

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037565

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.14

(51) Int. Cl. C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(21) Номер заявки
201691532

(22) Дата подачи заявки
2014.12.11

(54) СПОСОБ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ВЫСОКОМАННОЗНЫХ ГЛИКОФОРМ
РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

(31) 61/933,137

(56) WO-A1-2011134643

(32) 2014.01.29

WO-A2-2008154014

(33) US

GOETZE A. M. ET AL.: "High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans", GLYCOBIOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, US, vol. 21, no. 7, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 949-959, XP002736310, ISSN: 0959-6658, DOI:10.1093/GLYCOB/CWR027 [retrieved on 2011-03-18] the whole document

(43) 2017.01.30

HEMMORANTA ET AL.: "N-glycan structures and associated gene expression reflect the characteristic N-glycosylation pattern of human hematopoietic stem and progenitor cells", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, ELSEVIER INC, US, vol. 35, no. 8, 26 July 2007 (2007-07-26), pages 1279-1292, XP022171076, ISSN: 0301-472X, DOI:10.1016/J.EXPHEM.2007.05.006 abstract

(86) PCT/US2014/069744

TOMIYA NOBORU ET AL.: "Complex-type biantennary N-glycans of recombinant human transferrin from *Trichoplusia ni* insect cells expressing mammalian beta-1,4-galactosyltransferase and beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II", GLYCOBIOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, US, vol. 13, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 23-34, XP002320028, ISSN: 0959-6658, DOI:10.1093/GLYCOB/CWG012 abstract page 23, right-hand column, last paragraph

(87) WO 2015/116315 2015.08.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Гупта Шивани, Канг Сохие (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

B1

(57) Предложен способ снижения содержания высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка, получаемых путем культивирования клеток млекопитающих.

037565

037565 B1

Область изобретения

Изобретение относится в целом к способам модулирования одного или более свойств рекомбинантных белков, производимых клеточной культурой, включая культуру клеток млекопитающих, такую как клеточная культура СНО.

Перекрестная ссылка на связанные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США №. 61/933192, поданной 29 января 2014 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Гликозилирование представляет собой обычную посттрансляционную модификацию в клетках млекопитающих; как нормальные человеческие иммуноглобулины, так и терапевтические моноклональные антитела (мкАТ), продуцируемые в клетках яичников китайского хомяка (СНО), являются гликопротеинами. Как фармакокинетические свойства, так и эффекторные функции терапевтических мкАТ могут зависеть от гликозилирования. Концевые сахара такие как фукоза и галактоза могут повлиять на антителозависимую клеточно-обусловленную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC; Wright, A. and S.L. Morrison, Trends Biotechnol (1997) 15:26-32). Высокоманнозные гликаны могут увеличивать клиренс сыворотки крови определенных мкАТ, таким образом, потенциально влияют на эффективность (Goetze, et al., (2011) Glycobiology 21:949-59). Кроме того, высокоманнозные гликоформы могут повысить аффинность антитела к Fc-рецептору гамма-III, тем самым увеличивая активность АЗКЦ (Антителозависимую клеточную цитотоксичность) некоторых антител (Yu, et al. (2012) MAbs 4:475-87). Таким образом, для каждого рекомбинантного мкАТ необходимо поддерживать определенный профиль гликозилирования, который наилучшим образом обеспечивает терапевтический потенциал мкАТ.

Способы управления содержанием высокоманнозной гликоформы белка в культуре клеток включают изменения в составах питательных сред, осмоляльности, pH, температуры и т. д. (Yu, et al., *supra*, Pacis et al., *supra*, Chee Fung Wong et al. (2005) Biotechnol Bioeng 89:164-177; Ahn, et al. (2008) Biotechnol Bioeng 101:1234-44). Эффективность этих способов для конкретных клеточных линий, типов молекул и сред, как правило, получали методом проб и ошибок. Кроме того, эти способы, как правило, также изменяют продуктивность антитела, характеристики клеточных культур и другие свойства антитела.

По-прежнему существует необходимость определения механизма, который может регулировать содержание высокоманнозных гликоформ (в частности, маннозы 5) в мкАТ без ущерба для показателей производственной культуры СНО и выхода антител. Такой способ принесет пользу процессу разработки терапевтических белков. Настоящее изобретение обеспечивает способ, который регулирует содержание высокоманнозной гликоформы, управляя уровнями экспрессии белков, вовлеченных в путь N-гликозилирования.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение касается способа снижения содержания высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка, получаемых путем культивирования клеток млекопитающих, включающий модификацию клетки-хозяина млекопитающего для сверхэкспрессии по меньшей мере одного белка, вовлеченного в путь N-гликозилирования, посредством трансфекции в указанную клетку гена Mga1, кодирующего N-ацетил-глюкозаминилтрансферазу-1; гена Mga2, кодирующего N-ацетил-глюкозаминилтрансферазу-2; гена Slc35a2, кодирующего переносчик УДФ-галактозы; или их комбинации, и культивирование клетки-хозяина млекопитающего, причем клетка-хозяин млекопитающего экспрессирует рекомбинантный белок, у которого содержание высокоманнозных гликоформ снижено до 10% или ниже по сравнению с рекомбинантным белком, полученным из клетки-хозяина млекопитающего до указанной трансфекции.

Вариантом настоящего изобретения является способ, где клетка-хозяин млекопитающего трансфицирована двумя или более генами, выбранными из Mga1 и Mga2; Mga1 и Slc35a2; Mga2 и Slc35a2; и Mga1, Mga2 и Slc35a2.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где клетка-хозяин млекопитающего трансфицирована генами Mga1 и Mga2.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где клетка-хозяин млекопитающего сначала была трансфицирована геном рекомбинантного белка и затем трансфицирована геном белка, вовлеченного в путь N-гликозилирования.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где клетка-хозяин млекопитающего сначала была трансфицирована геном белка, вовлеченного в путь N-гликозилирования, и затем трансфицирована геном рекомбинантного белка.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где рекомбинантный белок представляет собой белок, содержащий Fc-область антитела.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где рекомбинантный белок выбран из Fc-гибридного белка, антитела, иммуноглобулина и пептид-ассоциированного антитела.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где виды высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка выбраны из маннозы 5 (Man5); маннозы 6 (Man6); маннозы 7 (Man7); ман-

нозы 8, в том числе маннозы 8а и 8b (Man8a и 8b), и маннозы 9 (Man9) и их комбинации.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где содержание высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка составляет не более 5%.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где культура клеток млекопитающих представляет собой периодическую культуру с подпиткой или перфузионную культуру.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где культуру клеток поддерживают перфузией с использованием переменного тангенциального потока (ATF).

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где перфузию начинают примерно на 1-9 сутки культивирования клеток.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где перфузию начинают примерно на 3-7 сутки культивирования клеток.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где перфузию начинают, когда клетки достигают фазы продуцирования.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где перфузию с использованием переменного тангенциального потока проводят посредством ультрафильтра или микрофильтра.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где культуру клеток поддерживают периодической подпиткой.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где культуру клеток подпитывают три раза в процессе культивирования.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где культуру клеток подпитывают между 2 и 4 сутками, между 5 и 7 сутками и между 8 и 10 сутками.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где культуру клеток подпитывают четыре раза в процессе культивирования.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где культуру клеток подпитывают между 2 и 4 сутками, между 5 и 6 сутками, между 7 и 8 сутками и между 8 и 10 сутками или позже.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где культуру клеток млекопитающих получают путем инокуляции в биореактор по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ клеток/мл в бессырьевой роточной культуральной среде.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где клетки млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомяка (CHO).

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где дополнительно включает сбор рекомбинантного белка.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где дополнительно включает стадию очистки собранного рекомбинантного белка.

Настоящее изобретение обеспечивает способ регулирования содержания высокоманнозной гликоформы рекомбинантного белка во время культивирования клеток млекопитающих, включающий трансформирование клетки-хозяина для усиленной экспрессии белка, который вовлечен в путь N-гликозилирования. Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способ снижения содержания высокоманнозной гликоформы рекомбинантного белка в процессе культивирования клеток млекопитающих. В одном варианте реализации изобретения белок представляет собой N-ацетилглюкозаминилтрансферазу-1 (кодируется Mga1); в другом варианте реализации белок представляет собой N-ацетилглюкозаминилтрансферазу-2 (кодируется Mga2). В дополнительном варианте изобретения белок представляет собой переносчик УДФ-галактозы (кодируется Slc35a2).

Дополнительные варианты реализации изобретения включают трансформацию клетки-хозяина и сверхэкспрессию двух или более белков, участвующих в пути N-гликозилирования, включая комбинации вышеупомянутых белков. В одном варианте реализации клетка-хозяин трансформируется с использованием Mga1 и Mga2; в других вариантах реализации клетка-хозяин трансформируется с использованием Mga1 и Slc35a2, с использованием Mga2 и Slc35a2, или с использованием Mga1, Mga2 и Slc35a2.

Настоящее изобретение также обеспечивает трансфекцию клеточной линии хозяина, которая была предварительно трансфицирована для экспрессии рекомбинантного белка. В одном варианте реализации рекомбинантный белок представляет собой белок, содержащий Fc-область антитела. Дополнительный вариант реализации включает клетки-хозяина, которые экспрессируют рекомбинантный белок, выбранный из группы, состоящей из Fc-гибридных белков, антител, иммуноглобулинов и пептидных антител.

В дополнительном варианте реализации клетка-хозяин представляет собой первоначально трансформированную для сверхэкспрессии одного или более из Mga1, Mga2 и Slc35a2, а затем трансфицированных для экспрессии рекомбинантного белка. В одном варианте реализации рекомбинантный белок представляет собой белок, содержащий Fc-область антитела. Дополнительный вариант реализации включает экспрессию рекомбинантного белка, выбранного из группы, состоящей из Fc-гибридных белков, антител, иммуноглобулинов и пептидных антител.

По выбору, настоящее изобретение дополнительно включает этап сбора рекомбинантного белка, продуцируемого культурой клеток. В дополнительном варианте реализации рекомбинантный белок, продуцируемый культурой клеток, очищают и готовят приемлемую лекарственную форму.

В дополнительном варианте реализации содержание высокоманнозной гликоформы рекомбинантного белка снижается по сравнению с продуцируемой культурой, где клетки не подвергают трансфекции для сверхэкспрессии белка, участвующего в N-связанном гликозилировании. В одном варианте реализации соединения высокоманнозного гликана представляют собой маннозу 5 (Man5). В другом варианте реализации соединения высокоманнозного гликана представляют собой маннозу 6 (Man6), маннозу 7 (Man7), маннозу 8 (включая маннозу 8а и 8b; Man8a и 8b) или маннозу 9 (Man9). В дополнительном варианте реализации соединения высокоманнозного гликана состоят из смеси Man5, Man6, Man7, Man8a, Man8b, и/или Man9.

Настоящее изобретение обеспечивает дополнительный вариант реализации в котором содержание высокоманнозной гликоформы рекомбинантного белка снижается. В дополнительном варианте реализации содержание высокоманнозной гликоформы рекомбинантного белка составляет менее чем или равно 5%. В другом варианте реализации содержание высокоманнозной гликоформы рекомбинантного белка составляет менее чем или равно 10%. В дополнительном варианте реализации содержание высокоманнозной гликоформы рекомбинантного белка, продуцируемого культурой клеток по настоящему изобретению, составляет менее чем 6, 7, 8, 9 или 10 процентов. В еще одном варианте реализации содержание высокоманнозной гликоформы рекомбинантного белка, продуцируемого культурой клеток по настоящему изобретению, составляет 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5%. Дополнительные варианты реализации включают содержание высокоманнозной гликоформы менее чем 12%, менее чем 15%, менее чем 20% или менее чем 30%, 40% или 50%.

Дополнительные варианты реализации включают использование полунепрерывной или периодической культуры с подпиткой и использование перфузионной культуры. В одном варианте реализации культуру перфузируют с использованием переменного тангенциального потока (ATF).

В сочетании с любым из вариантов реализации настоящего изобретения, описанных в данном документе, по мере необходимости, в культуральный сосуд могут также добавлять пеногаситель. Альтернативно или дополнительно, для поддержания pH на установленном значении используют 1M углекислого натрия или другое подходящее основание.

Как описано в данном документе в одном аспекте настоящего изобретения клеточная культура может поддерживаться перфузией. В одном варианте реализации перфузия в клеточной культуре начинается ориентировочно на 1-9 сутки клеточной культуры. В варианте реализации перфузия в клеточной культуре начинается ориентировочно на 3-7 сутки клеточной культуры. В одном варианте реализации перфузия начинается, когда клетки достигают фазы продуцирования. В дополнительных вариантах реализации настоящего изобретения перфузия достигается переменным тангенциальным потоком. В близком варианте реализации перфузия достигается переменным тангенциальным потоком с использованием ультрафильтра или микроФильтра.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения обеспечивает непрерывную перфузию; в еще дополнительном варианте реализации скорость перфузии постоянна. Один вариант реализации настоящего изобретения обеспечивает проведение перфузии со скоростью менее чем или равной 1,0 рабочему объему в сутки. В близком варианте реализации перфузия в культуре клеток проводится со скоростью, которая повышается в течение фазы продуцирования от 0,25 рабочего объема в сутки до 1,0 рабочего объема в сутки в период культивирования. В другом близком варианте реализации перфузия в культуре клеток проводится со скоростью, которая достигает 1,0 рабочий объем в сутки с 9 суток по 11 сутки клеточной культуры. В другом близком варианте реализации перфузия культуре клеток проводится со скоростью, которая достигает 1,0 рабочий объем в сутки на 10-е сутки клеточной культуры.

В одном варианте реализации клеточная культура получает болосную подпитку питательной средой для выращивания культуры клеток до 3-7 суток культивирования.

В еще одном аспекте настоящего изобретения культура клеток поддерживается периодической подпиткой. В одном варианте реализации при периодическом культивировании с подпиткой культуру подпитывают три раза в процессе производства. В дополнительном варианте реализации культуру подпитывают в сутки между вторыми и четвертыми сутками, в сутки между 5 и 7 сутками, и в сутки между 8 и 10 сутками. Другой вариант реализации обеспечивает способ периодической подпитки, при котором культура подпитывается четыре раза в течение производства. В еще дополнительном варианте реализации культуры подпитывают в сутки между вторыми и четвертыми сутками, в сутки между 5 и 6 сутками, в сутки между 7 и 8 сутками, в сутки между 8 и 10 сутками или позже.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, культуру клеток млекопитающих получают внесением их в биореактор с использованием по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ клеток/мл в бессыроточной культуральной среде. В альтернативном или дополнительном варианте реализации культуру клеток млекопитающих получают внесением их в биореактор с использованием по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ до $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в бессыроточной культуральной среде.

Настоящее изобретение может дополнительно включать сдвиг температуры в культуре. В одном варианте реализации сдвиг температуры составляет от 36 до 31°C. В одном варианте реализации настоящее изобретение дополнительно включает сдвиг температуры с 36 до 33°C. В близком варианте реализа-

ции сдвиг температуры происходит при переходе между фазой роста и фазой продуцирования. В близком варианте реализации сдвиг температуры происходит в течение фазы продуцирования.

