

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034039**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.12.20**

**(21)** Номер заявки  
**201590068**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.06.20**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/90** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)

---

**(54) КЛЕТКА-ХОЗЯИН, СПОСОБНАЯ К САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНТЕГРАЦИИ, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 61/663,147; 12185330.3

**(32)** 2012.06.22; 2012.09.21

**(33)** US; EP

**(43)** 2015.04.30

**(86)** PCT/EP2013/062859

**(87)** WO 2013/190032 2013.12.27

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЛОНЗА БАЙОЛОДЖИКС ПиЭлСи**  
**(GB); ПФАЙЗЕР ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Ранс Джеймс, Янг Роберт (GB),**  
**Агостино Майкл Дж., Моффат Марк,**  
**Чжан Линь, Чжан Баохун (US)**

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

**(56)** DATABASE Genbank [Online] 10 May 2003 (2003-05-10), XP002688692, Database accession no. AC095642, abstract

DATABASE Genbank [Online] 3 July 2004 (2004-07-03), XP002688693, Database accession no. AC118414, abstract

BECKER JENNIFER ET AL.: "Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing", December 2011 (2011-12), JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, VOL. 156, NR. 3, PAGE(S) 227-235, XP002688721, ISSN: 0168-1656 (print), page 228, left-hand column, paragraph 3

ZHANG C. ET AL.: "Characterization of a bipartite recombinant adeno-associated viral vector for site integration", September 2007 (2007-09), HUMAN GENE THERAPY, VOL. 18, NR. 9, PAGE(S) 787-797, XP002688694, ISSN: 1043-0342, page 790, right-hand column, paragraph 3

ANDERSEN VIBEKE ET AL.: "Assessment of heterogeneity between European Populations: a Baltic and Danish replication case-control study of SNPs from a recent European ulcerative colitis genome wide association study", 1 October 2011 (2011-10-01), BMC MEDICAL GENETICS, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, PAGE(S) 9PP, XP009165387, ISSN: 1471-2350, page 2, right-hand column, paragraph 3

NG MAGGIE C.Y. ET AL.: "Genome-wide association of BMI in African Americans", 1 March 2012 (2012-03-01), OBESITY, PAGE(S) 622-627, XP009165386, table 2

---

**(57)** Изобретение относится к клеткам-хозяевам, способным к стабильной и высокопродуктивной сайт-специфической интеграции (SSI), например к клеткам-хозяевам, происходящим от клеток яичника китайского хомячка (CHO), а также к способам продуцирования и применения таких клеток.

---

**B1**

**034039**

**034039**

**B1**

Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, способным к стабильной и высокопродуктивной сайт-специфической интеграции (SSI), например к клеткам-хозяевам, происходящим от клеток яичника китайского хомячка (CHO), а также к способам продуцирования и применения таких клеток.

Возрастающее число кандидатов на биологические биофармацевтические средства, находящихся на стадии разработки, указывает на необходимость разработки надежных и быстрых высокоэффективных технологий, поскольку стандартные методы получения коммерчески доступных клеточных линий требуют много времени и проведения трудоемких и итеративных операций. В процессе конструирования и отбора антитело-продуцирующих клеточных линий обычно получают клеточные линии с широкими профилями экспрессии, роста и стабильности. Такая вариабельность может быть вызвана природной нестабильностью генома млекопитающих. Она может также возникать из-за стохастической регуляции генных сетей или изменения количества рекомбинантного белка, продуцируемого в результате случайной геномной интеграции трансгена, которая обусловлена, главным образом, "нестабильным (мозаичным) типом эффекта положения".

