в данном документе.

[00180] Все способы, описанные в данном документе, можно выполнять в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе, или иное явно не противоречит контексту. Применение любых видов примеров или иллюстративных формулировок (например, "такой как"), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения и не накладывает ограничений на объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна толковаться как указывающая на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации настоящего изобретения.

В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, включая наилучший способ, известный авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения вышеуказанного описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в данной области техники будут использовать такие вариации соответствующим образом, и авторы настоящего изобретения предполагают, что настоящее изобретение будет реализовано на практике иначе, чем

конкретно описано в данном документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, упомянутого в прилагаемой к данному документу формуле изобретения, в установленных применимым законом пределах. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариациях охватывается настоящим изобретением, если в данном документе не указано иное, или иное явно не противоречит контексту.

1. Способ получения композиции на основе антитела, где уровень общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 10%, при этом способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л.

2. Способ получения композиции на основе антитела, где уровень общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 10%, при этом способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути.

3. Способ получения композиции на основе антитела, включающий поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу и глюкозу, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и глюкозу добавляют в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой, с помощью которого обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации менее приблизительно 0,75 г/л.

5. Способ по п. 4, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации менее приблизительно 0,6 г/л.

6. Способ по п. 5, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации, составляющей от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 0,5 г/л.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где фукоза присутствует в среде для культивирования в течение всего времени поддержания компетентных в отношении гликозилирования клеток в культуре клеток.

8. Способ по любому из пп. 1-6, включающий поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в первой среде для культивирования клеток в течение начального периода времени и последующее поддержание компетентных в

отношении гликозилирования клеток во второй среде для культивирования клеток, где первая среда для культивирования клеток не содержит фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, и вторая среда для культивирования клеток содержит фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л.

9. Способ по п. 8, где начальный период времени составляет от приблизительно 24 часов до приблизительно 72 часов.

10. Способ по п. 8, где начальный период времени составляет приблизительно 72 часа или более приблизительно 72 часов, но менее 156 часов или приблизительно 156 часов.

11. Способ по любому из пп. 8-10, где фукозу добавляют в первую среду для культивирования в день 6 после инокуляции культурой клеток с получением второй среды для культивирования клеток.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где концентрация фукозы колеблется на приблизительно 0,2 г/л или меньше в течение времени поддержания компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу.

13. Способ по п. 12, где концентрация фукозы колеблется на приблизительно 0,1 г/л или меньше в течение времени поддержания компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток, содержащей фукозу.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где среда для культивирования клеток содержит начальную концентрацию глюкозы в течение начального периода времени.

15. Способ по п. 14, где начальная концентрация глюкозы составляет от приблизительно 1 г/л до приблизительно 15 г/л.

16. Способ по п. 15, где начальная концентрация глюкозы составляет приблизительно 12 г/л \pm 1 г/л.

17. Способ по любому из п. 1, п. 2 и пп. 4-16, дополнительно включающий добавление глюкозы в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой.

18. Способ по п. 17, где режим подпитки глюкозой инициируют через промежуток времени, составляющий от приблизительно 4 до приблизительно 6 дней после инокуляции культурой клеток.

19. Способ по п. 18, где режим подпитки глюкозой инициируют через приблизительно 6 дней после инокуляции культурой клеток.

20. Способ по любому из пп. 17-19, где с помощью режима подпитки глюкозой в среде для культивирования клеток обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше.

21. Способ по любому из п. 3 и пп. 17-20, где с помощью режима подпитки глюкозой в среде для культивирования клеток обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 9 г/л или меньше.

22. Способ по п. 21, где с помощью режима подпитки глюкозой в среде для культивирования клеток обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 6 г/л или меньше.

23. Способ по п. 22, где с помощью режима подпитки глюкозой в среде для культивирования клеток обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4 г/л.

24. Способ по любому из пп. 17-23, где с помощью режима подпитки глюкозой в среде для культивирования клеток обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, исходя из концентрации фукозы.

25. Способ по п. 24, где среднюю концентрацию глюкозы рассчитывают с использованием формулы I:

$$T=3,354-1,388F+0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

(формула I),

где T представляет собой заданный % общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела и составляет от приблизительно 2,5% до приблизительно 6%, от приблизительно 2,75% до приблизительно 5,5% или от приблизительно 3% до приблизительно 5%, F представляет собой концентрацию (г/л) фукозы в среде, и G представляет собой среднюю концентрацию глюкозы (г/л) в среде.

26. Способ по п. 24 или п. 25, где (i) концентрация фукозы составляет приблизительно $0,2 \pm 0,1$ г/л, и средняя концентрация глюкозы составляет от приблизительно 2 г/л до приблизительно 4 г/л; (ii) концентрация фукозы составляет приблизительно $0,5 \pm 0,1$ г/л, и средняя концентрация глюкозы составляет от приблизительно 3 г/л до приблизительно 6 г/л; или (iii) концентрация фукозы составляет приблизительно $0,75 \pm 0,1$ г/л, и средняя концентрация глюкозы составляет от приблизительно 4,5 до приблизительно 9 г/л.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где значение pH среды для культивирования клеток составляет от приблизительно 6,85 до приблизительно 7,05.

28. Способ по п. 27, где значение pH среды для культивирования клеток составляет от приблизительно 6,90 до приблизительно 7,00.

29. Способ по любому из п. 1 и пп. 3-34, где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути.

30. Способ по п. 2 и п. 29, где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кето-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимеразу/-4-редуктазу.

31. Способ по любому из пп. 3-30, где уровень общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 10%.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где уровень TAF-гликанов составляет от приблизительно 2% до приблизительно 6%.

33. Способ по п. 32, где уровень TAF-гликанов составляет от приблизительно 2%

до приблизительно 5%.

34. Способ по п. 33, где уровень ТАФ-гликанов в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 2% до приблизительно 4%.

35. Способ по любому из пп. 1-34, где уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 3,5%.

36. Способ по п. 35, где уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 0,7% до приблизительно 3,0%.

37. Способ по любому из пп. 1-36, где уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 3,5%.

38. Способ по п. 37, где уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 0,8% до приблизительно 2,8%.

39. Способ по любому из пп. 1-38, где компетентные в отношении гликозилирования клетки продуцируют антитела IgG.

40. Способ по п. 39, где компетентные в отношении гликозилирования клетки продуцируют антитела IgG1.

41. Способ по п. 40, где антитела IgG1 являются специфичными к опухолеассоциированному антигену.

42. Способ по п. 41, где опухолеассоциированный антиген содержит SEQ ID NO. 3.

43. Способ по любому из пп. 1-42, где среда для культивирования не содержит маннозу.

44. Композиция на основе антитела, полученная с помощью способа по любому из пп. 1-43.

45. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию на основе антитела по п. 44 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

46. Среда для культивирования клеток, содержащая:
компетентные в отношении гликозилирования клетки, содержащие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело; и
среду для культивирования, содержащую фукозу в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л или от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л.

47. Среда для культивирования клеток по п. 46, где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути, необязательно, где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кетозид-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимеразу/-4-редуктазу.

48. Среда для культивирования клеток по п. 46 или п. 47, где среда для культивирования дополнительно содержит глюкозу в концентрации менее

приблизительно 10 г/л, необязательно менее приблизительно 9 г/л.

49. Среда для культивирования клеток по п. 48, где концентрация глюкозы составляет приблизительно 6 г/л или меньше.

50. Среда для культивирования клеток по п. 49, где концентрация глюкозы составляет от приблизительно 0,5 г/л до приблизительно 4 г/л.

51. Среда для культивирования клеток по любому из пп. 46-50, где значение pH среды для культивирования составляет от приблизительно 6,85 до приблизительно 7,05.

52. Среда для культивирования клеток по п. 51, где значение pH среды для культивирования клеток составляет от приблизительно 6,90 до приблизительно 7,00.

53. Среда для культивирования клеток по любому из пп. 46-52, где среда для культивирования клеток не содержит маннозу.

54. Среда для культивирования клеток по любому из пп. 46-53, где антитело представляет собой антитело IgG.

55. Среда для культивирования клеток по п. 54, где антитело IgG представляет собой антитело IgG1.

56. Среда для культивирования клеток по п. 55, где антитело IgG1 является специфичным к опухолеассоциированному антигену.

57. Среда для культивирования клеток по п. 56, где опухолеассоциированный антиген содержит SEQ ID NO: 3.

58. Способ модулирования уровня TAF-гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающий: (A) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, для снижения уровня TAF-гликанов; или (B) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы, составляющей менее приблизительно 10 г/л, для повышения уровня TAF-гликанов; или (C) как (A), так и (B).

59. Способ модулирования уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающий: (A) добавление фукозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации фукозы, составляющей от приблизительно 0,1 г/л до приблизительно 1,0 г/л, для снижения уровня афукозилированных гликанов; или (B) добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше, для повышения уровня афукозилированных гликанов; или (C) как (A), так и (B).

60. Способ модулирования уровня гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении

гликозилирования клеток, включающий добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше, для повышения уровня гликанов с высоким содержанием маннозы.