В другом варианте реализации настоящее изобретение дополнительно включает индукцию задержки клеточного роста L-аспарагиновым голоданием с последующей перфузией бессывороточной перфузионной средой, содержащей L-аспарагин в концентрации 5 ммоль/л или менее. В другом варианте реализации настоящего изобретения дополнительно включает индукцию задержки клеточного роста путем перфузии бессывороточной перфузионной средой, содержащей L-аспарагин в концентрации 5 ммоль/л или менее. В близком варианте реализации концентрация L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет менее чем или равно 5 ммоль/л. В близком варианте реализации концентрация L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет менее чем или равно 4,0 ммоль/л. В близком варианте реализации концентрация L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет менее чем или равно 3,0 ммоль/л. В близком варианте реализации концентрация L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет менее чем или равно 2,0 ммоль/л. В близком варианте реализации концентрация L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет менее чем или равно 1,0 ммоль/л. В близком варианте реализации концентрация L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде равно 0 ммоль/л. В близком варианте реализации концентрация L-аспарагина в питательной среде для культивирования клеток отслеживается до и во время L-аспарагинового голодания.

В еще одном варианте реализации настоящее изобретение включает, что объем осажденных клеток в течение фазы продуцирования составляет менее чем или равно 35%. В близком варианте реализации объем осажденных клеток составляет менее чем или равно 35%. В близком варианте реализации объем осажденных клеток составляет менее чем или равно 30%.

В близком варианте реализации плотность жизнеспособных клеток в культуре клеток млекопитающих с объемом осажденных клеток менее чем или равным 35% составляет от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В другом варианте реализации плотность жизнеспособных клеток в культуре клеток млекопитающих составляет от 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

В еще одном варианте реализации биореактор имеет объем по меньшей мере 500 л. В еще одном варианте реализации биореактор имеет объем по меньшей мере от 500 до 2000 л. В еще одном варианте реализации биореактор имеет объем по меньшей мере от 1000 до 2000 л.

В еще одном варианте реализации клетки млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомяка (CHO). В еще одном варианте реализации рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного гибридного белка или цитокина.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 демонстрирует на примере 2 клональную изменчивость времени удвоения в течение пассирования клеточных линий, использованных в первой серии периодического культивирования с подпиткой. В этом примере клетки из клеточной линии, экспрессирующие мкАТ В, были трансформированы для сверэкспрессии Mgat1, Mgat2 и/или Slc35A2. M1M2 обозначает клеточные линии, сверэкспрессирующие Mgat1 и Mgat2 (индивидуальные клоны представлены черными кружками); M1M2S обозначает клеточные линии, сверэкспрессирующие Mgat1, Mgat2 и Slc35a2 (индивидуальные клоны представлены незаштрихованными треугольниками); и S обозначает клеточные линии, сверэкспрессирующие Slc35A2 (индивидуальные клоны представлены черными квадратами). Контрольные клетки (индивидуальные клоны представлены незаштрихованными квадратами) были трансформированы с использованием пустого вектора. Центральный бокс тянется от первого квартиля (Q1) до третьего квартиля (Q3) и высота бокса представляет собой интерквартильную широту (IQR), диапазон внутри бокса представляет собой медиану, верхний ус тянется от Q3 до максимального значения, опускаясь ниже Q3+1,5IQR, или максимального значения, если значение не превышает Q3+1,5IQR. Нижний ус тянется от Q1 до наименьшего значения снижения выше Q1-1,5IQR или до минимального значения, если оно не меньше, чем Q1-1,5IQR.

На фиг. 2 продемонстрирована на примере 2 клональная изменчивость времени удвоения в течение пассирования клеточных линий, использованных для второй серии периодического культивирования с подпиткой. В этом примере клетки из клеточной линии, экспрессирующие мкАТ В, были трансформированы для сверэкспрессии Mgat1, Mgat2 и/или Slc35A2. M1M2 обозначает клеточные линии, сверэкспрессирующие Mgat1 и Mgat2; M1M2S обозначает клеточные линии, сверэкспрессирующие Mgat1, Mgat2 и Slc35a2; и S обозначает клеточные линии, сверэкспрессирующие Slc35A2. Контрольные клетки были трансформированы с использованием пустого вектора. Индивидуальные клоны обозначены как описано для фиг. 1; параметры для каждого бокса такие же, как описано для фиг. 1.

На фиг. 3 представлены показатели роста с точки зрения плотности жизнеспособных клеток сопоставимой для всех сверэкспрессирующих клеточных линий (M1M2, M1M2S и S) по сравнению с контролем на 10 сутки второго эксперимента с периодической подпиткой, описанного в примере 2. Отдельные значения в каждом боксе еще раз иллюстрируют наблюдаемую клональную изменчивость. Индивиду-

альные клоны обозначены как описано для фиг. 1; параметры для каждого бокса такие же, как описано для фиг. 1.

На фиг. 4 представлено сравнение клональной изменчивости в титре антител, продуцируемых во время второго эксперимента с периодической подпиткой, описанного в примере 2. Индивидуальные клоны обозначены как описано для фиг. 1; параметры для каждого бокса такие же, как описано для фиг. 1.

Фиг. 5 демонстрирует клоновую изменчивость удельной производительности антитела, продуцируемые во время второго эксперимента с периодической подпиткой, описанного в примере 2. Индивидуальные клоны обозначены как описано для фиг. 1; параметры для каждого бокса такие же, как описано для фиг. 1.

На фиг. 6 дано представление о клональной изменчивости в процентах НМ (high-mannose - высокоманнозных гликоформ) для антитела, продуцируемого в течение второго эксперимента с периодической подпиткой, описанного в примере 2. Индивидуальные клоны обозначены как описано для фиг. 1; параметры для каждого бокса такие же, как описано для фиг. 1.

Подробное описание сущности изобретения

Несмотря на то, что терминология, используемая в данной заявке, является стандартом в данной области техники, определения некоторых терминов представлены в настоящем документе для обеспечения ясности и определенности в понимании формулы изобретения. Единицы, приставки и символы могут быть обозначены в их принятой СИ (Международная система единиц) форме. Числовые диапазоны, указанные в данном документе, рассчитаны с учетом чисел, определяющих диапазон, и включают и использует всякое целое число в пределах заданного диапазона. Способы и методики, описанные в данном документе, как правило, выполняются в соответствии с общепринятыми способами хорошо известными в данной области техники и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем документе, если не указано иное. См., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow и Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Описанные методы применимы к монослойной культуре или к суспензионным культурам, выращиваемых в биореакторах с мешалкой (включая традиционные культуры клеток: полу непрерывную и периодическую с подпиткой, которые могут, но не обязательно, включать центробежный фильтр), перфузионной системой (включая культуры с переменным тангенциальным потоком ("ATF"), акустические перфузионные системы, перфузионные системы с фильтрующим элементом глубинного типа, и других систем), половолоконных биореакторах (МБР, которые в некоторых случаях могут быть использованы в перфузионных процессах), а также различные другие методы культуры клеток (см., например, Tao et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 82:751-65; Kuystermans & Al-Rubeai, (2011) "Bioreactor Systems for Producing Antibody from Mammalian Cells" in Antibody Expression and Production, Cell Engineering 7:25-52, Al-Rubeai (ed) Springer; Catapano et al., (2009) "Bioreactor Design and Scale-Up" in Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice, Eibl et al. (eds) Springer-Verlag, включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте).

Все документы или части документов, процитированные в настоящей заявке, включая, без ограничений, патенты, заявки на патенты, статьи, книги и трактаты, тем самым явным образом включены посредством ссылки. То, что описано в варианте реализации настоящего изобретения может быть объединено с другими вариантами реализации настоящего изобретения.

Термины

В контексте данного документа термины в единственном числе означают также и множественное число, если не указано иное. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе включают формы в множественном числе и термины в множественном числе включают формы в единственном числе. Как правило, номенклатура, используемая в связи с, и методики, культуры клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, и химии белка и нуклеиновых кислот, и гибридизации, описанные в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники.

Настоящее изобретение обеспечивает способы модуляции свойств культур клеток, экспрессирующих "необходимые белки", "необходимые белки" включают натуральные белки, рекомбинантные белки и сконструированные белки (например, белки, которые не встречаются в природе и которые были разработаны и/или созданы человеком). Необходимый белок может, но не обязательно должен быть, белком, который является заведомо или предположительно терапевтически релевантным. Конкретные примеры необходимого белка включают антигенсвязывающие белки (как описано и определено в настоящем документе), пептидные антитела (то есть, молекула, содержащая пептид(ы), слитый непосредственно или опосредованно с другими молекулами, такими как Fc-домен антитела, где пептидный фрагмент специфически связывается с желаемой целью; пептид(ы) могут быть слиты либо с Fc-областью или встроены в Fc-петлю или с Fc-модифицированной молекулой, например, как описано в заявке на патент США Публикация № US2006/0140934 включенной в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме),

гибридные белки (например, Fc-гибридные белки в которых Fc-фрагмент слит с белком или пептидом, в том числе пептидным антителом), цитокины, факторы роста, гормоны и другие секретируемые натуральные белки, а также мутантные формы, встречающихся в природе белков.

Термин "антителосвязывающий белок" используется в широком смысле и означает белок, содержащий фрагмент, который связывается с антигеном или целью и, при необходимости, областью каркаса или скелета, что позволяет принять конформацию связывания с областью антигена, которая способствует связыванию антигена связывающего белка с антигеном. Примеры антигена связывающих белков включают человеческое антитело, гуманизированное антитело; химерное антитело; рекомбинантное антитело; одноцепочечное антитело; диатела; триотела; тетратела; Fab-фрагмент; F(ab')₂-Фрагмент; антитело IgD; антитело IgE; антитело IgM; антитело IgG1; антитело IgG2; антитело IgG3; или антитело IgG4, и их фрагменты. Антителосвязывающий белок может содержать, например, альтернативный каркасный белок или искусственный каркасный белок с привитыми CDR или производными CDR. Такие каркасы включают, без ограничений, каркасы, получаемые из антитела, содержащие введенные мутации, например, для стабилизации трехмерной структуры антигена связывающего белка, а также полностью синтетические каркасы, содержащие, например, биосовместимые полимеры. См., например, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1): 121-129 (2003); Roque et al., *Biotechnol. Prog.* 20: 639-654 (2004). Кроме того, могут быть использованы пептидомиметики антител ("ПИМА"), а также каркасы на основе миметиков антител с использованием компонентов фибронектина в качестве каркаса.

Антителосвязывающий белок может иметь, например, структуру натурального иммуноглобулина. "Иммуноглобулин" представляет собой тетрамерную молекулу. В натуральном иммуноглобулине, каждый тетramer состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая область каждой цепи содержит вариабельную область от около 100 до 110 или более аминокислот, главным образом ответственную за распознавание антигена. С-концевая область каждой цепи определяет константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. Человеческие легкие цепи классифицируют как каппа и лямбда легкие цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно.

Цепи натуральных иммуноглобулинов обнаруживают ту же общую структуру консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, называемыми также "определяющие комплементарность области" или CDR. От N-конца к С-концу как легкие, так и тяжелые цепи состоят из доменов FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому домену выполняют в соответствии с определениями Kabat, и соавт. в *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, (1991). По желанию, CDR также могут быть переопределены по альтернативной номенклатуре, такой как Chothia (см. Chothia & Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., (1989) *Nature* 342:878-883 or Honegger & Pluckthun, (2001) *J. Mol. Biol.* 309:657-670).

В контексте настоящего изобретения антигена связывающий белок называется "специфически связываемым" или "избирательно связываемым" с целевым антигеном, когда константа диссоциации (K_D) составляет $\leq 10^{-8}$ М. Антитело специфически связывается с антигеном с "высоким сродством", когда K_D составляет $\leq 5 \times 10^{-9}$ М, и с "очень высоким сродством", когда K_D составляет $\leq 10^{-10}$ М.

Термин "антитело" включает ссылки как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса или на их антигена связывающую область, которая конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное. Кроме того, термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину или к его антигена связывающей области, которая конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное. Антителосвязывающие области могут быть получены методами рекомбинантных ДНК, или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител и может образовывать элемент необходимого белка.

Антителосвязывающие области включают, в частности, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, доменные антитела (dAbs), фрагменты, в том числе "определяющие комплементарность области" (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела, диатела, триотела, тетратела, и полипептиды, содержащие по меньшей мере часть иммуноглобулина, которой достаточно для обеспечения связывания специфического антигена с полипептидом.

Fab-область представляет собой моновалентный фрагмент, имеющий V_L , V_H , C_L и C_H1 домены; F(ab')₂-область представляет собой бивалентный фрагмент, имеющий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-область имеет V_H и C_H1 домены; Fv-область имеет V_L и V_H домены одного плеча антитела; и dAb-область имеет V_H домен, V_L домен, или антигена связывающий фрагмент V_H или V_L домена (патент США. № 6846634, 6696245. Заявка США на Публикацию № 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546).

Одноцепочечное антитело (scFv) представляет собой антитело, в котором в V_L и V_H области соединяются через линкер (например, синтетическая последовательность аминокислотных остатков) в виде непрерывной белковой цепи, в которой линкер достаточно длинный, чтобы позволить белковой цепи

свернуться в обратную сторону и образовать сайт связывания моновалентного антигена (см., например, Bird et al., *Science* 242:423-26 (1988) and Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83). Диатела представляют собой двухвалентные антитела, состоящие из двух полипептидных цепей, где каждая полипептидная цепь состоит из V_H и V_L доменов, соединенных линкером, который является слишком коротким, чтобы обеспечить объединение между двумя доменами той же цепи, таким образом, позволяя каждому домену объединиться с дополнительным доменом другой полипептидной цепи (см., например, Holliger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48; and Poljak et al., (1994) *Structure* 2:1121-23). Если две полипептидные цепи диатела идентичны, то диатело в результате их объединения будет иметь два идентичных антигенсвязывающих сайта. Полипептидные цепи, имеющие различные последовательности могут быть использованы для получения диатела с двумя различными антигенсвязывающими сайтами. Аналогично, триотела и тетратела антител состоят из трех и четырех полипептидных цепей, соответственно, и образуя три и четыре антигенсвязывающих сайтов, соответственно, которые могут быть одинаковыми или разными.

Одна или более CDR могут содержаться в молекуле либо ковалентно, либо нековалентно для создания антигенсвязывающего белка. Антигенсвязывающий белок может содержать CDR(ы) как часть более крупной полипептидной цепи, может ковалентно присоединить CDR(ы) к другой полипептидной цепи, или может содержать CDR(ы) нековалентно. CDR позволяет антигенсвязывающему белку специфически связываться с конкретным целевым антигеном.

Антигенсвязывающий белок может иметь один или более сайтов связывания. Если есть больше чем один сайт связывания, то сайты связывания могут быть идентичными друг другу или могут отличаться. Например, натуральный иммуноглобулин человека обычно имеет два идентичных сайта связывания, в то время как "биспецифическое" или "бифункциональное" антитело имеет два различных сайта связывания.