Из-за вариабельности и низкой частоты (1 на 10000) геномной интеграции для скрининга совокупности множества трансфектантов на эти редкие события и для выделения коммерчески ценной клеточной линии-продуцента (например, в комбинации с хорошим ростом, высокой продуктивностью и стабильностью продуцирования, а также с желаемым профилем полученного продукта) требуются значительные материальные затраты и много времени. Эта ситуация может быть улучшена путем обогащения популяции клеточных линий высокопродуктивными клеточными линиями с использованием систем строгого отбора, таких как система экспрессии гена GS (глутаминсинтазы). Так, например, в недавно проведенном исследовании >30% клеточных линий произвольно отобранной панели, состоящей из 175 mAb (моноклональное антитело) продуцирующих клеточных линий GS-CHOK1SV (система экспрессии гена GS<sup>TM</sup>, Lonza) продуцируют  $\geq 1$  г/л mAb в способе приготовления партии клеток в шейкерных колбах с подпиткой. CHOK1SV экспрессируют эндогенный фермент GS, поэтому позитивные трансфектанты могут быть получены с использованием среды, не содержащей глутамин, и селективной среды, содержащей метионин-сульфоксимин (MSX). Хотя такие системы отбора являются достаточно эффективными, однако потребность в скрининге в условиях более строгого и тщательного отбора остается актуальной. Таким образом, конструирование клеточных линий, имеющих промышленное значение, представляет собой трудоемкий и длительный процесс. Эти клеточные линии должны быть отобраны не только на позитивный рост и продуктивность, они должны также быть клонированы, и в основном должны продуцировать продукт соответствующего качества в процессе промышленного производства. Кроме того, с экономической точки зрения генерированные клеточные линии должны обладать соответствующей продуктивностью во многих последующих клеточных генерациях. Для этого желательно получить такие высокопродуктивные клеточные линии, которые имели бы положительные параметры роста при минимальном числе стадий скрининга и которые, в каждом случае, продуцировали бы новый представляющий интерес белок, например экспрессировали бы новое моноклональное антитело.

Технической проблемой, на решение которой направлено настоящее изобретение, является устранение вышеуказанных недостатков, в частности получение предпочтительно простым и эффективным способом высокопродуктивных клеточных линий, характеризующихся высокой стабильностью, позитивным ростом и продуктивностью, в частности клеточных линий, характеризующихся непрерывной продуктивностью за период длительного культивирования и продуцирования.

Настоящее изобретение позволяет решить указанную техническую проблему согласно идее, изложенной в независимых пунктах формулы изобретения.

В частности, настоящее изобретение позволяет решить указанную техническую проблему путем получения клеток-хозяев с сайтом специфической интеграции (SSI), содержащих эндогенный ген Fer1L4, где экзогенная нуклеотидная последовательность интегрирована в указанном гене Fer1L4. В некоторых вариантах осуществления изобретения эта экзогенная нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере одну представляющую интерес генную кодирующую последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенная нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайты-мишени для рекомбинации фланкируют по меньшей мере одну представляющую интерес генную кодирующую последовательность. В других вариантах осуществления изобретения сайты-мишени для рекомбинации являются смежными по меньшей мере с одной представляющей интерес генной кодирующей последовательностью и не фланкируют эту последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения такая представляющая интерес генная кодирующая последовательность содержит по меньшей мере один селективный маркерный ген.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения авторами настоящего изобретения было высказано предположение, что экзогенные нуклеотидные последовательности, интегрированные в эндогенный ген Fer1L4, представляют собой два сайта-мишени для рекомбинации, фланкирующие по меньшей мере одну представляющую интерес генную кодирующую последовательность, предпочтительно по меньшей мере один селективный маркерный ген, то есть это означает, что один первый сайт-мишень для рекомбинации локализован перед 5'-концом, а один второй сайт-мишень для рекомбинации локализован

за 3'-концом по меньшей мере одной представляющей интерес генной кодирующей последовательности, предпочтительно по меньшей мере одного селективного маркерного гена.

Предпочтительно представляющей интерес генной кодирующей последовательностью может быть нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес белок, например антитело, антиген, фермент, детектируемый белок, например флуоресцентный белок, такой как белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра; гормон, фактор роста, рецептор, гибридный белок или белок с селективной функцией. Указанная нуклеотидная последовательность может быть функционально присоединена по меньшей мере к одному регуляторному элементу, такому как промотор. Предпочтительно представляющей интерес генной кодирующей последовательностью является селективный маркерный ген.

В своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к SSI-содержащей клетке-хозяину согласно изобретению, где сайтом-мишенью для рекомбинации является сайт FRT (мишень для рекомбинации FLP). В предпочтительном варианте настоящего изобретения сайтом FRT является сайт FRT дикого типа, а именно сайт F.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения сайтом FRT является мутантный сайт FRT, предпочтительно сайт F5, например сайт, описанный в публикации Schlacke and Bode (1994) *Biochemistry* 33:12746-12752.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения представляющая интерес генная кодирующая последовательность, например селективный маркерный ген, фланкирована у своего 5'-конца сайтом FRT дикого типа, а у своего 3'-конца - мутантным сайтом FRT.

В контексте настоящего изобретения термин "сайты-мишени для рекомбинации, фланкирующие по меньшей мере одну представляющую интерес генную кодирующую последовательность", означает сайты-мишени для рекомбинации, локализованные со стороны 5'- и 3'-концов по отношению к указанной представляющей интерес генной кодирующей последовательности, то есть это означает, что один сайт-мишень расположен со стороны 5'-конца, а другой сайт-мишень расположен со стороны 3'-конца по отношению к представляющей интерес генной кодирующей последовательности. Эти сайты-мишени для рекомбинации могут быть локализованы непосредственно у представляющей интерес генной кодирующей последовательности или на определенном расстоянии от этой последовательности.

Фланкирующие последовательности, в частности фланкирующие сайты-мишени для рекомбинации, находятся в прямой или обратной ориентации, предпочтительно оба они находятся в прямой или обратной ориентации.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения сайтом-мишенью для рекомбинации является сайт lox.

В случае, если сайтом-мишенью для рекомбинации является сайт FRT, то для осуществления события кроссинговера или рекомбинации клеткам-хозяевам требуется присутствие и экспрессия FLP (FLP-рекомбиназы). В случае, если сайтом-мишенью для рекомбинации является сайт lox, то клеткам-хозяевам требуется присутствие и экспрессия Cre-рекомбиназы.

В обоих случаях, присутствие и экспрессия FLP- или Cre-рекомбиназы могут быть достигнуты, например, путем введения экзогенных нуклеотидных последовательностей, кодирующих FLP-или Cre-рекомбиназу, в клетку-хозяина, в которой могут экспрессироваться указанные нуклеотидные последовательности.

Таким образом, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, предпочтительно к клеточной линии-хозяину, в которую была введена экзогенная нуклеотидная последовательность, например по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации, в частности сайты FRT, и/или по меньшей мере одну представляющую интерес генную кодирующую последовательность в предварительно определенную "горячую точку", а именно в ген *Fer1L4*, что будет, в целом, обеспечивать рост, продуктивность и стабильность. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия представляющей интерес генной кодирующей последовательности в описанной здесь SSI-содержащей клетке-хозяине является стабильной по меньшей мере в 70, 100, 150, 200 или 300 поколениях. Экспрессия является "стабильной", если за определенный период времени она снижается менее чем на 30% или сохраняется на том же уровне или на более высоком уровне. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия является стабильной, если за определенный период времени волюметрическая продуктивность снижается менее чем на 30% или сохраняется на том же уровне или на более высоком уровне. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанная здесь SSI-содержащая клетка-хозяин продуцирует по меньшей мере 1,5, 2, 3, 4 или 5 г/л продукта экспрессии представляющей интерес генной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь SSI-содержащие клетки, в частности клеточные линии, являются стабильными, то есть они могут сохраняться в культуре без какого-либо отбора, таким образом, представленные здесь клеточные линии с большей вероятностью будут разрешены к применению Регуляторными органами. С экономической точки зрения настоящее изобретение позволяет разработать быстрый и недорогой способ получения клеточных линий, поскольку на различных стадиях данного способа можно будет проводить скрининг меньшего числа клеточных линий благодаря предполагаемой высокой продуктивности описанных здесь клеточных

линий. Следовательно, могут быть разработаны более эффективные кандидаты на биофармацевтические средства, например моноклональные антитела-кандидаты (mAb) против данной мишени или несколько кандидатов против множества мишеней, по сравнению со средствами, полученными стандартным способом. В конечном счете такой препарат может быть более эффективным для пациента за счет более быстрого достижения клинического эффекта от представляющих интерес белков, предпочтительно терапевтических mAb.