61. Способ по любому из пп. 58-60, где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути.

62. Способ по п. 61, где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения нокаута гена, кодирующего GDP-кето-6-дезоксиманнозо-3,5-эпимеразу/-4-редуктазу.

63. Способ по любому из пп. 58-62, где уровень TAF-гликанов в композиции на основе антитела составляет приблизительно 10% или меньше.

64. Способ по п. 63, где уровень TAF-гликанов составляет от приблизительно 2% до приблизительно 6%.

65. Способ по п. 64, где уровень TAF-гликанов составляет от приблизительно 2% до приблизительно 5%.

66. Способ по п. 65, где уровень TAF-гликанов в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 2% до приблизительно 4%.

67. Способ по любому из пп. 58-66, где уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет приблизительно 3,5% или меньше.

68. Способ по п. 67, где уровень гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 0,7% до приблизительно 3,0%.

69. Способ по любому из пп. 58-68, где уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет приблизительно 3,5% или меньше.

70. Способ по п. 69, где уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 0,8% до приблизительно 2,8%.

71. Способ по любому из пп. 58-70, где концентрация фукозы составляет от приблизительно 0,17 г/л до приблизительно 1,0 г/л.

72. Способ по п. 71, где концентрация фукозы составляет от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 0,5 г/л.

73. Способ по любому из пп. 58-72, дополнительно включающий добавление глюкозы в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой, с помощью которого обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л, необязательно меньше.

74. Способ по п. 73, где средняя концентрация глюкозы составляет менее приблизительно 6,0 г/л, необязательно менее приблизительно 4,0 г/л.

75. Способ по п. 73 или п. 74, где средняя концентрация глюкозы получена исходя из концентрации фукозы в среде для культивирования клеток.

76. Способ по п. 75, где среднюю концентрацию глюкозы рассчитывают с

использованием формулы I:

$$T=3,354-1,388F+0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

формула I,

где T представляет собой заданный % общих афукозилированных (TAF) гликанов в композиции на основе антитела и составляет от приблизительно 3% до приблизительно 5%, F представляет собой концентрацию (г/л) фукозы в среде, и G представляет собой среднюю концентрацию глюкозы (г/л).

77. Способ модулирования уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающий снижение значения pH среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 1,2, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 2%, или повышение значения pH среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 1,2, для обеспечения повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 2%.

78. Способ по п. 77, включающий снижение значения pH среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%, или повышение значения pH среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2, для обеспечения повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%.

79. Способ по п. 77, включающий снижение значения pH среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,07, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1%, или повышение значения pH среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,07, для обеспечения повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1%.

80. Способ снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%, включающий снижение значения pH среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2.

81. Способ по п. 80, включающий снижение значения pH на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,07, для обеспечения снижения

уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 1%.

82. Способ по п. 80, включающий снижение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,09 до приблизительно 1,2, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов на более приблизительно 1,5%.

83. Способ по п. 80, включающий культивирование клеток при значении рН, составляющем от приблизительно 7,10 до приблизительно 7,20, необязательно от приблизительно 7,12 до приблизительно 7,19.

84. Способ снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1%, включающий снижение значения рН среды для культивирования клеток на приблизительно 0,03-0,07.

85. Способ по п. 84, включающий снижение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,06, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 0,8%.

86. Способ по п. 84, включающий снижение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,07, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 1%.

87. Способ по п. 84, включающий культивирование клеток при значении рН от более 7,05 до менее 7,15 или приблизительно 7,15, необязательно от приблизительно 7,07 до приблизительно 7,13.

88. Способ повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%, включающий повышение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2.

89. Способ по п. 88, включающий повышение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,07, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 1%.

90. Способ по п. 88, включающий повышение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,09 до приблизительно 1,2, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов на более приблизительно 1,5%.

91. Способ по п. 88, включающий культивирование клеток при значении рН, составляющем от приблизительно 7,10 до приблизительно 7,20, необязательно от приблизительно 7,12 до приблизительно 7,19.

92. Способ повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1%, включающий повышение значения рН среды для культивирования клеток на приблизительно 0,03-0,07.

93. Способ по п. 92, включающий повышение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,06, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 0,8%.

94. Способ по п. 92, включающий повышение значения рН на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,07, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов на приблизительно 1%.

95. Способ по п. 92, включающий культивирование клеток при значении рН от более 7,05 до менее 7,15 или приблизительно 7,15, необязательно от приблизительно 7,07 до приблизительно 7,13.

96. Способ по любому из предыдущих пунктов, где значение рН среды для культивирования клеток на всем протяжении культивирования составляет более 7,0, необязательно от более 7,05 до менее 7,2.

97. Способ по любому из предыдущих пунктов, где уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет менее приблизительно 10%.

98. Способ по п. 97, где уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 6,2% до приблизительно 8,4%.

99. Способ по любому из предыдущих пунктов, где температура изменяется на менее 2 градуса С в течение периода культивирования.

100. Способ по п. 99, где температура культивирования изменяется на не более 1,5 или 1,0 градуса С.

101. Способ по любому из предыдущих пунктов, где среда для культивирования клеток не содержит каких-либо выявляемых количеств марганца или бетаина.

102. Способ по любому из предыдущих пунктов, где среда для культивирования клеток содержит от приблизительно 0,10 г/л до приблизительно 1,0 г/л фукозы, необязательно от приблизительно 0,17 до приблизительно 1,0 г/л фукозы.

103. Способ по п. 102, где фукоза присутствует в среде для культивирования в концентрации менее приблизительно 0,75 г/л, менее приблизительно 0,6 г/л или от приблизительно 0,2 г/л до приблизительно 0,5 г/л.

104. Способ по любому из предыдущих пунктов, где компетентные в отношении гликозилирования клетки не являются генетически модифицированными для обеспечения изменения активности фермента пути *de novo* или реутилизационного пути.

105. Способ по любому из предыдущих пунктов, где глюкозу добавляют в среду для культивирования клеток в соответствии с режимом подпитки глюкозой, с помощью которого обеспечивают достижение средней концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше.

106. Способ модулирования уровня TAF-гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающий модулирование уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела в соответствии со способом по любому из пп. 77-79, снижение уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела в соответствии со

способом по любому из пп. 80-87 или повышение уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела в соответствии со способом по любому из пп. 88-105.

107. Способ получения композиции на основе антитела, где уровень афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 6,2% до приблизительно 8,4%, при этом способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток при значении рН от более 7,05 до менее 7,2,

где

(А) значение рН среды для культивирования клеток изменяют на менее 0,15 (необязательно на менее 0,10) в течение периода культивирования, или

(В) температуру среды для культивирования клеток изменяют на не более 2 градуса С, или

(С) способ не включает культивирование клеток в среде для культивирования клеток, содержащей марганец или бетаин, или

(D) комбинация двух или трех из (А), (В) и (С).

108. Способ по п. 107, где значение рН поддерживают на уровне рН, составляющем от приблизительно 7,07 до приблизительно 7,19, в течение периода культивирования, необязательно, где значение рН поддерживают на уровне от приблизительно 7,07 или больше до менее 7,10, или от приблизительно 7,10 или больше до менее 7,15, или от приблизительно 7,15 или больше до приблизительно 7,19.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ модулирования уровня гликанов с высоким содержанием маннозы в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающий добавление глюкозы в среду для культивирования клеток, содержащую компетентные в отношении гликозилирования клетки, с достижением концентрации глюкозы, составляющей приблизительно 10 г/л или меньше, для повышения уровня гликанов с высоким содержанием маннозы.

2. Способ модулирования уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающий снижение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 1,2, для обеспечения снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 2%, или повышение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,03 до приблизительно 1,2, для обеспечения повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 2%.

3. Способ снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%, включающий снижение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2.

4. Способ снижения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,1%, включающий снижение значения рН среды для культивирования клеток на приблизительно 0,03-0,07.

5. Способ повышения уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, на значение, составляющее от приблизительно 1% до приблизительно 2%, включающий повышение значения рН среды для культивирования клеток на значение, составляющее от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,2.

6. Способ модулирования уровня ТАФ-гликанов в композиции на основе антитела, полученной с помощью компетентных в отношении гликозилирования клеток, включающий модулирование уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела в соответствии со способом по п. 2, снижение уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела в соответствии со способом по п. 3 или повышение уровня афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела в соответствии со способом по п. 5.