Для большей наглядности, и как описано в настоящем документе, отмечено, что антигенсвязывающий белок может быть, но не обязательно, человеческого происхождения (например, человеческое антитело), а в некоторых случаях будет состоять из нечеловеческого белка, например, белка крысы или мыши, и в других случаях антигенсвязывающий белок может содержать гибрид человеческих и нечеловеческих белков (например, гуманизированное антитело).

Необходимый белок может содержать человеческое антитело.

Термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие один или более вариабельных и константных областей, полученных из последовательностей человеческого иммуноглобулина. В одном варианте реализации все вариабельные и константные домены получены из последовательностей иммуноглобулина человека (полностью человеческое антитело). Такие антитела могут быть получены различными способами, в том числе путем иммунизации необходимым антигеном мыши, который генетически модифицирован для экспрессии антител, полученных из человеческих генов, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи, такой как мышь, полученная из Xenomouse®, UltiMab™ или системы VelocImmune®. Подходы на основе фагового вектора также могут быть использованы.

Кроме того, необходимый белок может содержать гуманизированное антитело. "Гуманизированное антитело" имеет последовательность, которая отличается от последовательности антитела, полученной из нечеловеческого вида, одной или более аминокислотными заменами, делециями и/или вставками, так что гуманизированное антитело, менее вероятно, вызывает иммунный ответ, и/или вызывает менее тяжелый иммунный ответ по сравнению с нечеловеческими видами антител, когда его вводят человеку. В одном варианте реализации некоторые аминокислоты в каркасных и константных доменах тяжелой и/или легкой цепи антитела нечеловеческого вида изменили для получения гуманизированного антитела. В другом варианте реализации константный домен(ы) из человеческого антитела сливают с вариабельным доменом(ами) нечеловеческого вида. Примеры как сделать гуманизированные антитела могут быть найдены в патенте США № 6054297, 5886152 и 5877293.

"Fc"-область, как этот термин используется в данном документе, состоит из фрагментов двух тяжелых цепей содержащих C_{H2} и C_{H3} домены антител. Фрагменты двух тяжелых цепей удерживаются вместе с помощью двух или более дисульфидных связей и гидрофобных взаимодействий C_{H3} доменов. Необходимые белки, содержащие Fc-область, включая антигенсвязывающие белки и Fc-гибридные белки, составляют другой аспект данного изобретения.

"Гемитело" представляет собой иммунологически функциональный иммуноглобулиновый конструкт, содержащий полную тяжелую цепь, полную легкую цепь и Fc-область второй тяжелой цепи объединенную с Fc-областью полной тяжелой цепи. Линкер может, но не обязательно, использоваться, для присоединения к Fc-области тяжелой цепи и Fc-области второй тяжелой цепи. В конкретных вариантах реализации гемитело является моновалентной формой антигенсвязывающего белка, описанных в данном документе. В других вариантах реализации пары заряженных остатков могут быть использованы для связывания одной Fc-области со второй Fc-областью. Гемитело может быть белком в контексте настоящего изобретения.

Термин "клетка-хозяин" означает клетку, которая была трансформирована, или может быть трансформирована с использованием последовательности нуклеиновой кислоты, и тем самым экспрессировать необходимый ген. Термин включает потомство родительской клетки, независимо от того идентично ли

потомство по морфологии или генетическому материалу исходной родительской клетке, до тех пор, пока присутствует необходимый ген. Культура клеток может состоять из одной или более клеток-хозяев.

Термин "гибридома" означает клетку или потомство клетки, полученные в результате слияния иммортализированной клетки и клетки, продуцирующей антитела. Полученная гибридома представляет собой иммортализированную клетку, которая производит антитела. Отдельные клетки, используемые для создания гибридом, могут быть получены из любого млекопитающего, включая, без ограничений, хомяка, крысу, свинью, кролика, овцу, козу и человека. Этот термин также включает клеточные линии триомы, которые получаются, когда потомство слитых гетерогибридных миелом, которые являются продуктом слияния клеток человека и линии клеток мышевой миеломы, затем сливаются с плазматической клеткой. Этот термин включает любую иммортализированную гибридную клеточную линию, которая продуцирует антитела такие как, например, квадромы (см., например, Milstein et al., (1983) *Nature*, 307:3053).

Термины "культура" и "культура клеток" используются взаимозаменяющими и относятся к популяции клеток, которая поддерживается в питательной среде в условиях, подходящих для выживания и/или роста популяции клеток. Как будет понятно специалистам в данной области техники, эти термины также относятся к комбинации, включающей популяции клеток и питательной среде, в которой популяция супензируется.

Термины "полипептид" и "белок" (например, как используется в контексте необходимого белка или необходимого полипептида) используются взаимозаменяющими в данном документе для обозначения полипептида из аминокислотных остатков. Эти термины также применяются к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков является аналогом или миметиком соответствующей натуральной аминокислоты, а также натурального аминокислотного полимера. Термины могут также включать аминокислотные полимеры, которые были модифицированы, например, путем добавления остатков углеводов с образованием гликопротеинов или фосфорилирования. Полипептиды и белки могут быть получены с помощью натуральной и нерекомбинантной клетки, или полипептиды и белки могут быть получены с помощью генно-инженерной или рекомбинантной клетки. Полипептиды и белки могут состоять из молекул, имеющих аминокислотную последовательность нативного белка, или молекул, имеющих делеции, вставки и/или замены одной или более аминокислот нативной последовательности.

Термины "полипептид" и "белок" включают молекулы, состоящие только из природных аминокислот, а также молекулы, которые содержат ненатуральные аминокислоты. Примеры ненатуральных аминокислот (которые можно заменить на любую натуральную аминокислоту, найденные в любой последовательности, описаны в данном документе, по желанию) включают: 4-гидроксипролин, γ -карбокси-глутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие аналогичные аминокислоты и имино-кислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначении полипептида, используемом в настоящем документе, левонаправленным является аминоконцевое направление и право направлением является C-концевое направление, в соответствии со стандартом использования и конвенций.

Неограничивающий перечень примеров ненатуральных аминокислот, которые могут быть вставлены в белковую или полипептидную последовательность или заменить остатки дикого типа в белковых или полипептидных последовательностях, включает β -аминокислоты, гомоакислоты, циклические аминокислоты и аминокислоты с производными боковыми цепями. Примеры включают (в L-форме или D-форме, сокращенно в скобках): цитруллин (Cit), гомоцитруллин (hCit), N α -метилцитруллин (NMeCit), N α ; метилгомоцитруллин (N α -MeHoCit), орнитин (Orn), N α -метилорнитин (N α -MeOrn или NMeOrn), сарказин (Sar), гомолизин (hLys или hK), гомоаргинин (hArg или hR), гомоглутамин (hQ), N α метиларгинин (NMeR), N α -метиллейцин (N α -MeL или NMeL), N-метилгомолизин (NMeHoK), N α -метилглутамин (NMeQ), норлейцин (Nle), норвалин (Nva), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), октагидроиндол-2-карбоновой кислоты (Oic), 3-(1-нафтил)аланин (1-Nal), 3-(2-нафтил)аланин (2-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), 2-инданилглицин (IgI), парайодфенилаланин (pI Phe), парааминофенилаланин (4AmP или 4-Amino-Phe), 4-гуанидинофенилаланин (Guf), глициллизин (аббревиатура "K(N ϵ -glycyl)" или "K(glycyl)" или "K(gly)", нитрофенилаланин (nitrophe), аминофенилаланин (aminophe или Amino-Phe), бензилфенилаланин (benzylphe), γ карбоксиглутаминовая кислота (γ -carboxyglu), гидроксипролин (hydroxypro), ρ -карбоксилфенилаланин (Cra), α -аминоадипиновая кислота (Aad), N α -метилвалин (NMe-Val), N- α -метил лейцин (NMeLeu), N α метилнорлейцин (NMeNle), циклопентилглицин (Cpg), циклогексилглицин (Chg), ацетиларгинин (acetylarg), α , β -диаминопропионовая кислота (Dpr), α , γ -диаминомасляная кислота (Dab), диаминопропионовая кислота (Dap), циклогексилаланин (Cha), 4-метилфенилаланин (MePhe), β , β -дифенилаланин (BiPhA), аминомасляная кислота (Abu), 4-фенилфенилаланин (или бифенилаланин; 4Bip), α -аминоизомасляная кислота (Aib), бета-аланин, бета-аминопропионовая кислота, пиперидиновая кислота, аминокапроновая кислота, аминогептановая кислота, аминопимелиновая кислота, десмозин, диаминопимелиновая кислота, N-этилглицин, N этиласпартин, гидроксиллизин, алло-гидроксиллизин, изодесмозин, алло-изолейцин, N метилглицин, N метилизолейцин, N-метилвалин, 4-гидроксипролин (hyp), γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-тримеллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3 метилгистидин, 5-гидроксиллизин, ω -

метиларгинин, 4-амино-О-фталевая кислота (4APA), и другие подобные аминокислоты, и производные формы любых из тех, которые перечислены.

Под "культурой клеток" или "культурой" понимается рост и размножение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия для клеток млекопитающих известны в данной области техники. См., например, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих можно культивировать в супензии или прикрепленными к твердой подложке. Биореактор с псевдоожженным слоем, поливолоконные биореакторы, вращающийся флякон, встряхиваемая колба, или биореактор с механическим перемешиванием с или без микроносителями могут использоваться. В одном варианте реализации используются биореакторы от 500 л до 2000 л. В одном варианте реализации используются биореакторы от 1000 л до 2000 л.

Термин "питательная среда для культивирования клеток" (также называемая "культуральная среда", "питательная среда для культуры клеток", "питательная среда для культуры тканей") относится к любому питательному раствору, используемому для выращивания клеток, например, клеток животных или млекопитающих, и который обычно обеспечивает по меньшей мере один или более компонентов из следующих: источник энергии (обычно в форме углеводов, таких как глюкоза); одна или более из всех незаменимых аминокислот, и, как правило, двадцать основных аминокислот, плюс цистеин; витамины и/или другие органические вещества, как правило, необходимые в низких концентрациях; жиры или свободные жирные кислоты; и микроэлементы, например, неорганические соединения или природные элементы, которые обычно требуются в очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне.

Питательный раствор может необязательно быть дополнен дополнительными необязательными компонентами для оптимизации роста клеток, такими как гормоны и другие факторы роста, например, инсулином, трансферрином, эпидермальным фактором роста, сывороткой, и тому подобным, солями, например, кальция, магния и фосфатами, и буферами, например, HEPES; нуклеозидами и основаниями, например, аденоzinом, тимидином, гипоксантином; и белком и тканевым гидролизатом, например, животным или растительным гидролизованным белком (пептон или смеси пептона, которые могут быть получены из животных субпродуктов, очищенного желатина или растительного сырья); антибиотиками, например, гентамицином; средствами для защиты клеток или поверхностно-активными веществами, такими как Pluronic®F68 (также известный как Lutrol® F68 и Kolliphor® P188; неионогенные трибоксополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилен (поли(пропилен оксид)) между двух гидрофильных цепей полиоксиэтилена (поли(этиленоксида)); полиамины, например, путресцин, спермидин и спермин (см., например, Публикация ВОИС №. WO 2008/154014) и пируватом (см., например, патент США №. 8053238) в зависимости от требований клеток в культуре и/или необходимых параметров клеточной культуры.

Среды для культивирования клеток, включают те, которые обычно используются в и/или известны для использования в любом процессе культивирования клеток, таком как, без ограничений, полунепрерывное, расширенное полунепрерывное, периодическое с подпиткой и/или проточное или непрерывное культивирование клеток.

"Базовая" (или исходная) среда для культуры клеток относится к среде для культуры клеток, которая обычно используется для инициации культуры клеток и является достаточно полной для поддержки культуры клеток.

"Ростовая" питательная среда для культуры клеток относится к питательной среде для культуры клеток, которая обычно используется в клеточных культурах в период экспоненциального роста, "фазы роста", и является достаточно полной для поддержки клеточной культуры во время этой фазы. Ростовая питательная среда для культуры клеток может также содержать агенты, которые обеспечивают устойчивость или выживаемость селективных маркеров, введенных в клеточную линию хозяина. Такие селективные агенты включают, без ограничений, генетицин (G4118), неомицин, гигромицин В, пуромицин, зеоцин, метионин сульфоксимин, метотрексат, питательную среду для культуры клеток без глутамина, питательную среду для культуры клеток без глицина, гипоксантина и тимицина, или только тимицина.

"Продуктивная" питательная среда для культуры клеток относится к питательной среде для культуры клеток, которая обычно используется в культурах клеток в течение переходного периода, когда экспоненциальный рост заканчивается и вырабатывается протеин, начинаются фазы "переходная" и/или "продуцирования", и является достаточно полноценной для поддержания требуемой плотности, жизнеспособности и/или титра продукта клеток в этой фазе.

"Перфузионная" среда для культуры клеток относится к среде для культуры клеток, которая обычно используется в клеточных культурах, которые поддерживаются перфузионным или непрерывным способами культивирования, и является достаточно полной для поддержания культуры клеток во время этого процесса. Состав перфузионной среды для культуры клеток может быть более богатым или более концентрированным, чем состав базовой среды для культуры клеток, чтобы обеспечить способ, используемый для удаления отработанной питательной среды. Перфузионная среда для культуры клеток может быть использована в фазах роста и продуцирования.

Концентрированная питательная среда для культуры клеток может содержать некоторые или все питательные вещества, необходимые для поддержания культуры клеток; в частности, концентрирован-

ная питательная среда может содержать идентифицированные или известные питательные вещества, поглощаемые в течение фазы продуцирования культурой клеток. Концентрированная питательная среда может быть основана на любом составе питательной среды для культуры клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать некоторые или все компоненты сред для культивирования клеток в, например, около 2×, 3×, 4×, 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 12×, 14×, 16×, 20×, 30×, 50×, 100×, 200×, 400×, 600×, 800× или даже 1000× от их нормального количества.

Компоненты, используемые для приготовления питательной среды для культуры клеток, могут быть полностью измельчены в порошковый состав питательной среды; частично измельчены и смешаны с жидкими добавками, добавляемые в питательную среду для культуры клеток по мере необходимости; или добавляемые в жидком виде к клеточной культуре.

Культуры клеток также могут быть дополнены независимыми концентрированными добавками определенных питательных веществ, которые могут сложно изготавливаться или быстро истощаться культурой клеток. Такие питательные вещества могут быть аминокислотами такими, как тирозин, цистеин и/или цистин (см., например, Публикация ВОИС №. 2012/145682). В одном варианте реализации концентрированный раствор тирозина отдельно поступает в культуру клеток, выращиваемую на питательной среде для культивирования клеток, содержащей тирозин, так, что концентрация тирозина в культуре клеток не превышает 8 ммоль/л. В другом варианте реализации концентрированный раствор тирозина и цистина отдельно поступает в культуру клеток, выращиваемую в питательной среде для культуры клеток без тирозина, цистина или цистеина. Независимая подпитка может начинаться до или в начале фазы продуцирования. Независимая подпитка может быть достигнута путем периодической подпитки питательной среды для культуры клеток в те же или разные дни как и концентрированная питательная среда. Независимая подпитка также может быть перфузирована в те же или разные сутки как и перфузирование средой.