В контексте настоящего изобретения термин "горячая точка" означает положение, то есть сайт в геноме клетки-хозяина, обеспечивающий стабильную и гиперактивную экспрессию, предпочтительно транскрипционно активное продуцирование продукта, то есть белка, кодируемого представляющей интерес генной кодирующей последовательностью, в частности сайт, обеспечивающий эффективное и стабильное продуцирование белка, кодируемого представляющей интерес генной кодирующей последовательностью, где представляющая интерес генная кодирующая последовательность предпочтительно будет интегрироваться в указанном положении после ее переноса в клетку-хозяина.

В контексте настоящего изобретения термин "сайт" означает нуклеотидную последовательность, в частности определенный нуклеотидный фрагмент, то есть нуклеотидную последовательность определенной длины, предпочтительно определенный нуклеотидный фрагмент, представляющий собой часть более крупного нуклеотидного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт, например сайт, который не является "горячей точкой", представляет собой часть генома. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт, например сайт-мишень для рекомбинации, вводят в геном. "Сайт-мишень для рекомбинации" представляет собой нуклеотидный фрагмент, который вместе с рекомбиназой необходим для осуществления нацеленной рекомбинации и определения локализации такой рекомбинации.

В контексте настоящего изобретения термин "клетка-хозяин", также называемый далее "клеткой-реципиентом", означает клетку, содержащую экзогенную нуклеотидную последовательность, которая предпочтительно стабильно интегрируется в ее геном.

В контексте настоящего изобретения термин "клетка" предпочтительно означает клетку млекопитающего, в частности клетку грызуна, предпочтительно клетку мыши, клетку хомячка, предпочтительно клетку китайского хомячка, предпочтительно клетку яичника китайского хомячка (CHO), предпочтительно клетку CHO-K1, а еще более предпочтительно клетку CHO-K1SV. Предпочтительной клеткой является человеческая клетка. Предпочтительной клеткой также является не-человеческая клетка.

В контексте настоящего изобретения термин "клетка" предпочтительно означает клетку клеточной линии. Термин "клеточная линия" предпочтительно означает стабильные иммортализованные клеточные линии.

В одном из вариантов осуществления изобретения термин "клетка" также означает первичную клетку.

В контексте настоящего изобретения термин "клетка-хозяин с сайтом специфической интеграции (SSI)" означает клетку-хозяина, содержащую экзогенные нуклеотидные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенные нуклеотидные последовательности включают сайты-мишени для рекомбинации, которые обеспечивают сайт-специфическую интеграцию экзогенных нуклеотидных последовательностей, что тем самым позволяет предварительно определить локализованную и направленную интеграцию нужных нуклеотидных последовательностей в нужном участке генома клетки-хозяина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин, содержащая сайт специфической интеграции, способна осуществлять нацеленную интеграцию представляющих интерес генных кодирующих последовательностей. Более предпочтительно клетка-хозяин, содержащая сайт специфической интеграции, способна осуществлять нацеленную интеграцию представляющих интерес генных кодирующих последовательностей посредством опосредуемого рекомбинацией кластерного обмена (RMCE). При этом предпочтительно, чтобы такой способ позволял вводить только одну функциональную копию генной кодирующей последовательности, предпочтительно только одну копию представляющей интерес генной кодирующей последовательности в предварительно определенный локус. Предпочтительно, чтобы при осуществлении такого способа не происходило совместное введение в клетку-хозяина векторных последовательностей, например прокариотических векторных последовательностей.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения в SSI-содержащую клетку-хозяина вводят две функциональные копии представляющей интерес генной кодирующей последовательности.

В контексте настоящего изобретения термин "селективный маркерный ген" означает нуклеотидную последовательность, в частности генную кодирующую последовательность, а именно белок-кодирующую последовательность, также называемую далее областью, которая находится под регуляторным и функциональным контролем по меньшей мере одного регуляторного элемента, в частности промотора, где указанная белок-кодирующая область кодирует белок, обеспечивающий отбор клеток-хозяев, экспрессирующих указанный белок.