7. Способ получения композиции на основе антитела, где уровень

афукозилированных гликанов в композиции на основе антитела составляет от приблизительно 6,2% до приблизительно 8,4%, при этом способ включает поддержание компетентных в отношении гликозилирования клеток в среде для культивирования клеток при значении рН от более 7,05 до менее 7,2,

где

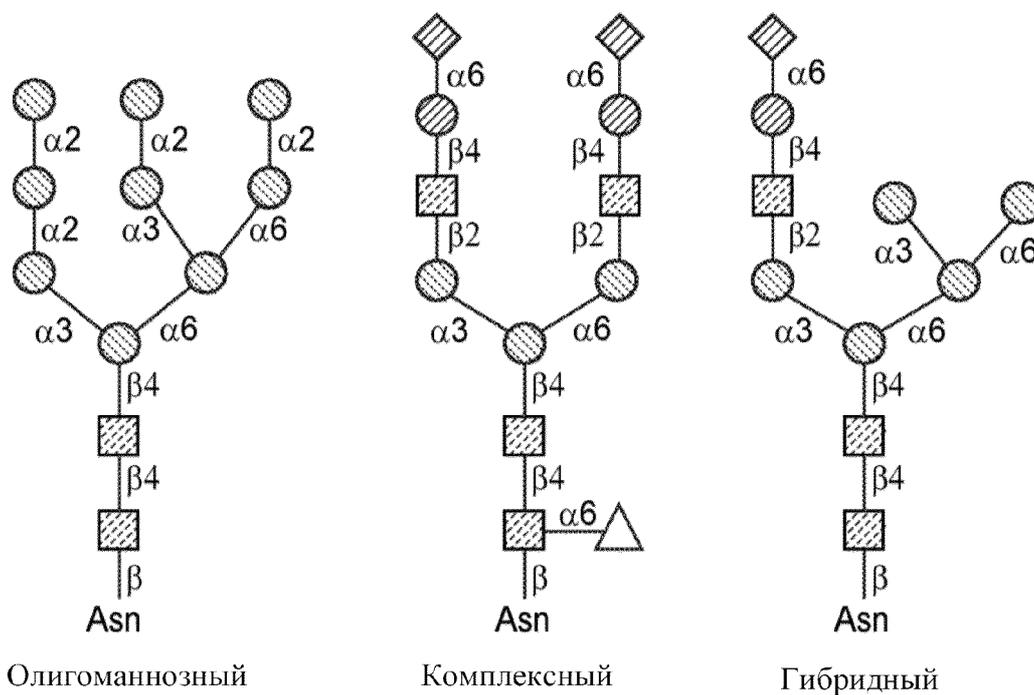
(А) значение рН среды для культивирования клеток изменяют на менее 0,15 (необязательно на менее 0,10) в течение периода культивирования, или

(В) температуру среды для культивирования клеток изменяют на не более 2 градуса С, или

(С) способ не включает культивирование клеток в среде для культивирования клеток, содержащей марганец или бетаин, или

(D) комбинация двух или трех из (А), (В) и (С).

По доверенности



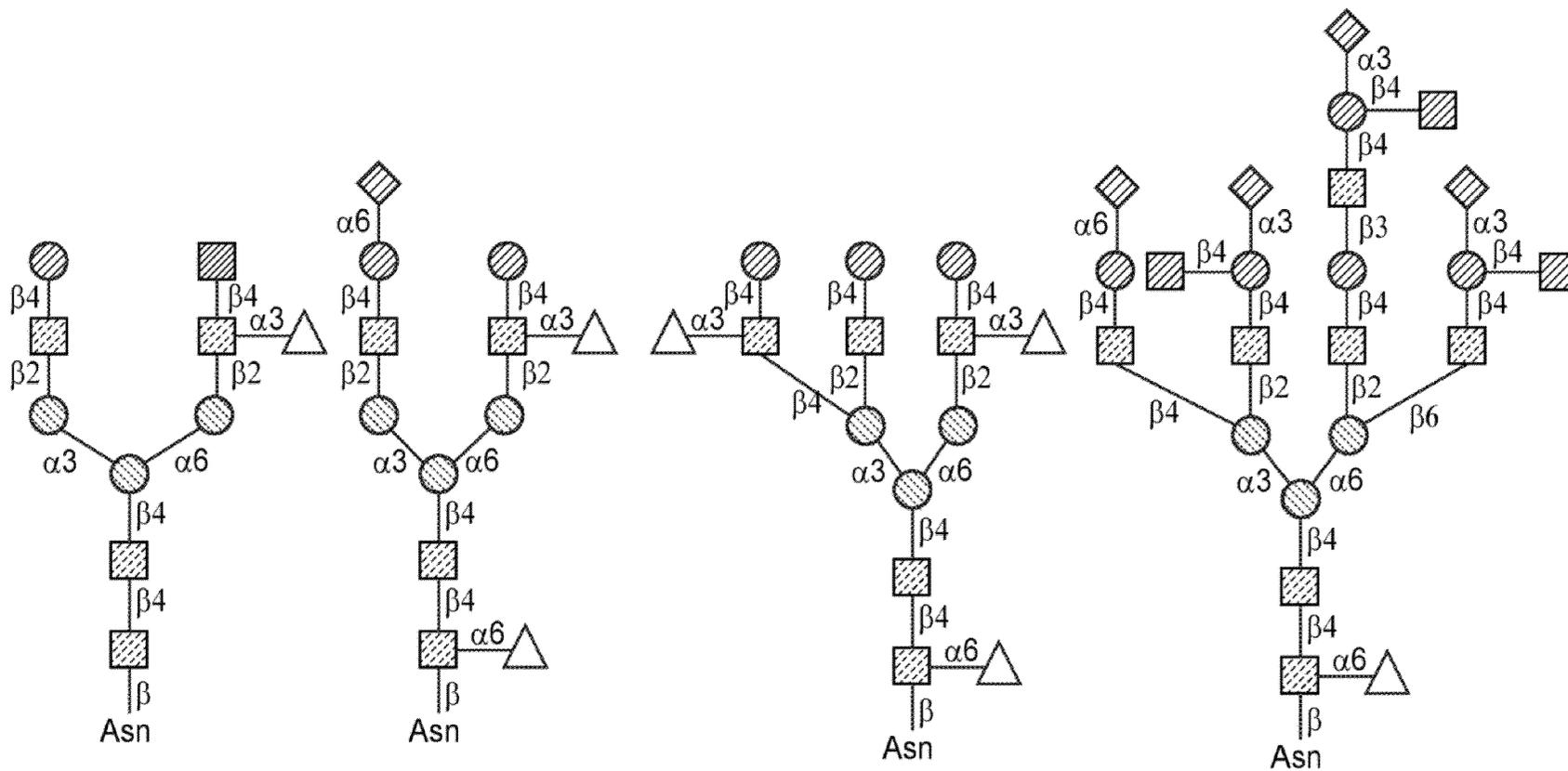
Условные обозначения распространенных моносахаридов и связей

● (штрихованный) Галактоза (Gal)	☆ Ксилоза (Xyl)
■ (штрихованный) <i>N</i> -ацетилгалактозамин (GalNAc)	◆ (штрихованный) <i>N</i> -ацетилнейраминный (Neu5Ac)
▧ (штрихованный) Галактозамин (GalN)	◆ (штрихованный) <i>N</i> -гликолилнейраминная кислота (Neu5Gc)
● (штрихованный) Глюкоза (Glc)	◆ (штрихованный) 2-Кето-3-дезоксиноновая кислота (Kdn)
■ (штрихованный) <i>N</i> -ацетилглюкозамин (GlcNAc)	△ Фукоза (Fuc)
▧ (штрихованный) Глюкозамин (GlcN)	◆ (штрихованный) Глюкуроновая кислота (GlcA)
● (штрихованный) Манноза (Man)	◆ (штрихованный) Идуроновая кислота (IdoA)
■ (штрихованный) <i>N</i> -ацетилманнозамин (ManNAc)	◆ (штрихованный) Галактуроновая кислота (GalA)
▧ (штрихованный) Маннозамин (ManN)	◆ (штрихованный) Маннуроновая кислота (ManA)