"Бессывороточная" относится к питательной среде для культуры клеток, которая не содержит животной сыворотки, например, сыворотки крови эмбрионов коров. Различные питательные среды для культуры ткани, включая определенные питательные среды, имеются в продаже, например, любая одна или комбинация из следующих сред для культур клеток могут быть использованы: среда RPMI-1640, среда RPMI-1641, модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM), минимальная поддерживающая среда Игла, среда F-12K, среда Хэма F12, среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков, среда Маккоя 5a, среда Лейбовитца L-15, и бессывороточная среда, такая как EX-CELL™ серия 300 (JRH Biosciences, Ленекса, Канзас), среди других. Бессывороточные варианты таких питательных сред также доступны. Питательная среда для культуры клеток может быть дополнена с использованием дополнительных или повышенными концентрациями компонентов, таких как аминокислоты, соли, сахара, витамины, гормоны, факторы роста, буфера, антибиотики, липиды, микроэлементы и тому подобное, в зависимости от потребностей культивируемой клетки и/или задаваемых параметров культуры клеток.

Термин "биореактор" означает любой сосуд, используемый для выращивания культуры клеток. Культуры клеток настоящего изобретения могут быть выращены в биореакторе, который может быть выбран на основании применения белка, который вырабатывается клетками, выращиваемыми в биореакторе. Биореактор может быть любого размера до тех пор, пока он полезен для культивирования клеток; как правило, биореактор имеет такие размеры, соответствующие объему культуры клеток, выращиваемых внутри него. Как правило, биореактор будет по меньшей мере 1 л и может быть 2, 5, 10, 50, 100, 200, 250, 500, 1,000, 1500, 2000, 2,500, 5,000, 8,000, 10,000, 12,000 л или более, или любой другой объем между ними. Внутренние условия в биореакторе, включая, без ограничений, pH и температуру можно регулировать во время культивирования. Специалисты в данной области техники осведомлены и имеют возможность выбирать подходящие биореакторы для использования в практике настоящего изобретения, основываясь на соответствующих соображениях.

"Плотность клеток" означает количество клеток в единице объема питательной среды. "Плотность жизнеспособных клеток" относится к количеству живых клеток в единице объема питательной среды, как определено стандартной методикой определения жизнеспособности (например, методом исключения красителя трипанового синего).

Термин "жизнеспособность клеток" означает способность клеток в культуре к выживанию при заданном наборе условий культивирования или экспериментальных вариациях. Этот термин также относится к той части клеток, которые живы в конкретный момент времени по отношению к общему числу клеток, живых и мертвых, в культуре в это время.

"Объем осажденных клеток" (PCV), также упоминается как "процентный объем осажденных клеток" (% PCV), представляет собой отношение объема, занимаемого клетками, к общему объему культивируемых клеток, выраженное в процентах (см., Stettler, et al., (2006) Biotechnol Bioeng. Dec 20: 95(6) : 1228-33). Объем осажденных клеток представляет собой функциональный показатель плотности клеток и диаметра клеток; увеличение объема осажденных клеток может возникнуть в результате увеличения либо плотности клеток, либо диаметра клеток или и того и другого. Объем осажденных клеток является мерой содержания твердого вещества в культуре клеток. Твердые вещества удаляются при сборе и даль-

нейшей очистке. Под более твердыми частицами подразумевается больше усилий для отделения твердого материала от целевого продукта во время стадии сбора и дальнейшей очистки. Кроме того, целевой продукт может быть захвачен твердыми телами и потерян в процессе сбора продукта, в результате чего снижается выход продукта. Поскольку клетки-хозяева различаются по размеру, и клеточные культуры также содержат мертвые и умирающие клетки и другие продукты распада клеток, объем осажденных клеток является более точным способом для описания содержания твердого вещества в культуре клеток, чем плотность клеток или плотность жизнеспособной клетки. Например, 2000 л культуры, имеющая плотность клеток 50×10^6 клеток/мл будет иметь совершенно разные объемы осажденных клеток в зависимости от размера клеток. Кроме того, некоторые клетки, находясь в состоянии задержки роста, будут увеличиваться в размерах, поэтому объем осажденных клеток до задержки роста и после задержки роста, вероятно, будет отличаться, в связи с увеличением биомассы в результате увеличения размера клетки.

"Задержка роста", которая может также упоминаться как "задержка клеточного роста", представляет собой тот момент, когда прекращается увеличение количества клеток или когда клеточный цикл клетки больше не прогрессирует. Задержка роста может отслеживаться определением плотности жизнеспособных клеток в культуре клеток. Некоторые клетки в стадии задержки роста могут увеличиться в размерах, но не количеством, поэтому объем осажденных клеток культуры с задержкой роста может увеличиться. Задержка роста может реверсировать в некоторой степени, если клетки не снижают жизнеспособность, путем изменения условий, которые приводят к остановке роста.

Термин "титр" означает общее количество необходимого полипептида или белка (который может быть натуральным или рекомбинантным белком), продуцируемого в культуре клеток в заданном количестве питательной среды. Титр может быть выражен в единицах миллиграммов или микрограммов полипептида или белка на миллилитр (или другую меру объема) питательной среды. "Кумулятивный титр" представляет собой титр, продуцируемый клетками в процессе культивирования, и может быть определен, например, путем ежедневного измерения титра и использования этих значений для расчета кумулятивного титра.

Термин "периодическая культура с подпиткой" относится к типу суспензионной культуры и означает способ культивирования клеток, в котором культура обеспечивается дополнительными компонентами во время засева или во время наступающего следом процесса культивирования. Представленные компоненты, как правило, включают пищевые добавки для клеток, которые истощаются в процессе культивирования. Кроме того, или в качестве альтернативы, дополнительные компоненты могут включать в себя вспомогательные компоненты (например, соединения, ингибирующие клеточный цикл). Периодическую культуру с подпиткой, как правило, останавливают в определенный момент, и клетки и/или компоненты в питательной среде собирают и выборочно очищают.

Термины "общая плотность жизнеспособных клеток" или "IVCD" используют взаимозаменяющими и означают среднюю плотность жизнеспособных клеток в течение культивирования умноженную на количество времени после начала культивирования.

"Кумулятивная плотность жизнеспособных клеток" (CVCD) рассчитывается путем умножения средней плотности жизнеспособных клеток (VCD) между двумя временными точками на длительность интервала между этими двумя временными точками. CVCD представляет собой площадь под кривой, образованной путем построения графика зависимости VCD от времени.

Описание процесса культивирования клеток

В процессе получения рекомбинантного белка целесообразно иметь контролируемую систему, в которой клетки выращиваются до требуемой плотности, затем физиологическое состояние клеток переключают на задержку роста, высокопроизводительное состояние, когда клетки используют энергию и субстраты для получения необходимого рекомбинантного белка вместо того, чтобы производить больше клеток. Различные методы для достижения этой цели существуют и включают температурные изменения и аминокислотное голодание, а также использование ингибитора клеточного цикла или другой молекулы, которые могут задерживать рост клеток, не вызывая гибель клеток.

Получение рекомбинантного белка начинается с создания промышенной клеточной культуры млекопитающих, которая экспрессирует белок, в культуральной чашке Петри, колбе, пробирке, биореакторе или другом подходящем сосуде. Небольшие промышленные биореакторы используется, как правило, в одном варианте реализации в биореакторах от 500 до 2000 л. В другом варианте реализации используются 1000-2000 л биореакторы. Плотность клеток инокулята, используемого для инокуляции биореактора, может иметь положительное влияние на уровень производимого рекомбинантного белка. В одном варианте реализации биореактор засевают по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на мл в бессывороточной культуральной среде. В другом варианте реализации инокулируют $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

Клетки млекопитающих затем проходят экспоненциальную фазу роста. Культура клеток может поддерживаться без подпитки, пока не будет достигнута желаемая клеточная плотность. В одном варианте реализации культура клеток сохраняется в течение трех дней с подпиткой или без нее. В другом варианте реализации культура может инокулироваться требуемой плотностью клеток до начала фазы

продуцирования без короткой фазы роста. В любом из вариантов реализации в данном документе переход от фазы роста к фазе продуцирования также может быть инициирован любым из вышеперечисленных способов.

При переходе между фазой роста и фазой продуцирования, и в течение фазы продуцирования, процентный объем осажденных клеток (%PCV) равен или меньше 35%. Необходимый объем осажденных клеток, поддерживаемый в фазе продуцирования, равен или меньше 35%. В одном варианте реализации объем осажденных клеток равен или меньше 30%. В другом варианте реализации объем осажденных клеток равен или меньше 20%. В еще одном варианте реализации объем осажденных клеток равен или меньше 15%. В дополнительном варианте реализации объем осажденных клеток равен или меньше 10%.

Необходимая плотность жизнеспособных клеток при переходе между фазами роста и продуцирования, и поддерживаемая в течение фазы продуцирования, может быть различной в зависимости от проектов. Она может быть определена на основании эквивалентного объема осажденных клеток из прошлых данных. В одном варианте реализации плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от около 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте реализации плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от около 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 70×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте реализации плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от около 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 60×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте реализации плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от около 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 50×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте реализации плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от около 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 40×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В другом варианте реализации плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от около 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В другом варианте реализации плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от около 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В другом варианте реализации плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от около 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В другом варианте реализации плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от около 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл до по меньшей мере около 25×10^6 жизнеспособных клеток/мл, или по меньшей мере около 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

Сниженный объем осажденных клеток в фазе продуцирования помогает смягчить проблемы барботирования растворенного кислорода, которые могут препятствовать перфузии высокоплотностной культуры. Сниженный объем осажденных клеток также позволяет уменьшить объем питательной среды, который позволяет использовать меньшие емкости для питательной среды и может быть комбинирован с более медленным расходом среды.

Сниженный объем осажденных клеток также оказывает меньшее воздействие на сбор продукта и дальнейшую переработку, по сравнению с культурами с повышенным содержанием биомассы. Все это снижает расходы, связанные с производством терапевтических рекомбинантных белков.

Три способа обычно используются в коммерческих производственных процессах для производства рекомбинантных белков клеточными культурами млекопитающих: полунепрерывная культура, периодическая культура с подпиткой и перфузионная культура. Полунепрерывная культура представляет собой периодический способ, где клетки выращиваются в фиксированном объеме культуральной среды в течение короткого периода времени за которым следует полный сбор продукции. В культурах, выращиваемых с использованием полунепрерывного способа, наблюдаются увеличение плотности клеток до достижения максимальной плотности клеток с последующим снижением плотности жизнеспособных клеток, поскольку компоненты питательной среды поглощаются и уровень побочных продуктов метаболизма (таких как лактат и аммиак) возрастает. Сбор продукции обычно производится в тот момент, когда достигается максимальная плотность клеток (обычно $5-10 \times 10^6$ кл/мл, в зависимости от состава питательной среды, клеточной линии и т. д.). Полунепрерывный процесс представляет собой наиболее простой способ культивирования, однако плотность жизнеспособных клеток лимитируется наличием питательных веществ и после того, как клетки достигают максимальной плотности, культура деградирует, а объемы продукции снижаются. Возможность продления фазы продуцирования отсутствует, так как накапливаются продукты жизнедеятельности и истощаются питательные вещества, что быстро приводит к деградации культуры (как правило, ориентировано с 3 по 7 сутки).

Периодическая культура с подпиткой усовершенствует полунепрерывный процесс путем обеспечения болюсом или непрерывной подпиткой питательной средой для пополнения компонентов питательной среды, которые были использованы.

Поскольку периодические культуры с подпиткой получает дополнительные питательные вещества на протяжении всего производственного процесса, у них есть потенциал для достижения более высокой концентрации клеток (>10 до 30×10^6 клеток/мл, в зависимости от состава питательной среды, клеточной линии и т. д.) и увеличение титра продукта, по сравнению с полунепрерывным способом. В отличие от полунепрерывного процесса, двухфазная культура может быть создана и поддерживается путем манули-

ляций со схемой подпитки и составами питательных сред для разделения фазы пролиферации клеток для достижения желаемой плотности клеток (фаза роста) и фазы приостановки или замедления клеточного роста (фаза продуцирования). Таким образом, периодические культуры с подпиткой имеют потенциал для достижения более высоких титров продукта по сравнению с полунепрерывными культурами. Обычно полунепрерывный способ используется во время фазы роста и периодический способ с подпиткой используется в течение фазы продуцирования, но принцип периодической подкормки может применяться на протяжении всего производственного процесса. Однако, в отличие от полунепрерывного процесса, объем биореактора представляет собой сдерживающий фактор, который ограничивает скорость подачи подпитки. Кроме того, как и с полунепрерывным способом, накопление побочного продукта метаболизма приводит к деградации культуры, что ограничивает продолжительность фазы продуцирования от около 1,5 до 3-х недель. Периодические культуры с подпиткой являются прерывистыми и сбор продукции обычно происходит, когда уровни побочных продуктов метаболизма или жизнеспособность культуры достигает определенных уровней. По сравнению с полунепрерывной культурой, в которой подпитка не происходит, периодическая культура с подпиткой может производить большие количества рекомбинантного белка. См., например, патент США № 5672502.

Способы перфузии предлагают потенциальное улучшение по сравнению с полунепрерывным способом и периодическим способом с подпиткой, путем добавления свежей питательной среды и одновременным удалением отработанной питательной среды. Типичные схемы крупномасштабных коммерческих культур клеток стремятся достичь высокой плотности клеток, $60-90(+)\times 10^6$ кл/мл, причем почти от трети до более половины объема биореактора является биомассой. С помощью перфузионной культуры были достигнуты экстремальные плотности клеток $>1\times 10^8$ клеток/мл и даже более высокие плотности прогнозируются. Типичные перфузионные культуры начинаются с пуска периодической культуры, длившейся в течение дня или двух с последующим непрерывным, ступенчатым и/или прерывистым добавлением свежей питательной среды в культуру и одновременным удалением отработанных питательных сред с сохранением клеток и, дополнительно, высокомолекулярных соединений, таких как белки (на основе фильтра отсечения по молекулярной массе) в течение фаз роста и продуцирования культуры. Различные способы, такие как осаждение, центрифugирование или фильтрование могут быть использованы для удаления отработанных сред, при этом сохраняя плотность клеток. Отмечено, что объемная скорость перфузии составляет от доли рабочего объема в сутки до нескольких рабочих объемов в сутки.

Преимуществом перфузионного процесса является то, что производственная культура может сохраняться в течение более длительных периодов времени, чем полунепрерывный или периодический способ культивирования с подпиткой. Однако увеличение объема приготовленной питательной среды, использование, хранение и утилизация необходимы для поддержания долгосрочной перфузионной культуры, в частности, с высокой плотностью клеток, которые также нуждаются в еще большем количестве питательных веществ, и все это приводит к повышению издержек производства, по сравнению со способами полунепрерывным и периодическим с подпиткой. Кроме того, более высокие плотности клеток могут вызвать проблемы в процессе производства, такие как поддержание уровня растворенного кислорода и проблемы, связанные с увеличением газообразования, в том числе снабжения большим количеством кислорода и удалением большего количества двуокиси углерода, что приводит к увеличению вспенивания, а также необходимость изменений в способах пеногашения; а также во время сбора и дальнейшей переработки, где усилия, необходимые для удаления избыточной биомассы могут привести к потере продукта, сводя к нулю выгоду от увеличения титра по причине увеличения клеточной массы.