В контексте настоящего изобретения термин FRT означает мишень распознавания FLP. FRT пред-

ставляет собой нуклеотидную последовательность длиной в 34 пары оснований, которая используется для осуществления технологии сайт-направленной рекомбинации, позволяющей проводить модификацию ДНК организма в регулируемых условиях *in vivo*. FRT связывается с FLP-рекомбиназой (FLP), которая затем расщепляет указанную последовательность, что позволяет осуществлять рекомбинацию нуклеотидных последовательностей, интегрированных в область между двумя сайтами FRT. Для RMCE необходимы два события кроссинговера, опосредуемые двумя фланкирующими последовательностями-мишенями для рекомбиназы, одна из которых находится у 5'-конца, а другая у 3'-конца обмениваемого кластера. Кроссинговер может происходить между двумя идентичными сайтами FRT. При использовании сайтов FRT также необходимы экспрессия и присутствие FLP-рекомбиназы. Вся система, также называемая здесь "FRT/FLP", описана в публикации Seibler and Bode, *Biochemistry* 36 (1997), pages 1740-1747, и Seibler et al., *Biochemistry* 37 (1998), pages 6229-6234.

В контексте настоящего изобретения ген Fer1L4 представляет собой ген Fer1L4 дикого типа, все его изоформы и все его гомологи, в частности, если эти гомологи имеют последовательность, которая по меньшей мере на 40, по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98, по меньшей мере на 99 или по меньшей мере на 99,5% гомологична последовательности гена Fer1L4 дикого типа, предпочтительно по всей длине последовательности гена Fer1L4 дикого типа, более предпочтительно гена Fer1L4 хомячка дикого типа, еще более предпочтительно гена, имеющего координаты 1176191-1781992 в коллекции NCBI с регистрационными номерами NW 003613833 или JH000254.1, а еще более предпочтительно гена Fer1L4 CHO дикого типа или его укороченной формы.

Наиболее предпочтительно ген Fer1L4 дикого типа, присутствующий в SSI-содержащих клетках-хозяевах согласно изобретению, характеризуется, во-первых, наличием 5'-сайта интеграции 5'-локализованной фланкирующей последовательности, расположенной между экзонами 39 и 40, и во-вторых, наличием 3'-сайта интеграции 3'-локализованной фланкирующей последовательности, расположенной между экзонами 28 и 29. Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения интеграция экзогенных последовательностей предусматривает включение частей эндогенного гена Fer1L4, предпочтительно области, охватывающей экзоны 28-40 включительно. В некоторых вариантах осуществления изобретения в SSI-содержащей клетке-хозяине по меньшей мере часть гена Fer1L4 делегирована.

В настоящем изобретении "гомологами" или "гомологичными последовательностями" являются нуклеотидные последовательности, которые имеют вышеуказанную идентифицированную последовательность, гомологичную конкретно указанной сравниваемой последовательности, например последовательности гена Fer1L4 CHO дикого типа или его частей, например SEQ ID No. 7, 8 или 9.

В контексте настоящего изобретения термин "гомология последовательностей" означает степень идентичности или сходства двух последовательностей, определенную после сопоставления последовательностей путем их выравнивания для максимизации сходства между выровненными нуклеотидами, которое зависит от числа идентичных нуклеотидов, общего числа нуклеотидов и от присутствия и длины пробелов при выравнивании этих последовательностей. Для определения сходства последовательностей используются различные алгоритмы и компьютерные программы со стандартными параметрами.

Предпочтительно гомологию последовательностей измеряют с использованием программы BLASTn для последовательностей нуклеиновых кислот, которая имеется в Национальном центре биотехнологической информации ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) и описана, например, в публикациях Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Gish & States (1993), *Nature Genet.* 3:266-272; Madden et al. (1996), *Meth. Enzymol.* 266: 131-141; Altschul et al. (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:33, 89-3402; Zhang et al. (2000), *J. Comput. Biol.* 7(1-2):203-14. Гомологию двух нуклеотидных последовательностей предпочтительно оценивают по нижеследующим параметрам алгоритма BLASTn: размер слова = 11; "штраф" за пробел-пропуск = -5; "штраф" за пробел-удлинение = -2; "премия" за соответствие = 1 и "штраф" за несоответствие = -3.

Таким образом, ген Fer1L4 может представлять собой сам ген Fer1L4 CHO, либо он может также представлять собой, например, человеческий ген Fer1L4, например ген Dysferlin (Fer1L1), Otoferlin (Fer1L2), Myoferlin (Fer1L3), Fer1L4, Fer1L5 или Fer1L6.