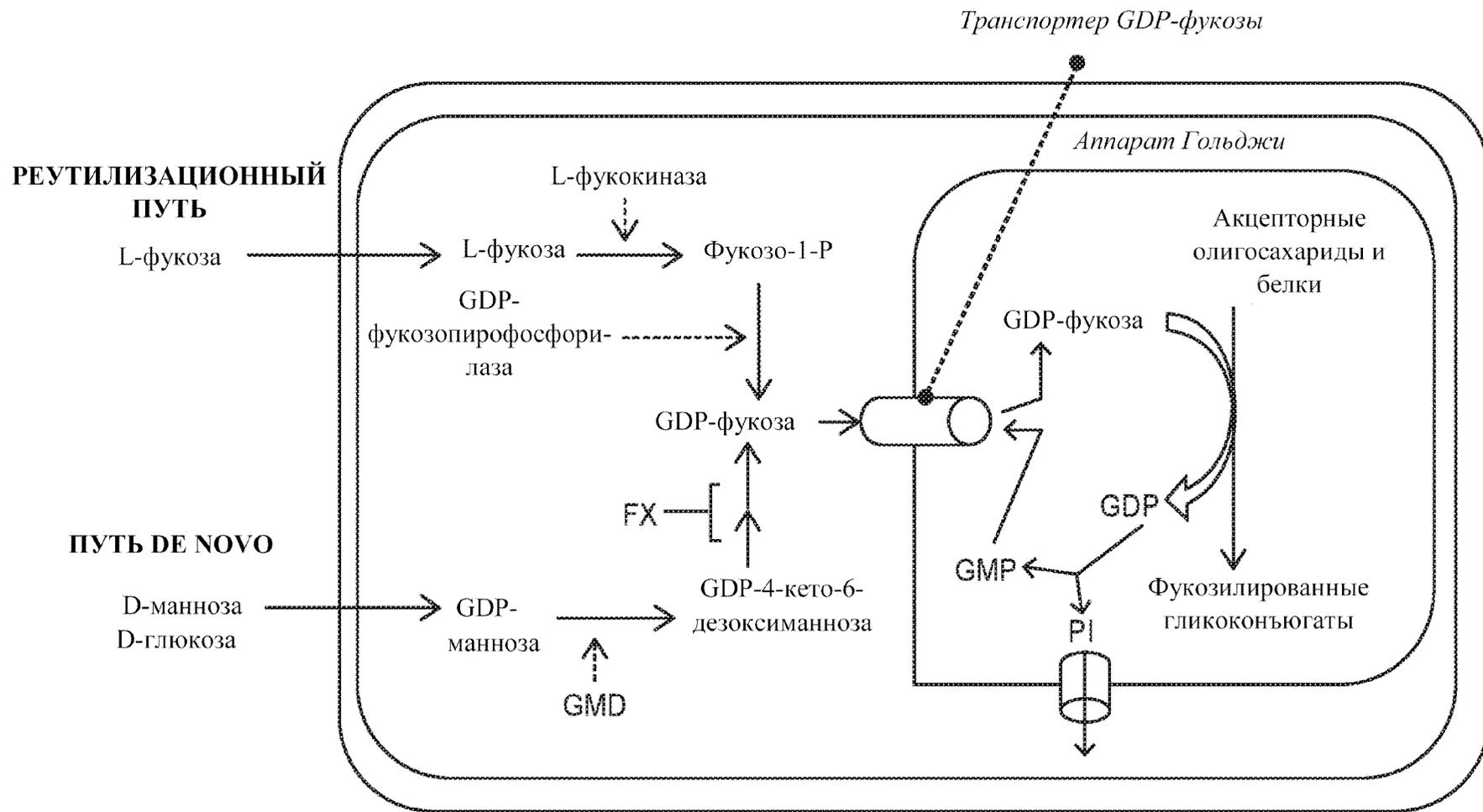
Другие моносахариды

Буквенное пользовательское обозначение внутри символа  для конкретизации, если необходимо