Кроме того, представлена схема крупномасштабной коммерческой культуры клеток, которая комбинирует периодическую подпитку во время фазы роста с последующим непрерывной перфузией в течение фазы продуцирования. Способ предназначается для фазы продуцирования, когда культура клеток поддерживает уплотненный объем клеток меньше или равный 35%.

В одном варианте реализации периодическая культура с подпиткой с применением болюсной подпитки используется для поддержания клеточной культуры во время фазы роста. Затем перфузия с подпиткой может быть использована во время фазы продуцирования. В одном варианте реализации перфузия начинается, когда клетки достигают фазы продуцирования. В другом варианте реализации перфузия культуры клеток начинается ориентировочно на 3-9 сутки культивирования. В другом варианте реализации перфузия культуры клеток начинается ориентировочно на 5-7 сутки культивирования.

Использование болюсной подпитки в течение фазы роста позволяет клеткам переходить в фазу продуцирования, что приводит к меньшей зависимости от температурного сдвига в качестве средства инициирования и управления фазой продуцирования, однако температурный сдвиг с 36°C до 31°C может произойти между фазой роста и фазой продуцирования. В одном варианте реализации сдвиг составляет от 36°C до 33°C . В другом варианте реализации инициация задержки клеточного роста в периодической культуре с подпиткой может быть инициирована путем воздействия на периодическую культуру с подпиткой ингибитором клеточного цикла. В другом варианте реализации начало задержки клеточного роста в периодической культуре с подпиткой может быть достигнуто путем перфузии с бессывороточной перфузионной средой, содержащей ингибитор клеточного цикла.

Как описано в настоящем документе в биореактор может быть инокулировано по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ и до $3,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в бессывороточной культуральной среде, например $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

Перфузионная культура представляет собой ту, в которой культура клеток получает свежую подпитку перфузионной средой при одновременном удалении отработанной питательной среды. Перфузия может быть непрерывной, ступенчатой, периодической, или комбинацией любой или всех любых из них. Скорость перфузии может быть от менее чем рабочего объема до многих рабочих объемов в сутки. Клетки сохраняются в культуре и отработанная питательная среда, которая удаляется, практически не содержит клеток или содержит значительно меньшее количество клеток, чем культура. Рекомбинантные белки, экспрессируемые культурой клеток, также могут быть сохранены в культуре. Перфузия может быть достигнута с помощью ряда средств, в том числе центрифугирования, седиментации или фильтрации, см., например, Voisard et al., (2003), Biotechnology and Bioengineering 82:751-65. В качестве примера способ фильтрации представляет собой фильтрацию переменным тангенциальным потоком. Переменный тангенциальный поток поддерживается за счет подаваемой среды посредством модулей из поливолоконного фильтра. См., например, патент США №. 6544424; Furey (2002) Gen. Eng. News. 22 (7), 62-63.

"Скорость потока перфузии" представляет собой количество питательной среды, которая передается с помощью (добавления и удаления) биореактора, как правило, выражается как некоторая часть или кратное от рабочего объема за определенный момент времени. "Рабочий объем" относится к объему биореактора, используемого для культивирования клеток. В одном варианте реализации скорость потока перфузии составляет один рабочий объем или менее в сутки. Перфузионная питательная среда может быть приготовлена для максимизации концентрации перфузионных питательных веществ, чтобы минимизировать скорость перфузии.

Клеточные культуры могут быть дополнены концентрированной питательной средой, содержащей компоненты, такие как питательные вещества и аминокислоты, которые поглощаются в течение фазы продуцирования клеточной культуры. Концентрированная питательная среда может быть основана на любом составе питательных сред для культуры клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать большинство компонентов среды для культивирования клеток в, например, около 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 12×, 14×, 16×, 20×, 30×, 50×, 100×, 200×, 400×, 600×, 800× или даже 1000× от их нормального количества. Концентрированные питательные среды часто используются в процессах периодической культуры с подпиткой.

Способ по настоящему изобретению может быть использован для улучшения производства рекомбинантных белков в несколько фаз процесса культивирования. При многостадийном способе клетки культивируют в две или более фаз. Например, клетки могут быть культивированы сначала в одной или более фазах роста, в условиях среды, которые максимизируют клеточную пролиферацию и жизнеспособность, затем переводят в фазу продуцирования, в условия, которые максимизируют продукцию белка. В коммерческих процессах производства белка с помощью клеток млекопитающих, существует несколько, например, по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фаз роста, которые происходят в разных культуральных сосудах, предшествующих конечной производственной культуре.

Фазы роста и продуцирования могут предшествоваться или разделяться одной или более переходными фазами. В многостадийных процессах способ по настоящему изобретению может быть использован по меньшей мере в течение фазы роста и продуцирования конечной фазы производства коммерческой культуры клеток, хотя она также может быть использована в предшествующей фазе роста. Фаза продуцирования может проводиться в крупных масштабах. Крупномасштабный процесс может быть проведен в объеме по меньшей мере около 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10,000, 15,000, 20,000 л. В одном варианте реализации изобретения производство ведется в 500, 1000 и/или 2000 л биореакторах.

Фаза роста может протекать при более высокой температуре, чем на стадии продуцирования. Например, ростовая фаза может протекать при первой температуре от около 35°C до около 38°C и фаза продуцирования может протекать при второй температуре от около 29°C до около 37°C, дополнительно от около 30°C до около 36°C или от около 30°C до около 34°C. Кроме того, химические индукторы синтеза белков, такие как, например, кофеин, бутират и гексаметилен-бис-ацетамид (ГМБА) могут быть добавлены одновременно, до и/или после изменения температуры. Если индукторы добавляются после изменения температуры, то они могут быть добавлены от одного часа до пяти суток после изменения температуры, дополнительно от одной до двух суток после изменения температуры. Клеточные культуры могут поддерживаться в течение нескольких суток или даже недель, в то время как клетки продуцируют нужный белок(и).

Образцы культуры клеток можно контролировать и оценивать с помощью любой из аналитических методик известных в данной области техники. Различные параметры, включая рекомбинантный белок и качество питательной среды и характеристики могут проверяться в течение всего срока культивирования. Образцы могут отбираться и контролироваться периодически с желаемой частотой, включая непрерывный мониторинг в реальном времени или близком к реальному времени.

Как правило, клеточные культуры, которые предшествуют конечной производственной культуре (от N-х до N-1), используются для создания посевных клеток культуры N-1, которые будут использованы для инокуляции производственного биореактора. Посевная концентрация клеток может иметь положительное влияние на уровень продуцируемого рекомбинантного белка. Уровни продукта имеют тенденцию к увеличению с увеличением концентрации посевного материала. Улучшение в титре связано не только с более высокой концентрацией посевного материала, но, вероятно, будет зависеть от метаболизма и стадии клеточного цикла клеток, которые помещены в производственный процесс.

Посевные клетки могут быть получены любым способом культивирования. Одним из таких способов является перфузионное культивирование с использованием фильтрации переменным тангенциальным потоком. Биореактор N-1 может работать с использованием фильтрации переменным тангенциальным потоком, чтобы способствовать высокой плотности клеток для инокуляции производственного биореактора. Стадия N-1 может быть использована для выращивания клеток с плотностью $>90 \times 10^6$ клеток/мл. Биореактор N-1 может быть использован для создания бояльса посевных культур или может быть использован в качестве чередующейся культуры посевного фонда, которую можно было бы сохранить на посев нескольких производственных биореакторов при высокой плотности посевных клеток. Продолжительность фазы роста производственного процесса может варьироваться от 7 до 14 суток и может быть разработана так, чтобы поддерживать клетки в экспоненциальном росте до инокуляции производственного биореактора. Скорости перфузии, состав питательной среды и сроки оптимизации роста клеток, и перенесение их в производственный биореактор в состоянии, которое в наибольшей степени способствует оптимизации их производства. Плотность посевных клеток $>15 \times 10^6$ клеток/мл может быть достигнута для посева производственных биореакторов. Более высокая плотность посевных клеток при инокуляции может уменьшить или даже исключить время, необходимое для достижения нужной производственной плотности.

Настоящее изобретение находит конкретное применение в регуляции наличия и/или количества гликозилирования рекомбинантного белка. Клеточные линии (также известные как "клетки-хозяева"), используемые в настоящем изобретении, являются генетически сконструированными для экспрессии полипептида, представляющего коммерческий или научный интерес. Клеточные линии, как правило, получают из линии, происходящей из первичной культуры, которая может поддерживаться в культуре в течение неограниченного времени. Генетическое конструирование клеточной линии включает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток с помощью рекомбинантной полинуклеотидной молекулы, и/или иным образом измененные (например, путем гомологичной рекомбинации и активации генов или слияния рекомбинантной клетки с нерекомбинантной клеткой) таким образом, чтобы вызвать в клетке-хозяине экспрессию необходимого рекомбинантного полипептида. Способы и векторы генетического конструирования клеток и/или клеточных линий для экспрессии необходимого полипептида, хорошо известны специалистам в данной области техники; например, можно использовать различные методики, проиллюстрированные в Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, and quarterly updates); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69.

Клеточные линии животных получены из клеток, чьи клетки-предшественники были получены из многоклеточных животных. Один из типов клеточной линии животных представляет собой клеточную линию млекопитающего. Широкое разнообразие клеточных линий млекопитающих пригодных для роста в культуре доступны из Американской коллекции типовых культур (Манассас, штат Вирджиния) и коммерческих поставщиков. Примеры клеточных линий, обычно используемых в промышленности, включают Vero, BHK, Hela, CV1 (в том числе Cos), MDCK, 293, 3T3, клеточные линии миеломы (например, NSO, NS1), PC12, WI38 клетки и клетки яичника китайского хомяка (CHO). Клетки CHO широко используются для получения сложных рекомбинантных белков, например, цитокинов, факторов свертывания крови и антител (Brasel et al. (1996), Blood 88:2004-2012; Kaufman et al. (1988), J. Biol Chem 263:6352-6362; McKinnon et al. (1991), J Mol Endocrinol 6:231-239; Wood et al. (1990), J. Immunol. 145:3011-3016). Дигидрофолатредуктаза (DHFR) - дефицитные мутантные клеточные линии (Urlaub et al. (1980), Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220), DXB11 и DG44 являются желательными линиями клеток-хозяев CHO, так как эффективная DHFR-секретирующая и амплифицируемая система экспрессии гена позволяет экспрессировать на высоком уровне рекомбинантный белок в этих клетках (Kaufman R.J. (1990), Meth Enzymol 185:537-566). Кроме того, указанные клетки легкоуправляемы в виде монослойных или супензационных культур и демонстрируют относительно хорошую генетическую стабильность.

Клетки CHO и экспрессируемые ими рекомбинантные белки были тщательно описаны и были одобрены регулирующими органами для использования в клиническом коммерческом производстве.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает клетки-хозяева в которые был введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Клетка-хозяин может быть любой прокариотической клеткой (например, *E. coli*) или эукариотической клеткой (например, дрожжи, насекомые или клетки млекопитающих (например, клетки CHO)). Вектор ДНК может быть введен в прокариотические или эукариотические клетки с помощью обычных методик трансформации или трансфекции. Многочисленные спосо-

бы трансфекции известны в данной области техники и включают использование липидов (например, Lipofectamin®), фосфата кальция, катионных полимеров, ДЭАЭ-декстрана, активированных дендримеров и магнитных микросфер. Дополнительные способы трансфекции используют методики на основе инструмента. Примеры включают электропорацию, баллистическую пушку, микроинъекцию и лазерную трансфекцию/оптоинъекцию, которые использует свет (например, лазер), чтобы ввести нуклеиновую кислоту в клетку-хозяина.

Известно, что стабильная трансфекция клеток млекопитающих зависит от экспрессирующего вектора и используемого способа трансфекции, только небольшая часть клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном. Для того чтобы определить и выбрать этих интегрантов, ген, кодирующий селективный маркер (например, для устойчивости к антибиотикам), как правило, вводят в клетки-хозяева вместе с необходимым геном. Предпочтительные селективные маркеры включают те, которые придают устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицину и метотрексату. Клетки, стабильно трансфектированные введенной нуклеиновой кислотой, могут быть идентифицированы путем селекции лекарственными средствами (например, клетки, которые включили ген селектируемого маркера, будут выживать, в то время как другие клетки умирают), наряду с другими способами.

Необходимые белки

Способы настоящего изобретения могут быть использованы для культивирования клеток, которые экспрессируют рекомбинантные белки, представляющие интерес. Экспрессируемые рекомбинантные белки могут секретироваться в культуральную среду, из которой они могут быть извлечены и/или собраны. Кроме того, белки могут быть очищены или частично очищены из такой культуры или компонента (например, из культуральной среды) с использованием известных способов и продуктов, доступных от коммерческих поставщиков. Очищенные белки могут быть затем "приготовлены", что означает замену буферного раствора, стерилизацию, упаковку для оптовой продажи и/или упаковку для конечного потребителя. Пригодные составы для фармацевтических композиций, включают те, которые описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Примеры полипептидов, которые могут быть получены с помощью способов по настоящему изобретению, включают белки, содержащие аминокислотные последовательности, идентичные или по существу подобные всем или части одного из следующих белков: фактор некроза опухолей (ФНО), лиганд flt3 (WO 94/28391), эритропоэтин, тромбопоэтин, кальцитонин, ИЛ-2, ангиопоэтин-2 (Maisonneuve et al. (1997) , Science 277 (5322) : 55-60), лиганд для рецептора активатора фактора транскрипции каппа В (RANKL, WO 01/36637), фактор некроза опухолей (ФНО)-связанный апоптозиндуцирующий лиганд (TRAIL, WO 97/01633), тимусный стромальный лимфопоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, австралийский патент № 588819), фактор роста тучных клеток, фактор роста стволовых клеток (патент США № 6204363), фактор роста эпидермиса, фактор роста кератиноцита, фактор роста и развития мегакариоцитов, цитокин А5, белок человеческого фибриногена второго типа (FGL2; НЦБИ № доступа NM 00682; Ruegg and Pytela (1995), Gene 160:257-62) гормон роста, инсулин, инсулинотропный, инсулиноподобный фактор роста, паратиреоидный гормон, интерферон, включающие α -интерферон, γ -интерферон, а также консенсус интерфероны (патент США № 4695623 и 4897471), нейротрофический ростовой фактор, нейротрофический фактор головного мозга, изотипы белков синаптотагмина (SLP 1-5), нейротрофин-3, глюкагон, интерлейкины, колониестимулирующие факторы, лимфотоксин-р, фактор, ингибирующий лейкемию, и онкостатин-М. Описания белков, которые могут быть получены в соответствии с предлагаемыми способами, могут быть найдены, например, в цитокинах человека: Handbook for Basic and Clinical Research, all volumes (Aggarwal and Gutierrez, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); факторы роста: Практический подход (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); и The Cytokine Handbook, Vols. 1 and 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

Дополнительно способы по настоящему изобретению были бы полезны для получения белков, содержащих всю или часть аминокислотной последовательности рецептора для любого из указанных выше белков, антагониста таких рецепторов или какого-либо из указанных выше белков, и/или белков по существу сходных с такими рецепторами или антагонистами. Эти рецепторы и антагонисты включают: обе формы рецептора фактора некроза опухоли (РФНО, известного как p55 и p75, патент США № 5395760 и патент США № 5610279), рецепторов интерлейкина-1 (ИЛ 1) (типы I и II; патент ЕП № 0460846, патент США № 4968607, и патент США № 5767064.), антагонисты рецептора ИЛ-1 (патент США № 6337072), антагонисты или ингибиторы ИЛ-1 (патент США № 5981713, 6096728, и 5075222) рецепторы ИЛ-2, рецепторы ИЛ-4 (патент ЕП № 0367566 и патент США № 5856296) рецепторы ИЛ-15, рецепторы ИЛ-17, рецепторы ИЛ-18, Fc-рецепторы, рецептор гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора, рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, рецепторы для онкостатина-М и фактора, ингибирующего лейкоз, рецептор активатора фактора транскрипции каппа В (RANK, WO 01/36637 и патент США № 6271349), остеопротегерин (патент США № 6015938), рецепторы для TRAIL (включая TRAIL-рецепторы 1, 2, 3 и 4), а также рецепторы, которые содержат домены смерти, такие как Fas или апоптозиндуцирующий рецептор (AIR).