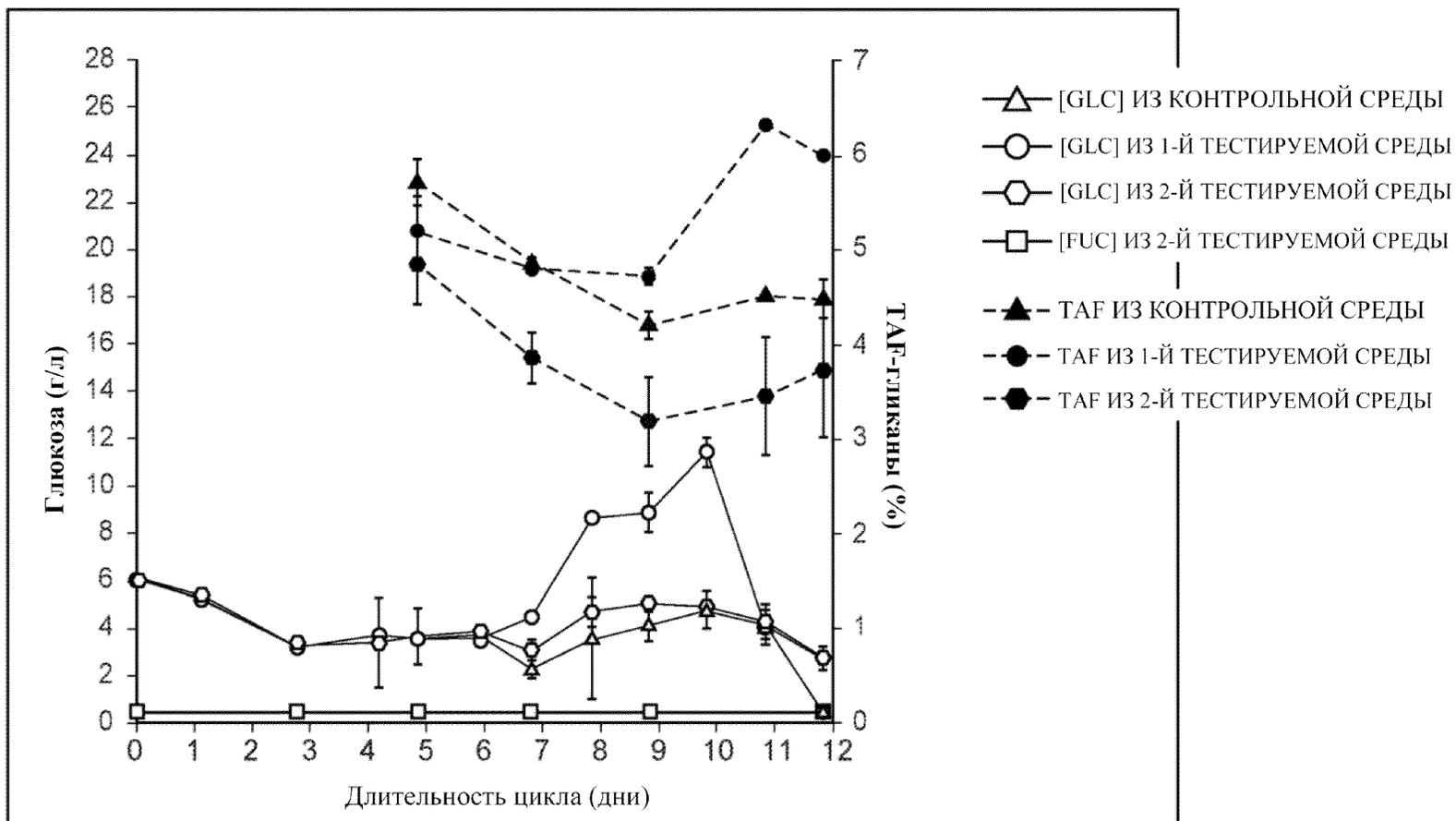
Фиг. 1А



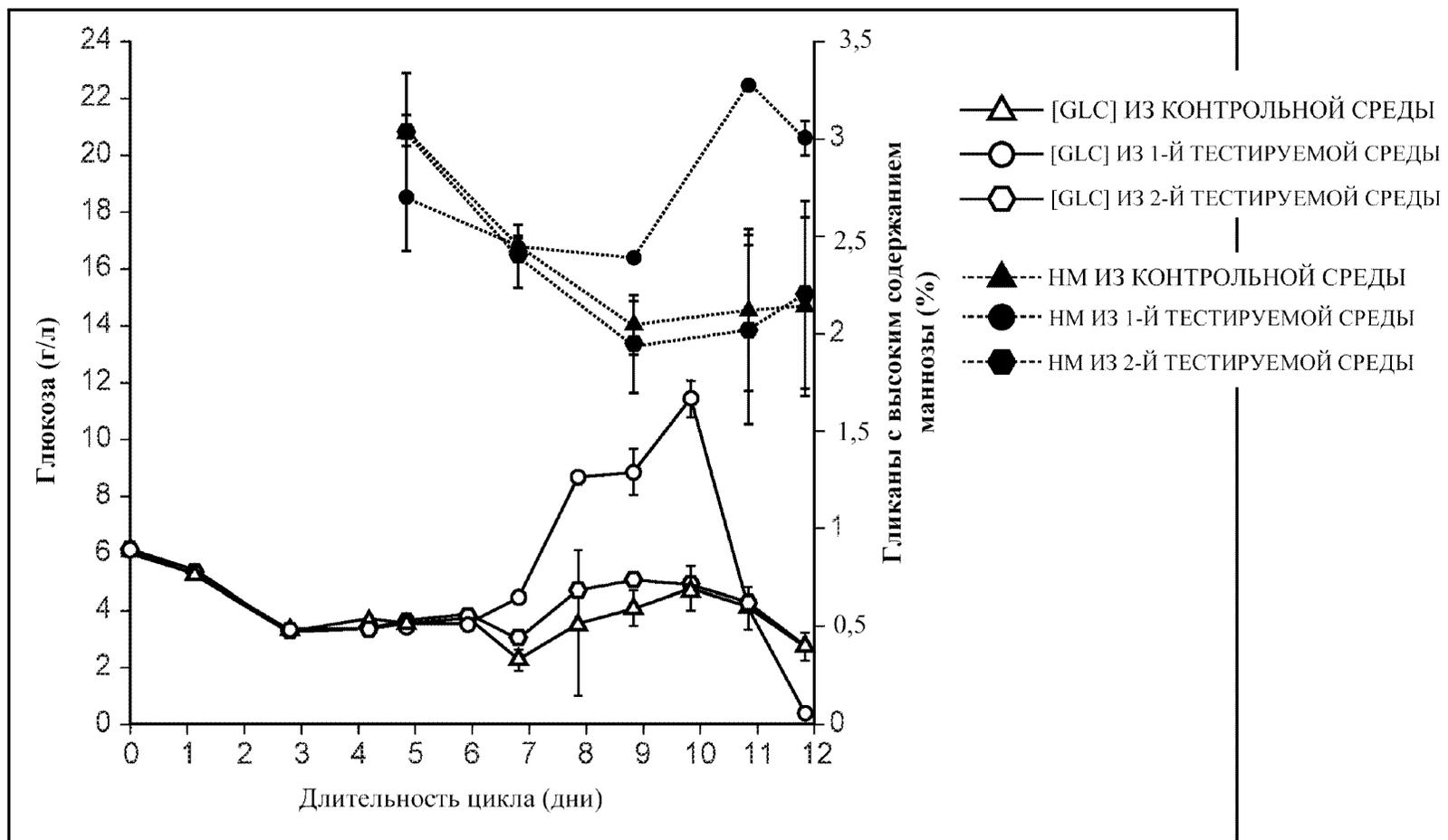
Фиг. 1В



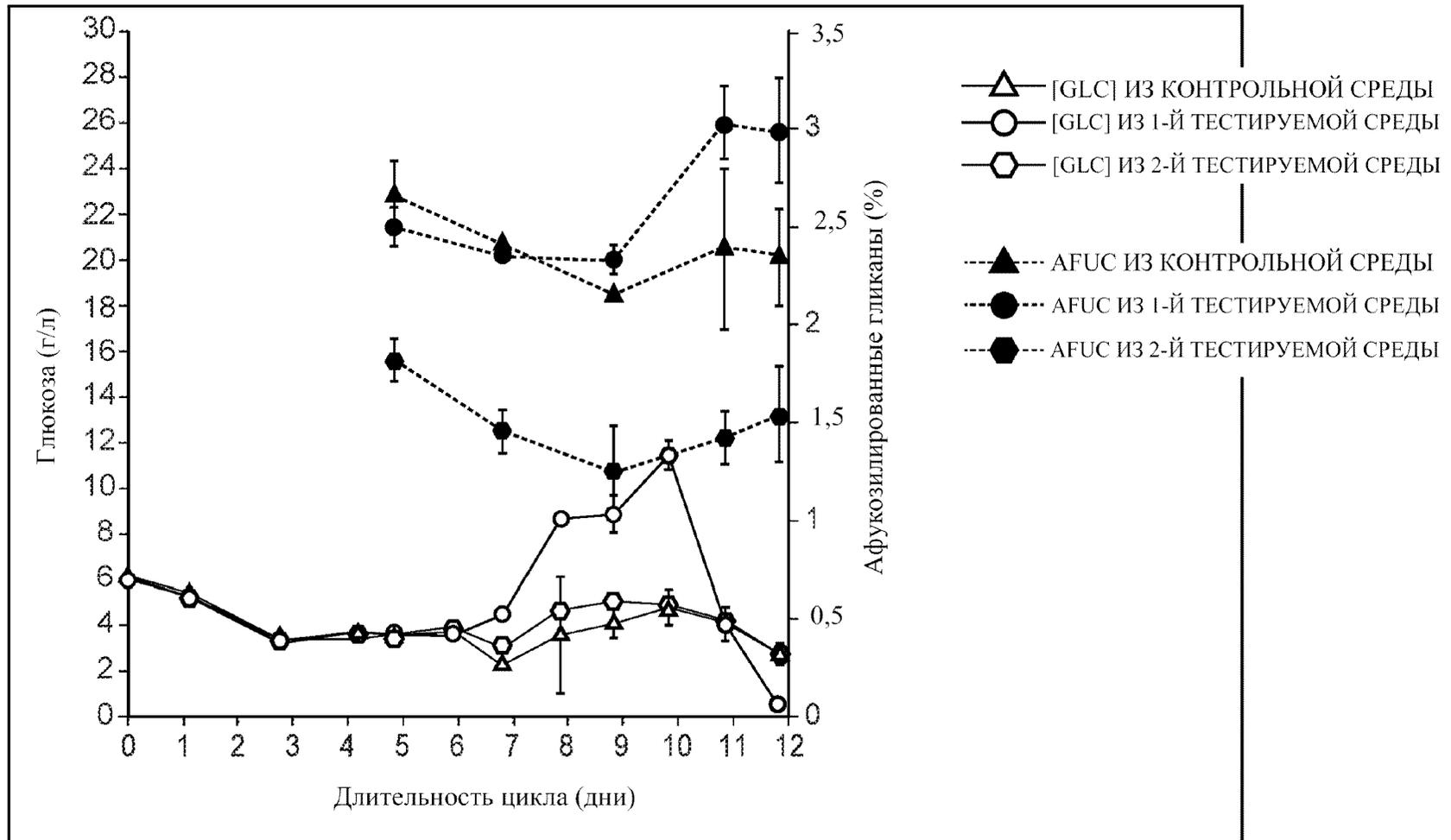
Фиг. 2



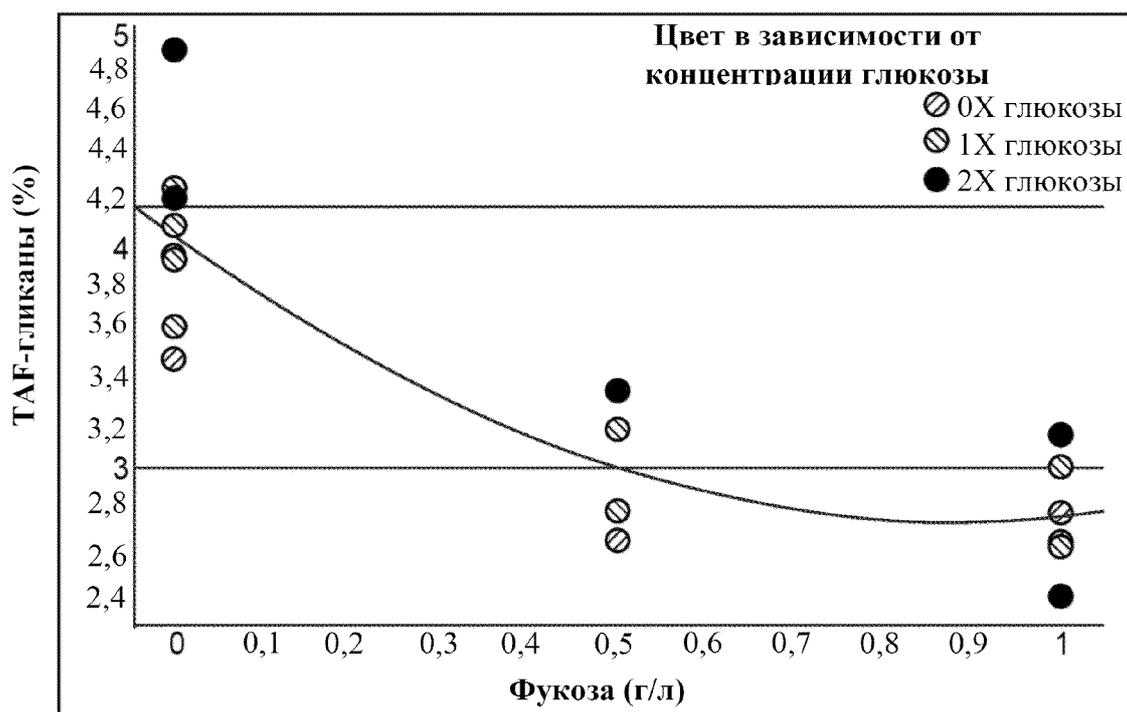
Фиг. 3



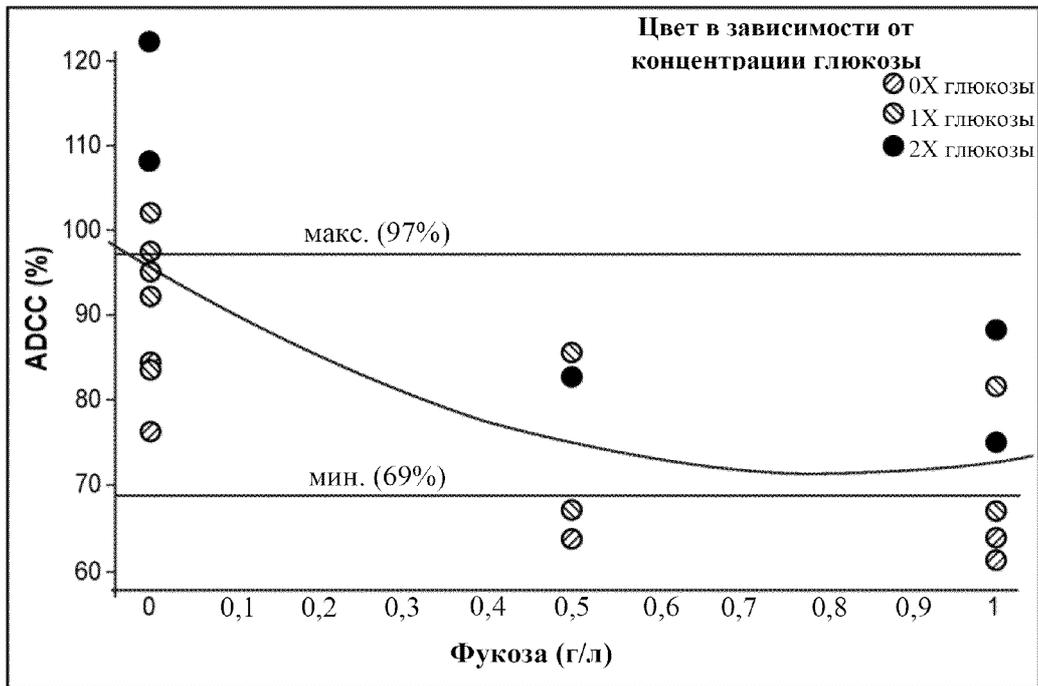
Фиг. 4



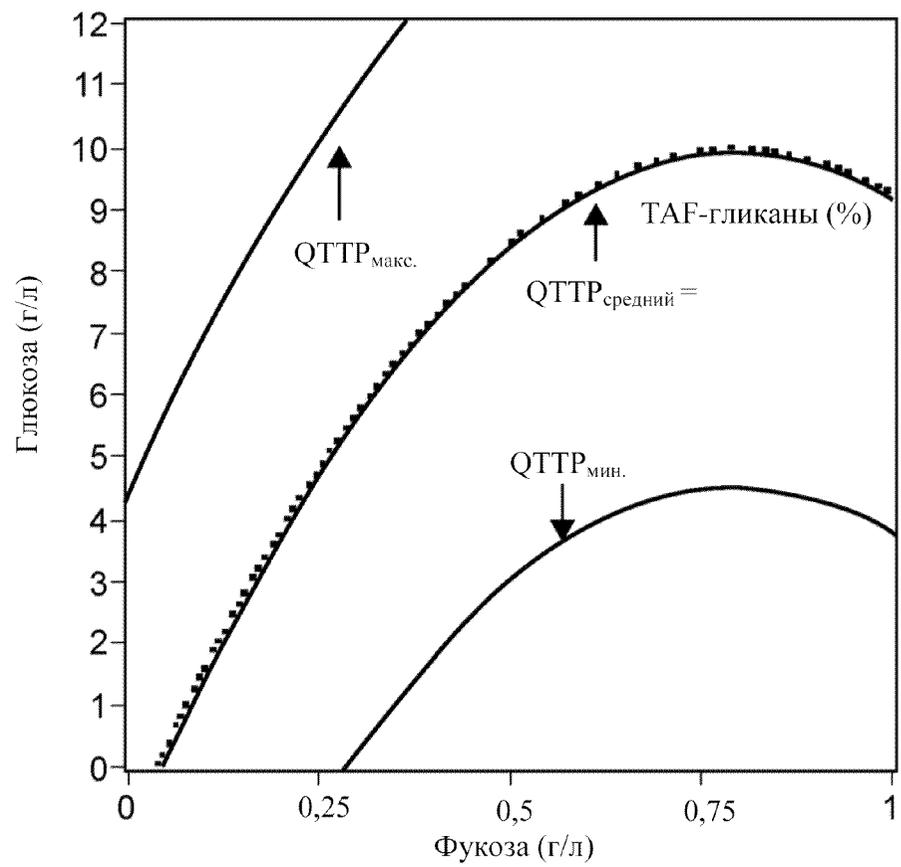