Другие белки, которые могут быть получены с использованием настоящего изобретения, включают белки, содержащие все или часть из аминокислотных последовательностей антигенов дифференциации (называемых белками CD), или их лиганды или белки по существу аналогичные любому из них. Такие антигены описаны в Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996). Подобные CD белки обсуждаются в соответствующих практикумах. Примеры таких антигенов включают CD22, CD27, CD30, CD39, CD40, и лиганды к ним (лиганд CD27, лиганд CD30, и др.). Некоторые из CD-антигенов являются членами семейства рецепторов ФНО, которое также включает 41BB и OX40. Лицанды нередко являются членами семейства ФНО, как и лиганд 41BB и лиганд OX40.

Ферментативно активные белки и их лиганды также могут быть получены с использованием настоящего изобретения. Примеры включают белки, содержащие весь или часть из следующих белков или их лигандов или белка по существу аналогичного одному из этих: дезинтегрину и представителям семейства доменов дезинтегрина и металлопротеиназам, включая ФНО-альфа конвертирующий фермент, различным киназам, глукоцереброзидазе, супероксиддисмутазе, тканевому активатору плазминогена, фактору VIII, фактору IX, аполипопротеину E, аполипопротеину A-I, глобинам, антагонисту ИЛ-2, альфа-1-антитрипсину, лигандам любого из указанных выше ферментов, а также множеству других ферментов и их лигандов.

Примеры антител, которые могут быть получены, включают, без ограничений, те, которые узнают любой один или комбинацию белков, включая, без ограничений, указанные выше белки и/или следующие антигены: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-7, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-10, рецептор ИЛ-1, рецептор ИЛ-2, рецептор ИЛ-4, рецептор ИЛ-6, рецептор ИЛ-13, субъединицу рецептора ИЛ-18, FGL2, PDGF- β и их аналоги (см., патент США № 5272064 и 5149792), VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, рецептор EGF (см., патент США № 6235883) рецептор VEGF, фактор роста гепатоцитов, лиганд осстеопротегерина, гамма-интерферон, стимулятор В-лимфоцитов (BlyS, также известный как BAFF, THANK, TALL-1 и zTNF4; см, Do и Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1) : 19-25), C5 комплемент, IgE, опухолевый антиген CA125, опухолевый антиген MUC1, PEM антиген, LCG (представляющий собой генетический продукт, экспрессируемый ассоциировано с раком легкого), HER-2, HER-3, опухолеассоциированный гликопротеин TAG-72, SK-1 антиген, опухолеассоциированные эпитопы, которые присутствуют в повышенных количествах в сыворотке крови пациентов с раком толстой кишки и/или раком поджелудочной железы, рак-ассоциированные эпитопы или белки, экспрессируемые в раковых клетках опухоли груди, прямой кишке, сквамозных клеток, простаты, поджелудочной железы, легкого, и/или почки и/или клетках меланомы, глиомы, или нейробластомы, некротического ядра опухоли, интегрин альфа 4 бета 7, интегрин VLA-4, интегрины (включая интегрины, содержащие альфа4бета7), рецепторы TRAIL 1, 2, 3 и 4, рецептор активатора ядерного фактора каппа В (RANK), лиганд RANK, ФНО- α , молекула адгезии VAP-1, молекула адгезии эпителиальной клетки (EpCAM), межклеточная молекула адгезии-3 (ICAM-3), адгезин лейкоинтегрина, тромбоцитарный гликопротеин gp IIb/IIIa, тяжелая цепь сердечного миозина, паратиреоидный гормон, tNAPc2 (который является ингибитором фактора клеточного фактора-VIIa), главный комплекс гистосовместимости (MHC) I, карциноэмбриональный антиген (CEA), альфа-фетопротеин (AFP), фактор некроза опухоли (ФНО), CTLA-4 (который является цитотоксического Т лимфоцита-ассоциированным антигеном), рецептор Fc- γ -1, HLA-DR 10 бета, HLA-DR антиген, склеростин, L-селектин, респираторноносинцитиальный вирус, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (HBV), Streptococcus mutans, и Staphylococcus aureus.

Конкретные примеры известных антител, которые могут быть получены с использованием способов настоящего изобретения, включают, без ограничений, ададимумаб, бевацизумаб, инфликсимаб, абциксимаб, алемтузумаб, бапинизумаб, базиликсимаб, белимумаб, бриакинумаб, бродалумаб, канакинумаб, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, конатумумаб, деносумаб, экулизумаб, этролизумаб, эволокумаб, гемтузумаб озогамицина, голимумаб, ибритутомаб тиуксетан, лабетузумаб, мапатумумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, муромонаб-CD3, натализумаб, нимотузумаб, офатумумаб, омализумаб, ореговомаб, паливизумаб, панитумумаб, пемтумомаб, пертузумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, ровелизумаб, тоцилизумаб, тозитумомаб, трастузумаб, устекинумаб, ведолизомаб, залутумумаб и занолимумаб.

Настоящее изобретение также может быть использовано для получения гибридных рекомбинантных белков, содержащих, например, любой из вышеуказанных белков. Например, гибридные рекомбинантные белки, содержащие один из указанных выше белков плюс домен мультимеризации, такой как лейциновая застежка, суперспираль, Fc-область иммуноглобулина, или по существу подобные белки, могут быть получены с использованием способов по настоящему изобретению. См., например, WO94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262:1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371:80-83; Hakansson et al.(1999), Structure 7:255-64. Более конкретно, среди таких гибридных рекомбинантных белков есть белки, в которых части рецептора слиты с Fc-областью антитела, такой как этанерцепт (a p75 TNFR: Fc), абатаципент и белатаципент (CTLA4: Fc).

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами реализации,

описанными в данном документе, которые предназначены в качестве иллюстрации отдельных аспектов настоящего изобретения и функционально эквивалентных способов и компонентов, находящихся в пределах объема настоящего изобретения. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и прилагаемых графических материалов. Такие модификации предназначены для того, чтобы находиться в пределах объема приложенной формулы изобретения.

Примеры

Пример 1.

Моноклональные антитела, продуцируемые клеточной линией яичников китайского хомяка (CHO), экспрессирующие рекомбинантные человеческие антитела, которые традиционно показывают низкие уровни высокоманнозной (НМ) экспрессии (мкАТ А), использовали для экспериментов миРНК. Клеточная линия была получена клонально с помощью селекции на основе DHFR; для стандартной культуры, клетки культивировали в суспензии, в селективной среде, содержащей метотрексат (МТХ). Культуры поддерживали в любой вентилируемой 125 мл или 250 мл конической встряхиваемой колбе Эрленмейера (Corning Life Sciences, Лоуэлл, Массачусетс) или 50 мл пробирке с вентилируемой крышкой (TPP, Тразадинген, Швейцария) при 36°C, 5% CO₂ и 85% относительной влажности. Колбы Эрленмейера встряхивали при 120 оборотах в минуту с 25 мм орбитальным диаметром в автоматическом инкубаторе CO₂ большой емкости (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) и пробирки с вентилируемой крышкой встряхивали при 225 оборотах в минуту, 50 мм орбитальным диаметром в инкубаторе ISF4-X большой емкости (Kuhner AG, Базель, Швейцария).

Восемь различных 19мер миРНК были испытаны на Mgat1, Mgat2 и Slc35a2. МиРНК временно трансфектировали в клетки линии МкАТ А с использованием Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies; трансфекционный реагент на основе липида, который образует комплекс с нуклеиновыми кислотами и облегчает трансфекцию клеток с помощью нуклеиновой кислоты) в соответствии с протоколом производителя. В кратком изложении, клетки высевали по 2×10^5 в каждую лунку шестилуночных планшетов (Corning) с 500 мкл питательной среды в день трансфекции. Для трансфекции 10 пмоль миРНК смешивали с 1,5 мкл Lipofectamine RNAiMAX в 100 мкл среды Optimem I и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем комплексный реагент RNAi -Lipofectamine RNAiMax добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали в течение 3-х дней при 36°C в CO₂ инкубаторе. Клетки подвергали лизису с использованием 1X буфера для лизиса (Affymetrix Inc., Санта-Клара, Калифорния) при 50°C в течение 1 ч. Лизаты использовали для анализа экспрессии мРНК с помощью мультиплексного анализа QuantiGene® с использованием системы FLEXMAP 3D® (Luminex, Остин Техас, белковый и геномный мультиплексный анализ на микросферах).

Для анализа экспрессии мРНК использовали систему реагентов QuantiGene Plex 2.0 (Affymetrix Inc. Санта-Клара, Калифорния). Кратко, осадок клеток после центрифugирования 5×10^5 жизнеспособных клеток лизировали с использованием 1X буфера для лизиса (QS0100) (Affymetrix Inc. Affymetrix Inc., Санта-Клара, Калифорния), дополненный протеиназой K (исходная концентрация 50 мг/мл), и инкубировали при 50°C в течение 1 ч. Лизаты клеток хранили при -80°C до использования. Использовали и набор индивидуальных геноспецифических зондов, нацеленных на Mgat1, Mgat2 и Slc35a3 и на гены нормализации (Affymetrix, Inc. Санта-Клара, Калифорния). Замороженные лизаты были разморожены и обработаны с использованием стандартного протокола Affymetrix для анализа уровня экспрессии мРНК.

Данные, полученные в результате оценки медианы репортерной флуоресценции от 100 микросфер на ген на каждую лунку, проанализировали и представили в виде медианы интенсивности флуоресценции (MFI). Фоновые сигналы были определены при отсутствии мРНК-мишени из контрольной пробы и были вычтены из сигналов, полученных в присутствии мРНК мишеней. Флуоресцентную интенсивность необходимого гена нормализовали к двум конститутивным генам: GusB и TBP.

$$NormRatio = \frac{MFI \text{ гена интереса}}{MFI \text{ конститутивного гена}}$$

Чувствительность анализа для каждой РНК-мишени оценивали путем определения предела обнаружения (LOD), определенный в качестве целевой концентрации, при котором сигнал на три стандартных отклонения выше фона. Коэффициент вариации (CV) измеряет точность анализа и представляет собой отношение стандартного отклонения и среднего значения.

Все образцы определяли в трех экземплярах и буфер для лизиса был использован в качестве контроля. Образцы анализировали с помощью планшет-ридера Bio-Plex 3D (Luminex Corporation) и данные получали с помощью программного обеспечения Bio-Plex Data Manager 5.0 (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния).

Для каждого гена выбирались две миРНК, которые достигали >85% нокдауна без каких-либо значительных нецелевых эффектов. Отобранные миРНК затем трансфектировали в клеточную линию МкАТ А и проводили 10-суточный цикл производства антител с периодической подпиткой. В производстве с периодической подпиткой исследуемые клетки высевали при $3,5 \times 10^5$ клеток/мл в производственные сре-

ды. Трехмиллилитровый рабочий объем использовали в 24-луночных глубоких планшетах (Axygen Scientific, Юнион-Сити, Калифорния), или 25 мл рабочий объем в 125 мл вентилируемых конических встряхиваемых колбах. Культуры подпитывали одноболюсной подпиткой равной 7% от первоначального объема культуры на 3, 6 и 8 сутки. Глюкозу добавляли до концентрации равной 10 г/л на 3, 6 и 8 сутки. Центрифугированную кондиционированную среду собирали на 10-е сутки производственного цикла. Образцы также были взяты на 3, 6, 8 и 10 сутки для данных о росте, жизнеспособности и метаболизме и на 6, 8 и 10 сутки для титра и анализа высокоманнозных гликоформ.

Образцы клеточной массы были взяты из культур на 3, 6, 8, 10 сутки для анализа экспрессии мРНК; полученные результаты приведены ниже в табл. 1.

Таблица 1. Снижение уровня Mgat1, Mgat2 и Slc35a2 с помощью обработки миРНК

Образцы	% нокдауна			
	3 сутки	6 сутки	8 сутки	10 сутки
миРНК-Mgat1	90	83	85	67
миРНК-Mgat2	78	64	71	59
миРНК-Slc35a2	57	51	14	7

Анализ экспрессии мРНК показал, что уровни транскриптов Mgat1 и Mgat2 были снижены на >50% в течение 10-суточного производственного цикла. Уровни экспрессии Slc35a2 были снижены на >50% с 3 по 6 сутки, однако на 8 и 10 сутки наблюдали снижение только на 7-14%.

Титр антител и %НМ определяли на десятые сутки периодической культуры с подпиткой. Титры были измерены с помощью аффинности к протеину А с сенсорным идентификатором POROS PA с использованием Waters UPLC. Высокое содержание маннозы измеряли с использованием анализатора НМ Caliper GX II (Caliper Life Sciences Inc., компания PerkinElmer) или с использованием СВЭЖХ ХГВ (хроматография, основанная на гидрофильном взаимодействии) (Waters Acuity UPLC оснащена флуоресцентным детектором (FLR) СВЭЖХ, используемым с гликановой колонкой СВЭЖХ (Acuity UPLC ВЕН Glycan Column)). Результаты показаны ниже в табл. 2 (результаты представлены как среднее значение плюс/минус стандартное отклонение).

Таблица 2. Титр и % НМ клеточных линий, обрабатываемых миРНК

Образцы	Титр (г/л)	% НМ
Без миРНК	0,75±0,09	0,81±0,07
миРНК MGAT1	0,73±0,05	72,42±3,28
миРНК MGAT2	0,87±0,27	1,98±0,31
миРНК Slc35a2	0,57±0,36	1,56±0,29

Анализ этих результатов показал, что в клетках, обработанных миРНК Mgat1, уровни НМ были увеличены на 70%, тогда как нокдаун либо Mgat2 или Slc35a2 существенно не влияют на НМ. Тем не менее, на 10-е сутки уровни Slc35a2 восстановились до 90% от контрольных значений, так что невозможно исключить роль этого гена в модуляции НМ для этого эксперимента. Никаких существенных изменений в титре продуцируемых антител не наблюдали при обработке миРНК. Кроме того, обработка миРНК не влияет на продуктивность или жизнеспособность клеток, что свидетельствует о том, что повышенные уровни НМ, наблюдаемые с уменьшением экспрессии мРНК Mgat1, вероятно, будут напрямую связаны со снижением активности Mgat1.