Фиг. 5



Фиг. 6

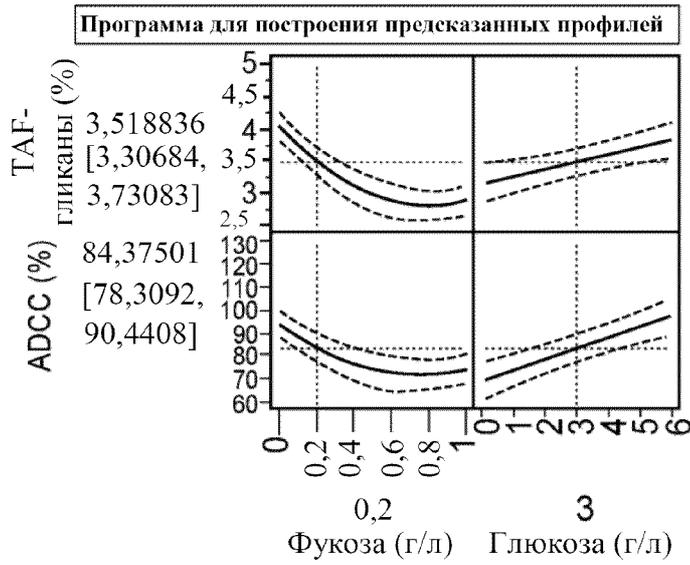


Фиг. 7

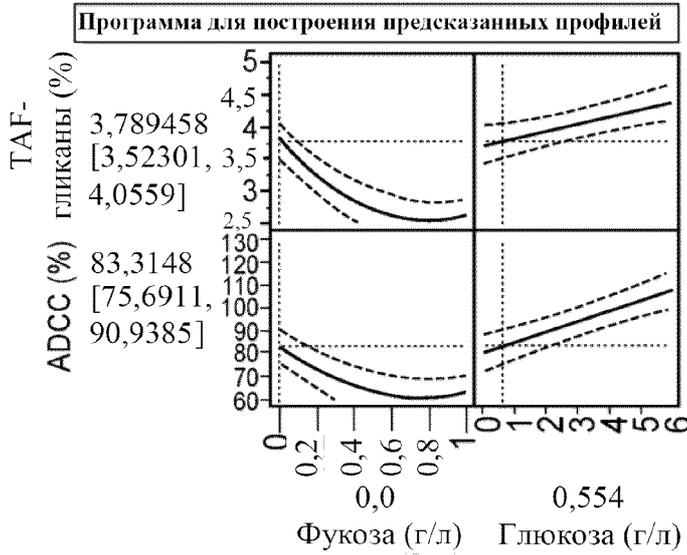


$$ТАФ\text{-гликаны } (\%) = 3,354 - 1,388 * \text{фукоза } (г/л) + 0,111 * \text{глюкоза } (г/л) + [\text{фукоза } (г/л) - 0,4375] * [[\text{фукоза } (г/л) - 0,4375] * 1,9527]$$

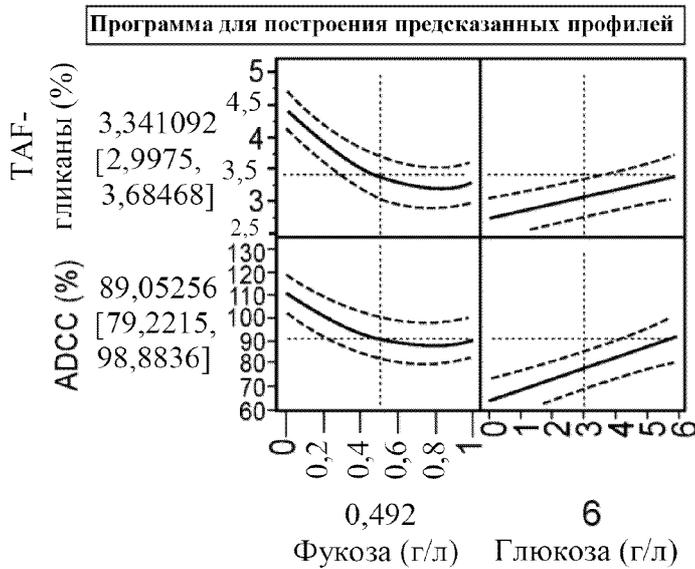
Фиг. 8



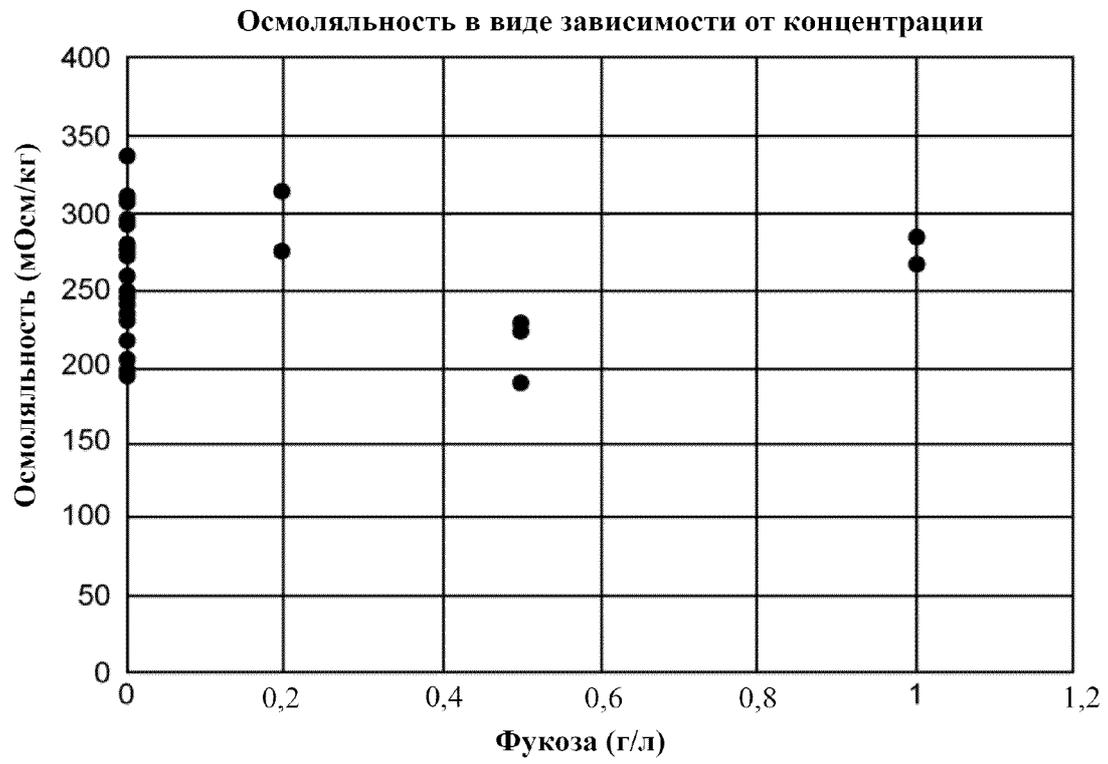
Фиг. 9А



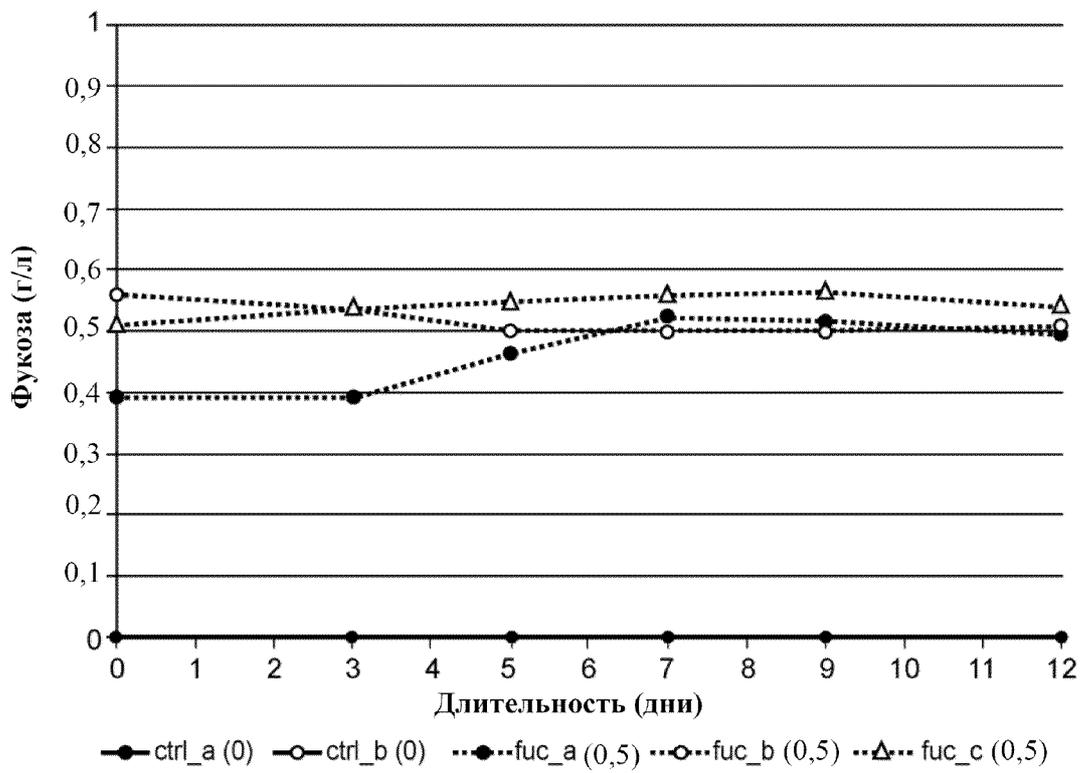
Фиг. 9В



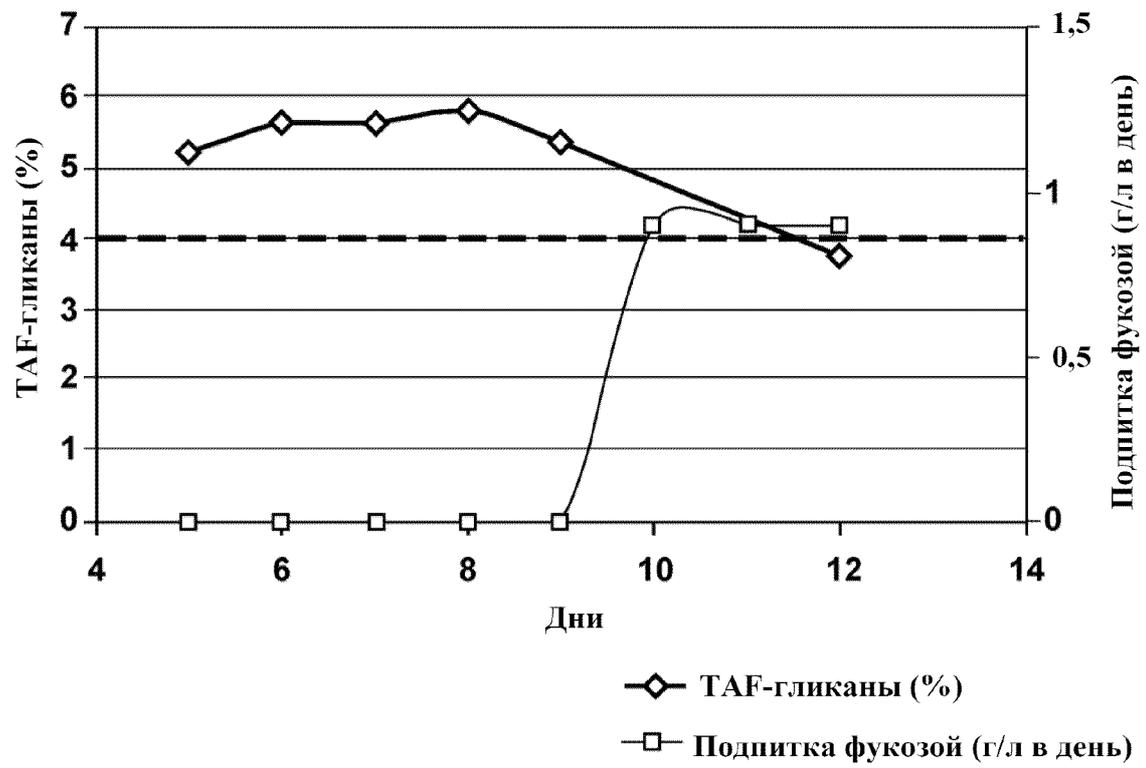
Фиг. 9С



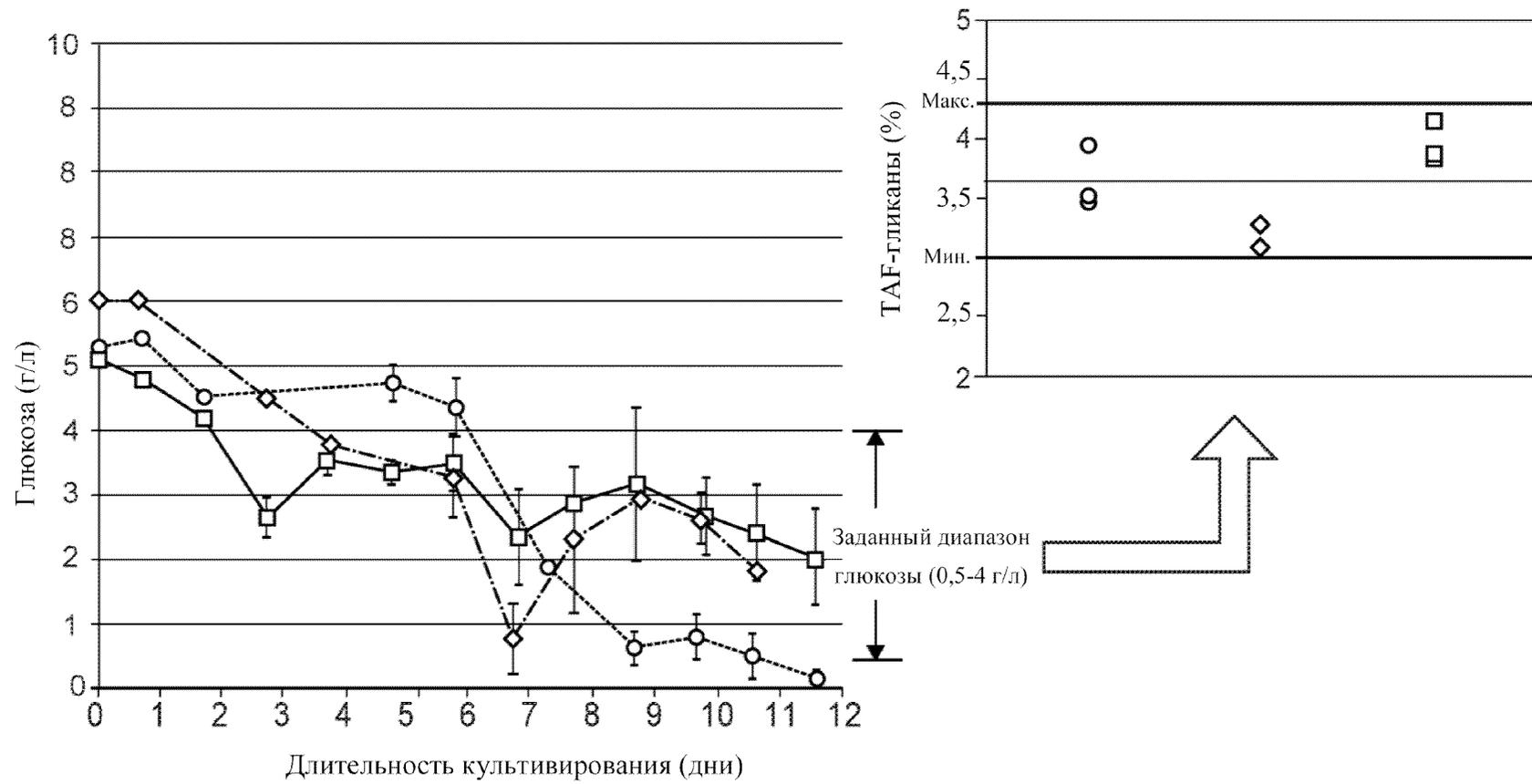
Фиг. 10



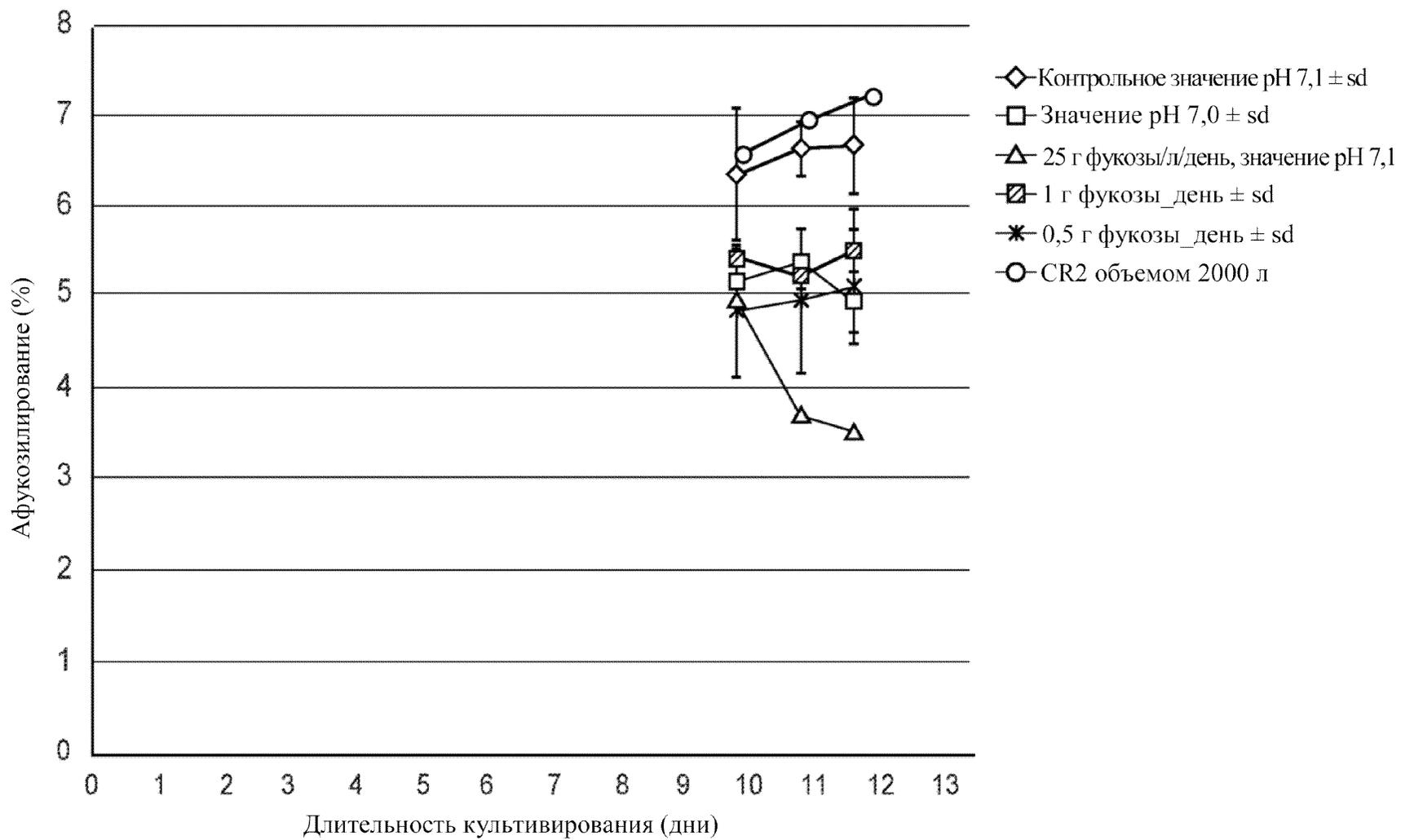
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 01017/52249A/PC	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2019/024154	International filing date (<i>day/month/year</i>) 26 March 2019 (26-03-2019)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 26 March 2018 (26-03-2018)
Applicant AMGEN INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/024154

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 46(completely); 4-16, 27, 28, 31-45, 51-59, 63-76, 97-106(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/024154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12P21/00 C12P21/02 C12N5/00 C07K16/00
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C12P C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/134667 A1 (INSIGHT BIOPHARMACEUTICALS LTD [IL]) 10 August 2017 (2017-08-10) the whole document	1,4-16, 27,28, 31-46, 51-59, 63-76, 97-106
X	WO 2017/120347 A1 (ONCOBIOLOGICS INC [US]) 13 July 2017 (2017-07-13) the whole document	1,4-16, 27,28, 31-46, 51-59, 63-76, 97-106

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 5 June 2019	Date of mailing of the international search report 05/08/2019
------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schneider, Patrick
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/024154

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2017/079165 A1 (GENENTECH INC [US]; F HOFFMANN LA-ROCHE AG [CH]) 11 May 2017 (2017-05-11)</p> <p>the whole document -----</p>	<p>1,4-16, 27,28, 31-46, 51-59, 63-76, 97-106</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/US2019/024154

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017134667	A1	10-08-2017	NONE
WO 2017120347	A1	13-07-2017	AU 2017206006 A1 19-07-2018
			CA 3010598 A1 13-07-2017