Пример 2.

Моноклональные антитела продуцируемые клеточной линией яичников китайского хомяка (CHO), экспрессирующие рекомбинантные человеческие антитела, которые традиционно показывают высокие уровни (например, >10%) высокоманнозного типа гликанов (мкАТ В), были использованы для экспериментов трансфекции. Клеточная линия была получена клонально с помощью селекции на основе DHFR; для стандартной культуры, клетки культивировали в суспензии, в селективной среде, содержащей МТХ. Культуры поддерживали в любой вентилируемой 125 мл или 250 мл конической встряхиваемой колбе Эрленмейера (Corning Life Sciences, Лоуэлл, Массачусетс) или 50 мл пробирке с вентилируемой крышкой (TPP, Тразадинген, Швейцария) по существу как описано ранее.

Клетки мкАТ В были трансфектированы с использованием: либо контрольного вектора с нулевой экспрессией, либо бицистронного вектора экспрессии, содержащего Mgat1 и Mgat2, связанные с фурином pep2A (M1M2), либо вектором, содержащим Slc35a2 (S) или котрансфекцией векторами Mgat1, Mgat2 и Slc35a2 (M1M2S). После восстановления жизнеспособности этих клеток в селективной среде более чем на 80%, они были одноклеточно клонированы с использованием проточной цитометрии. Для тех клеточных линий, которые были получены из одной клетки, были проанализированы уровни экспрессии генов, представляющих интерес. Для каждой из четырех различных векторных конфигураций были проанализированы более 40 клонов на экспрессию генов, представляющих интерес, и на основе этого анализа двадцать клеточных линий со сверхэкспрессией и десять контрольных клеточных линий были выбраны для дальнейшей характеристики в двух отдельных 10-суточных производственных циклах

с подпиткой, которые проводили по существу как описано ранее.

В начале первого периодического культивирования с подпиткой в среднем время удвоения для сверхэкспрессирующих клеточных линий было выше (> 25 ч) и ВУП (время удвоения популяции) было ниже по сравнению с контролем (< 25 ч) с более высоким ВУП (фиг. 1). Поэтому второй 10-суточный эксперимент с периодической подпиткой проводили для меньшего подмножества клонов, которые все показывали аналогичное время удвоения (фиг. 2).

Статистический анализ экспрессии мРНК в отобранных клонах из второго эксперимента с периодической подпиткой подтвердил, что кратное изменение сверхэкспрессии было существенным по сравнению с контролем. Ген Mgat2 имел большее кратное увеличение экспрессии по сравнению с геном Mgat1. Результаты показаны ниже в табл. 3.

Таблица 3. Среднее кратное увеличение уровней транскриптов Mgat1, Mgat2 и Slc35a2 для трех наборов сверхэкспрессирующих клонов

Образцы	Mgat1	Mgat2	Slc35a2
M1M2	6,24	26,29	0,99
M1M2S	1,45	7,76	37,28
S	0,83	0,99	27,1

Для дальнейшего исследования уровней индуцированной сверхэкспрессии уровни протеина Mgat1 и Mgat2 были количественно определены с помощью жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ/ТМС). Контрольную клеточную линию, которая была трансфенирована пустым вектором (ПВ), а также две линии со сверхэкспрессией как Mgat1, так и Mgat2 (B1 и B2) анализировали. Результаты показаны ниже в табл. 4. Относительная экспрессия белка измерялась в миллионных долях (мд).

Таблица 4. Нормализованные мРНК и уровни белка в контрольной клеточной линии и двух клеточных линиях, экспрессирующих Mgat1 и Mgat2 на 10 сутки

	Белки	ПВ	B1	B2
мРНК	Mgat1	0,527	5,855	13,042
	Mgat2	1,242	20,313	44,156
	Mgat2/Mgat1	2,4	3,5	3,4
Белок	MGAT1 (м.д.)	0,8	101	160,1
	MGAT2 (м.д.)	6,6	527,8	783,4
	MGAT2/MGAT1	8,3	5,2	4,9

Как видно из табл. 4, ПВ показывает низкие уровни экспрессии Mgat1 и Mgat2, в то время как уровни экспрессии этих белков были значительно повышены в клеточных линиях B1 и B2. Кроме того, в клеточных линиях B1 и B2, Mgat2 проявляет повышенные уровни экспрессии по сравнению с Mgat1. Эти данные высоко коррелируют с наблюдаемыми уровнями экспрессии мРНК Mgat1 и Mgat2 на 10-е сутки.

В противоположность этому, уровни экспрессии конститутивного белка (GAPDH, данные не приведены) оставались неизменными в этих трех клеточных линиях на 8 и 10 сутки (две суток на которые анализировали экспрессию белка).

На фиг. 3, 4 и 5 показано, что рост и удельная продуктивность были похожи между группами; однако титр был значительно увеличен в сверхэкспрессирующих клонах Mgat1 и 2 по сравнению с двумя другими группами. Клеточные линии, сверхэкспрессирующие Mgat1 и Mgat2 (M1M2), также как те сверхэкспрессирующие клонов всех трех генов (M1M2S) показали снижение высоких уровней маннозы по сравнению с контрольными клетками (70% и 29% соответственно (фиг. 6). Вместе с тем, клеточные линии со сверхэкспрессией Slc35a2 (S) не показали статистически значимые изменения по сравнению с контролем (фиг. 6). Поскольку роль переносчика УДФ-галактозы (белок, кодируемый Slc35a2) заключается в транспортировке нуклеотидного сахарного субстрата, в том числе и УДФ-GlcNAc в полости Гольджи, повышенные уровни Slc35a2 не влияют на последующую обработку гликана, если уровни УДФ-GlcNAc являются лимитирующими.

Профили гликоформ секретируемого рекомбинантного мkAT В оценивали для каждой из сверхэкспрессирующей клеточной линии (M1M2, M1M2S и S). Клеточные линии M1M2 показали значительное снижение всех видов НМ, таких как M5, M6, M7 и M8b по сравнению с контрольными клеточными линиями. Результаты показаны ниже в табл. 5.

Таблица 5. Профили гликозилирования антитела, продуцируемого в сверхэкспрессирующих клеточных линиях Mgat1, Mgat2 и/или Slc35a2 на 10 сутки периодической культуры с подпиткой

Тип гликоформы	Гликоформа	Контроль	Клоны M1M2	Клоны M1M2S	Клоны S
Высокоманнозные гликаны	M8a	0,52	1	0	1
Гибрид	M8b	0,78	0,37	0,52	0,53
	M7	2,65	0,58	1,25	1,24
	M6	3,78	0,68	1,23	1,41
	M5	7,98	1,21	4,82	10,89
Гибрид	Гибрид	2,53	2,93	3,04	4,33
Комплекс	A1G1F	0,80	0,17	0,42	1,08
	A1G0	1,22	1,00	1,42	1,12
	A2G0	1,04	2,33	1,97	0,64
	A2G0F	49,17	62,50	52,32	45,09
	A1G0F	4,10	2,37	2,57	4,07
	A2G1F	16,46	16,72	20,45	19,48
	A2G2F	2,26	1,94	3,10	2,70
	A2G1	0,12	0,23	0,21	0,11

В контрольных клеточных линиях с пустым вектором A2G0F был преобладающим видом (49,17%) среди восьми сложных оцениваемых видов гликанов за которым следовали A2G1F (16,46%) и другие сложные гликоформы. Аналогичную тенденцию в отношении процента различных видов наблюдали в M1M2 и M1M2S. Тем не менее, в случае клеточных линий M1M2 количество гликоформы A2G0F была значительно увеличено на 27% (уровень значимости $p=0,0076$) по сравнению с контрольным образцом. Из этого следует, что со сверхэкспрессией Mgat2 имело место эффективное преобразование гибрида гликана (A1G0M5) в A2G0 и, следовательно, больше субстрата было доступно для фукозилтрансферазы8 (FUT8), чтобы сделать больше продукта A2G0F по сравнению с контрольными клеточными линиями. Хотя сверхэкспрессия Slc35a2, по-видимому, не приводит к значительному повышению уровней сложных гликанов в этом эксперименте, эти результаты свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия Mgat1 и Mgat2 может повысить преобразование НМ гликанов до сложных гликоформ, тем самым снижая уровень НМ.

Пример 3.

Клетки-хозяева СНО трансфенировали с помощью либо Mgat1, либо Mgat2 по отдельности или совместно трансфенировали с использованием обоих экспрессирующих векторов Mgat1 и Mgat2. После восстановления жизнеспособности этих клеток в селективной среде более чем на 80%, они были одноклеточно клонированы с использованием проточной цитометрии. В общей сложности 291 клон анализировали на экспрессию генов Mgat1 и Mgat2. Из них, 48 клонов, экспрессирующих уровни Mgat1 и Mgat2 выше уровней, обнаруженных в рекомбинантной клеточной линии СНО, экспрессирующих человеческие моноклональные антитела с традиционно низким уровнем (т.е., <5%) гликанов высокоманнозного типа (мкАТ А), были отобраны на основании хорошего роста и жизнеспособности.

Все 48 клонов выращивали в течение по меньшей мере 60 ВУП (время удвоения популяции) и в течение этого промежутка времени уровни экспрессии мРНК Mgat1 и Mgat2 анализировали в трех различных временных точках. Шестнадцать клонов были отобраны на основании стабильных уровней экспрессии соответствующей мРНК. Для дальнейшей оценки трансфенируемости этих клонов, все 48 клонов были трансфенированы с использованием вектора содержащего зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ),, в структурном анализе комплементации фрагментов белка по существу как описано Remy и Michnick (1999), Proc. Natl. Acad. Sci., 96:5394-5399.

Семь клонов, проявляющие самую высокую эффективность трансфекции, были отобраны для дальнейшего анализа. Кратное изменение мРНК Mgat1 и Mgat2 лучших семи клонов по сравнению с контролем СНО продемонстрировано в табл. 6.

Таблица 6. Среднее кратное повышение уровней транскриптов Mgat1 и Mgat2

Имя клона	Описание	Кратное повышение уровня Mgat1 по сравнению с СНО	Кратное увеличение уровня Mgat2 по сравнению с СНО
18E11	Высокая Mgat2	0,6	30,4
2B8	Средние Mgat1	5,9	0,9
31H7	Высокие Mgat1 и Mgat2	12,4	6,3
38C2	Высокая Mgat1	15,6	0,9
45F2	Высокая Mgat1	20,2	0,7
61A9	Высокая Mgat2	0,5	12,7
63C5	Высокие Mgat1 и Mgat2	14,7	15,6
Контроль		0,5	1,5

Моноклональные антитела, которые традиционно показали высокие уровни (т.е., > 15%) гликанов высокоманнозного типа (мкАТ С), использовали для трансфекции в сконструированные клетки-хозяева со сверхэкспрессией Mgat1 и/или Mgat2 или контрольные несконструированные клетки-хозяева СНО. Стабильные пуллы были созданы и были выбраны для дальнейшего исследования в течение 10-суточного производственного цикла с подпиткой, как это было описано ранее. Профили гликоформ и титр секретируемого рекомбинантным мкАТ С оценивали для каждой сверхэкспрессирующей клеточной линии. Значительно более низкий уровень высокоманнозных гликанов был обнаружен в хозяине 38C2 по сравнению с контрольными хозяином для мкАТ С, не влияющий на продуктивность (т.е. титр). Результаты приведены в табл. 7; значения отражают 10-суточный титр и уровни гликанов, полученные количественным анализом полунепрерывного производства с подпиткой.

Таблица 7. Титр и профили гликозилирования неамплифицированных клонов, экспрессирующих мкАТ С

Имя клона	Титр	% A2G0F	% A2G1F	% A2G2F	% A-fuco	% M5	НМ	p-значение для НМ
18E11	0,45	63,4	18,43	2,17	85,7	4,83	5,83	0,91
2B8	0,77	63,4	22,5	2,9	91,7	1,4	2,5	0,11
31H7	0,9	63,37	22,9	3,03	90,7	3,5	4,77	0,54
38C2	0,76	63,87	23,67	2,93	92,6	0,8	1,77	0,04*
45F2	0,79	60,77	20,5	2,4	87,8	2,07	5,6	0,84
61A9	0,7	63,33	22,43	2,77	90,1	3,93	4,93	0,6
63C5	0,61	65,53	21,4	2,53	91,7	1,77	2,63	0,09
Контроль	0,82	53,85	26,3	3,7	88,2	6,05	7,3	1

Точно так же 150 нмоль/л и 300 нмоль/л амплифицированные пуллы были получены и проанализированы в количественном анализе 10-суточного полунепрерывного производства с подпиткой. В случае со 150 нмоль/л пулами, все сверхэкспрессирующие клетки-хозяева показали значительно сниженный % высокоманнозных гликанов по сравнению с контрольными клетками-хозяевами, не влияющий на титр. Результаты приведены в табл. 8 и 9.

Таблица 8. Титр и профили гликозилирования 150 нмоль/л амплифицированных клонов, экспрессирующих мКАТ С

ПКА	Различные гликоформы	контроль	2B8	31H7	38C2	45F2
Титр		2,82	3,53	3,72	3,39	2,78
Высокоманнозные гликаны (HM)	HM	16,2	5,55	10,6	4,17	6,73
	M8a	0,45	0,45	0,6	0,5	0,5
	M8b	0,55	0,3	0,33	0,3	0,47
	M7	1,4	1,05	0,8	1,07	1,77
	M6	1,9	1,7	0,93	1,77	2,57
	M5	11,85	2	7,93	0,53	1,43
Гибрид	Гибрид	13,75	13,2	12,37	12,93	11,75
Комплекс	A1G1F	1,3	1,15	0,13	1,2	0,87
	A1G0	0,8	4,7	0,83	4,7	7,2
	A2G0	0,75	0,8	2,03	0,77	0,67
	A2G0F	49,25	57,35	60,03	59,9	55,63
	A1G0F	4,15	5,25	2,7	3,53	6,9
	A2G1Fa	9,05	7,75	7,73	8,4	6,33
	A2G2F	2,15	1,6	1,6	1,77	1,2
р-значение для HM по сравнению с контролем		1	0,0008*	0,0475*	0,0001*	0,0011*
ПКА	Различные гликоформы	контроль	61A9	63C5	18E11	
Титр		2,82	2,53	2,99	3,25	
Высокоманнозные гликаны (HM)	HM	16,2	6,97	6,97	10,13	
	M8a	0,45	0,43	0,63	0,47	
	M8b	0,55	0,2	0,6	0,15	
	M7	1,4	0,4	1,87	0,47	
	M6	1,9	0,43	2,5	0,57	
	M5	11,85	5,6	1,4	8,53	
Гибрид	Гибрид	13,75	12,44	11,66	10,41	
Комплекс	A1G1F	1,3	0,1	0,67	0,23	
	A1G0	0,8	0,5	3,9	0,9	
	A2G0	0,75	1,67	1,27	5,1	
	A2G0F	49,25	63,57	60,73	62,07	
	A1G0F	4,15	2,13	3,5	1,87	
	A2G1Fa	9,05	8,5	7,13	6,07	
	A2G2F	2,15	1,93	1,37	1,33	
р-значение для HM по сравнению с контролем		1	0,0013*	0,0013*	0,0301*	

*Указывает на значимые значения р.