			CN 109153716 A 04-01-2019
			EP 3400241 A1 14-11-2018
			JP 2019500876 A 17-01-2019
			US 2019161543 A1 30-05-2019
			WO 2017120347 A1 13-07-2017
WO 2017079165	A1	11-05-2017	AU 2016350732 A1 05-04-2018
			BR 112018007356 A2 23-10-2018
			CA 2999047 A1 11-05-2017
			CN 108431026 A 21-08-2018
			EP 3371206 A1 12-09-2018
			JP 2019505164 A 28-02-2019
			KR 20180068967 A 22-06-2018
			SG 11201802773R A 30-05-2018
			US 2018251572 A1 06-09-2018
			WO 2017079165 A1 11-05-2017

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 46(completely); 4-16, 27, 28, 31-45, 51-59, 63-76, 97-106(partially)

A method to produce an antibody having an afucosylated glycan of less than 10% characterized that fucose is present in the culture medium at a concentration between 0.17g/l to 1.0g/l and the produced antibody and pharmaceutical composition and cell culture medium and methods to modulate fucosylation level.

2. claims: 2, 29, 30, 47, 61, 62(completely); 4-16, 27, 28, 31-45, 51-57, 63-76, 97-106(partially)

A method to produce an antibody having an afucosylated glycan of less than 10% characterized that fucose is present in the culture medium at a concentration between 0.1g/l to 1.0g/l and the cells are not genetically modified to alter activities of the de novo pathway or the salvage pathway and the produced antibody and pharmaceutical composition and cell culture medium and methods to modulate fucosylation level.

3. claims: 3, 17-26, 48-50, 60(completely); 4-16, 27, 28, 31-45, 51-59, 63-76, 97-106(partially)

A method to produce an antibody having an afucosylated glycan of less than 10% characterized that fucose is present in the culture medium at a concentration between 0.1g/l to 1.0g/l and glucose is added such that the average glucose concentration is 10g/l or less and the produced antibody and pharmaceutical composition and cell culture medium and methods to modulate fucosylation level.

4. claims: 77-96, 107, 108

A method to modulate fucosylation of an antibody by decreasing or increasing the pH of the culture medium.