При 300 ннмоль/л амплификации было обнаружено значительное снижение уровней высокоманнозных гликанов в пяти пулах (61A9, 45F2, 63C5, 38C2, и 2B8), как показано в табл. 9.

Таблица 9: Титр и профили гликозилирования 300 нномль/л амплификации мк АТ С

ПКА	Различные гликоформы	Контроль	2B8	31H7	38C2	45F2
Титр		2,59	4,39	4,63	4,69	3,48
Высоко-маннозные гликаны (HM)	HMN	19,6	6,2	11,27	6,27	8
	M8a	0,5	0,5	0,67	0,6	0,5
	M8b	0,5	0,4	0,4	0,5	0,8
	M7	1,4	1,25	0,97	1,8	2,8
	M6	1,8	1,8	1,13	2,77	3,6
	M5	15,4	2,3	8,17	0,67	0,3
Гибрид	Гибрид	12,4	13,15	11,93	13,13	11,6
Комплекс	A1G1F	1,1	1,2	0,1	1,4	0,8
	A1G0	1,1	4,35	0,87	5,27	6,85
	A2G0	0,8	1,15	2,07	0,9	0,75
	A2G0F	48,8	57,15	60,13	56,83	55,15
	A1G0F	4,7	4,7	2,77	4,13	6,85
	A2G1Fa	7,6	7,7	7,17	7,53	5,75
	A2G2F	1,6	1,6	1,47	1,5	1,05
р-значение для НМ по сравнению с контролем		1	0,0119*	0,1039	0,0083*	0,0283*
ПКА	Различные гликоформы	Контроль	61A9	63C5	18E11	
Титр		2,59	2,53	3,4	3,98	
Высоко-маннозные гликаны (HM)	HMN	19,6	9,13	7,83	13,47	
	M8a	0,5	0,5	0,87	0,47	
	M8b	0,5	0,23	0,8	0,2	
	M7	1,4	0,5	2,1	0,63	
	M6	1,8	0,63	2,77	0,8	
	M5	15,4	7,2	1,23	11,4	
Гибрид	Гибрид	12,4	11,6	12,17	9,75	
Комплекс	A1G1F	1,1	0,1	0,7	0,2	
	A1G0	1,1	0,73	3,23	1,2	
	A2G0	0,8	2	1,13	4,7	
	A2G0F	48,8	62,8	59,87	60,23	
	A1G0F	4,7	2,77	3,33	2,53	
	A2G1Fa	7,6	7,2	7,03	5,07	
	A2G2F	1,6	1,53	1,43	0,97	
р-значение для НМ по сравнению с контролем		1	0,0359*	0,0185*	0,2835	

*Указывает на значимые значения р.

Эти результаты указывают на то, что клетки-хозяева, трансформированные для сверхэкспрессии из Mgat1 и/или Mgat2 могут быть использованы для получения рекомбинантных белков, которые имеют повышенную конверсию НМ гликанов в сложные гликоформы, и, следовательно, более низкие уровни НМ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения содержания высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка, получаемых путем культивирования клеток млекопитающих, включающий модификацию клетки-хозяина млекопитающего для сверхэкспрессии по меньшей мере одного белка, вовлеченного в путь N-гликозилирования, посредством трансфекции в указанную клетку гена Mgat1, кодирующего N-ацетилглюкозаминилтрансферазу-1; гена Mgat2, кодирующего N-ацетилглюкозаминилтрансферазу-2; гена Slc35a2, кодирующего переносчик УДФ-галактозы; или их комбинации, и культивирование клетки-хозяина млекопитающего, причем клетка-хозяин млекопитающего экспрессирует рекомбинантный белок, у которого содержание высокоманнозных гликоформ снижено до 10% или ниже по сравнению с рекомбинантным белком, полученным из клетки-хозяина млекопитающего до указанной трансфекции.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что клетка-хозяин млекопитающего трансфицирована двумя или более генами, выбранными из Mgat1 и Mgat2; Mgat1 и Slc35a2; Mgat2 и Slc35a2; и Mgat1, Mgat2 и Slc35a2.

3. Способ по п.1 или 2, где клетка-хозяин млекопитающего трансфицирована генами Mgat1 и Mgat2.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что клетка-хозяин млекопитающего сначала была трансфицирована геном рекомбинантного белка и затем трансфицирована геном белка, вовлеченного в путь N-гликозилирования.

5. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что клетка-хозяин млекопитающего сначала была трансфицирована геном белка, вовлеченного в путь N-гликозилирования, и затем трансфицирована геном рекомбинантного белка.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что рекомбинантный белок представляет собой белок, содержащий Fc-область антитела.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что рекомбинантный белок выбран из Fc-гибридного белка, антитела, иммуноглобулина и пептид-ассоциированного антитела.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что виды высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка выбраны из маннозы 5 (Man5); маннозы 6 (Man6); маннозы 7 (Man7); маннозы 8, в том числе маннозы 8a и 8b (Man8a и 8b), и маннозы 9 (Man9) и их комбинации.

9. Способ по п.7 или 8, отличающийся тем, что содержание высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка составляет не более 5%.

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что культура клеток млекопитающих представляет собой периодическую культуру с подпиткой или перфузионную культуру.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что культуру клеток поддерживают перфузией с использованием переменного тангенциального потока (ATF).

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что перфузию начинают примерно на 1-9 сутки культивирования клеток.

13. Способ по п.11, отличающийся тем, что перфузию начинают примерно на 3-7 сутки культивирования клеток.

14. Способ по любому из пп.11-13, отличающийся тем, что перфузию начинают, когда клетки достигают фазы продуцирования.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что перфузию с использованием переменного тангенциального потока проводят посредством ультрафильтра или микрофильтра.

16. Способ по п.10, отличающийся тем, что культуру клеток поддерживают периодической подпиткой.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что культуру клеток подпитывают три раза в процессе культивирования.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что культуру клеток подпитывают между 2 и 4 сутками, между 5 и 7 сутками и между 8 и 10 сутками.

19. Способ по п.16, отличающийся тем, что культуру клеток подпитывают четыре раза в процессе культивирования.

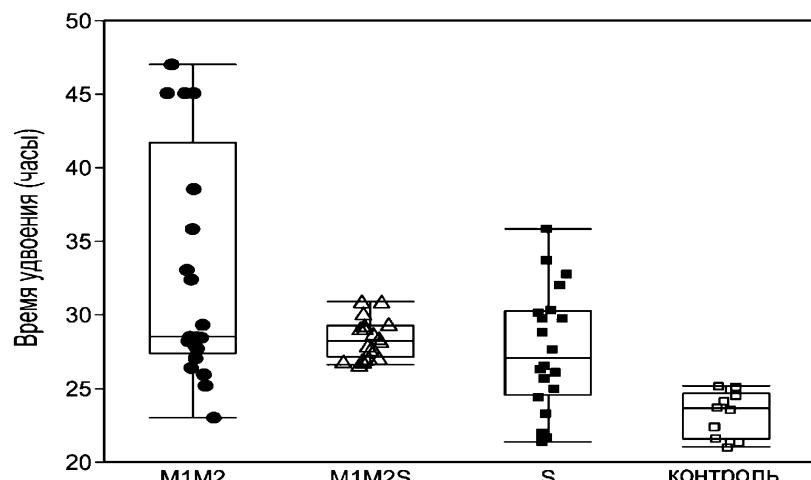
20. Способ по п.19, отличающийся тем, что культуру клеток подпитывают между 2 и 4 сутками, между 5 и 6 сутками, между 7 и 8 сутками и между 8 и 10 сутками или позже.

21. Способ по любому из пп.1-20, отличающийся тем, что культуру клеток млекопитающих получают путем инокуляции в биореактор по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ клеток/мл в бессывороточной культуральной среде.

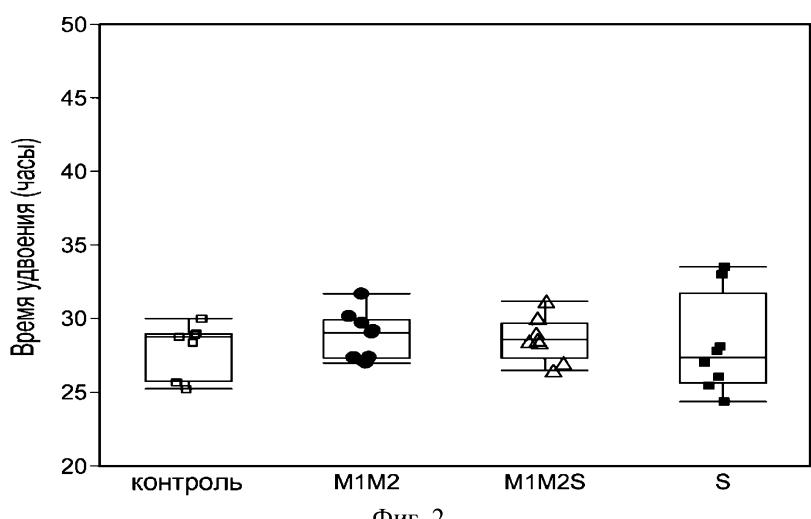
22. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что клетки млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомяка (CHO).

23. Способ по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что дополнительно включает сбор рекомбинантного белка.

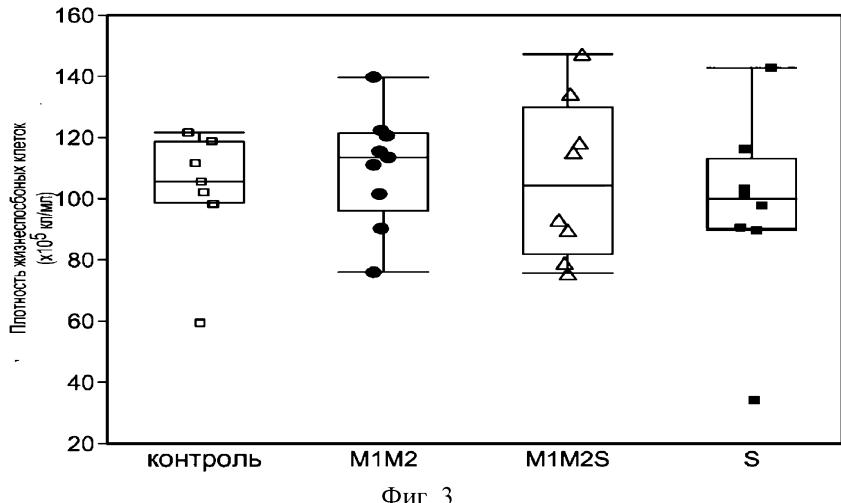
24. Способ по п.23, отличающийся тем, что дополнительно включает стадию очистки собранного рекомбинантного белка.



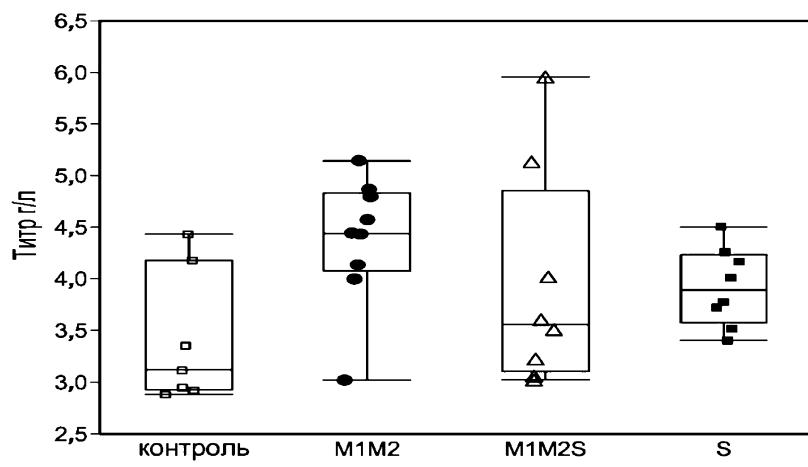
Фиг. 1



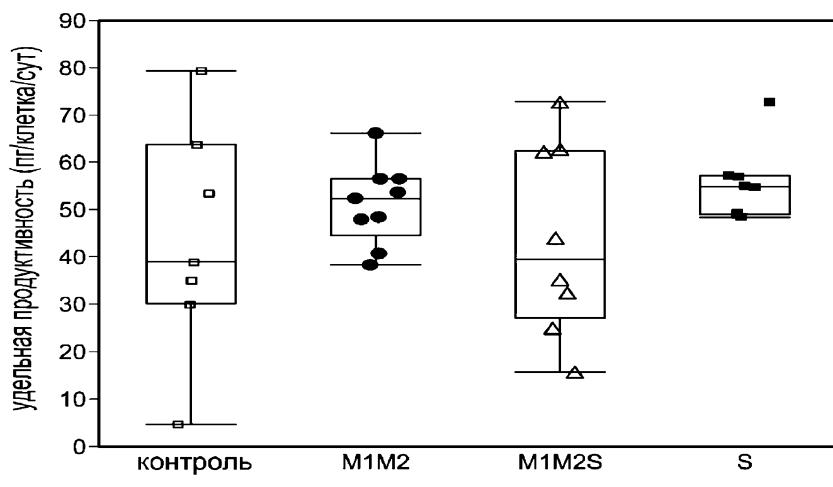
Фиг. 2



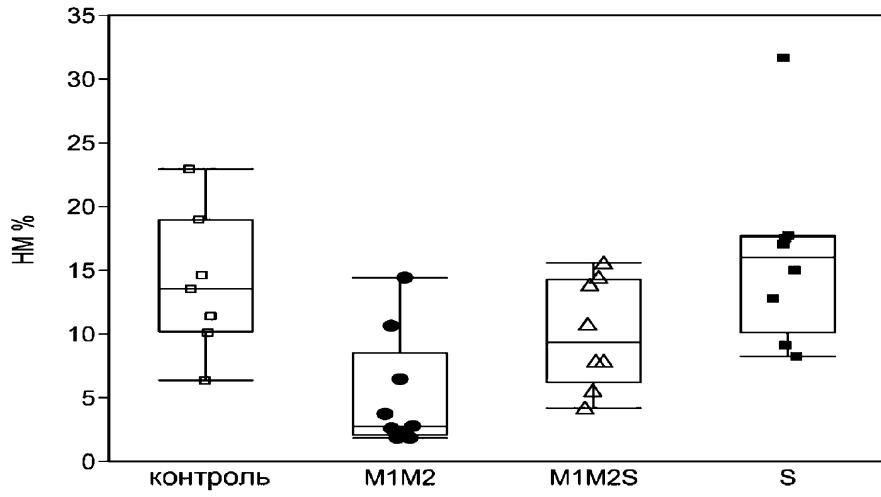
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