Предпочтительно ген Fer1L4 согласно изобретению может также представлять собой ген Fer1 *C. elegans* (NCBI Gene ID: 172659, WormBase: WBGene00001414) или любой другой член семейства ферлинов, где такое семейство в клетках млекопитающих состоит из шести членов. Ферлины способствуют слиянию сосудов, в частности слиянию мембран. Fer1 *C. elegans* необходим для слияния органелл с плазматической мембраной и для нормальной репродукции у червеобразных (Achanzar, W.E. & Ward, S., *J. Cell Sci.* 110 (1997), 1073-108; Washington, N.L. & Ward, S., *J. Cell Sci.* 119 (2006), 2552-2562).

Наряду с C-концевым "якорем", члены семейства ферлинов млекопитающих также содержат несколько (6 или 7) доменов C2 (Sutton R.B. et al. *Cell* 80 (1995), 929-38; Shao et al., *Science* 273 (1996), 248-251). Таким образом, гены, кодирующие домены C2, также рассматриваются здесь как гены, гомологичные гену Fer1L4 дикого типа согласно изобретению.

В контексте настоящего изобретения термины "экзогенный ген" или "экзогенная нуклеотидная последовательность" означают нуклеотидную последовательность, введенную в клетку-хозяина, например, стандартными методами генной инженерии, предпочтительно путем трансформации, электропорации или трансфекции, где такой ген и такая нуклеотидная последовательность не присутствовали в указанной клетке-хозяине до указанного введения. Такие последовательности также называются "трансгенными".

Термины "эндогенный ген" или "эндогенная нуклеотидная последовательность" означают нуклеотидную последовательность, происходящую от клетки-хозяина и присутствующую в этой клетке-хозяине, то есть не введенную в указанную клетку-хозяина извне.

Используемые здесь термины "нуклеотидная последовательность" или "полинуклеотид" предпочтительно означают нуклеиновые кислоты, а более предпочтительно ДНК или РНК.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения представляющей интерес генной кодирующей последовательностью, фланкированной по меньшей мере двумя сайтами-мишенями для рекомбинации, является селективный маркерный ген или генная последовательность, кодирующая антитело, например моноклональное антитело, производное антитела, гибридный белок, фермент или биологически активный белок, например фактор роста или пептидный гормон, G-CSF, GM-CSF, EPO, TPO, интерлейкин, интерферон и т.п., в частности фармацевтический или алиментарный функциональный белок. Предпочтительно представляющая интерес генная кодирующая последовательность является экзогенной для клетки-хозяина.

В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения представляющей интерес генной кодирующей последовательностью может быть также структурно или функционально определенная часть гена, кодирующая, например, фрагмент антитела, такой как его тяжелая или легкая цепь, или часть функционального белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющая интерес генная кодирующая последовательность может кодировать продукт экспрессии, содержащий структурно или функционально определенную часть полипептида, например дискретный домен, серию доменов или часть домена, такую как тяжелая или легкая цепь антитела или константная область антитела.

В своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к SSI-содержащей клетке-хозяину согласно изобретению, где селективным маркером является селективный маркер GS, селективный маркер гиромидин, селективный маркер пуромидин или селективный маркер тимидинкиназа.

В контексте настоящего изобретения селективный маркер GS, кодируемый маркерным геном GS, действует в системе маркеров GS. В соответствии с этим, в отсутствие глутамин-синтетазы (GS) активность играет главную роль в выживаемости клеток млекопитающих в культуре. Причем без добавления глутамин-синтетазы (GS) активность играет главную роль в выживаемости клеток млекопитающих в культуре. Причем без добавления глутамин-синтетазы (GS) активность играет главную роль в выживаемости клеток млекопитающих в культуре. Причем без добавления глутамин-синтетазы (GS) активность играет главную роль в выживаемости клеток млекопитающих в культуре. Что касается этих клеточных линий, то введенный в них маркерный ген GS может служить селективным маркером, позволяющим этим клеткам расти в среде, не содержащей глутамин-синтетазы (GS). Другие клеточные линии, такие как клеточные линии яичника китайского хомячка, экспрессируют GS в количестве, достаточном для их выживания без экзогенного глутамин-синтетазы (GS). В этих случаях ингибитор GS, то есть метионинсульфоксидин (MSX), может быть использован для ингибирования эндогенной GS-активности, в результате чего выживать могут только трансфектанты с добавленной GS-активностью.

В своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к SSI-содержащей клетке-хозяину согласно изобретению, где указанной клеткой-хозяином является клетка-хозяин CHO или клетка-хозяин CHO K1SV (Porter, A.J. et al., *Biotechnol Prog.* 26 (2010), 1455-1464).

В своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к SSI-содержащим клеткам-хозяевам, где экзогенные последовательности интегрированы в области, простирающейся от положения 1750049 (5'-сайта интеграции) до положения 1760965 (3'-сайта интеграции) (см. фиг. 7). Фланкирующие последовательности предпочтительно локализованы в положениях остова последовательности 1750049-1750870 (5'-конца, SEQ ID No.9, 822 п.о.) и 1758964-17 60965 (3'-конца, SEQ ID No. 7 и 8, 2000 п.о.) (см. фиг. 7).

В своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к SSI-содержащей клетке-хозяину согласно изобретению, где нуклеотидные последовательности гена Fer1L4, фланкирующие интегрированные экзогенные нуклеотидные последовательности, например, где по меньшей мере одна представляющая интерес генная кодирующая последовательность сама фланкирована у своих 5'- и 3'-концов одним сайтом-мишенью для рекомбинации, выбраны из группы, состоящей из SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9 и их гомологичных последовательностей.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения фланкирующие последовательности, гомологичные последовательностям, представленным в SEQ ID No. 7, 8 или 9, имеют последовательность, которая по меньшей мере на 40, по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98, по меньшей мере на 99 или по меньшей мере на 99,5% гомологична последовательностям областей гена Fer1L4 дикого типа, предпочтительно по всей его длине.

Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения SSI-содержащая клетка-хозяин согласно изобретению характеризуется наличием экзогенных нуклеотидных

последовательностей, а именно по меньшей мере одной представляющей интерес геномной кодирующей последовательностью, которая сама фланкирована у своих 5'- и 3'-концов одним сайтом-мишенью для рекомбинации, где по меньшей мере одна из нуклеотидных последовательностей SEQ ID No. 7 или 8 или гомологичных им последовательностей локализована у 3'-конца экзогенных нуклеотидных последовательностей, интегрированных в геном клетки-хозяина.

Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения SSI-содержащая клетка-хозяин согласно изобретению характеризуется наличием экзогенных нуклеотидных последовательностей, а именно по меньшей мере одной представляющей интерес геномной кодирующей последовательностью, которая сама фланкирована у своих 5'- и 3'-концов одним сайтом-мишенью для рекомбинации, где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID No. 9, или гомологичная ей последовательность локализована у 5'-конца экзогенных нуклеотидных последовательностей, интегрированных в геном клетки-хозяина.

Предпочтительно SSI-содержащая клетка-хозяин включает экзогенную нуклеотидную последовательность, а именно, по меньшей мере, представляющую интерес геномной кодирующую последовательность, которая сама фланкирована у своих 5'- и 3'-концов одним сайтом-мишенью для рекомбинации, который у своего 3'-конца фланкирован по меньшей мере одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID No. 7, 8 или гомологичных им последовательностей, а у своего 5'-конца фланкирован нуклеотидными последовательностями, представленными в SEQ ID No. 9, или гомологичными им последовательностями.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения указанные 5'- и/или 3'-фланкирующие последовательности SEQ ID No. 7-9 или гомологичная им последовательность локализованы непосредственно у 5'- или у 3'-конца или у 5'- и у 3'-конца сайта(ов)- мишени(ей) для рекомбинации, интегрированного(ых) в ген Fer1L4, и не имеют каких-либо встроенных между ними последовательностей.

В другом своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеотидной молекуле, предпочтительно к полинуклеотиду, включающему часть гена Fer1L4, например, содержащую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID No. 7-9, и гомологичных им последовательностей.

Особенно предпочтительной является выделенная нуклеотидная молекула, предпочтительно полинуклеотид, состоящий по меньшей мере из одной нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID No. 7-9, и гомологичных им последовательностей.

В другом своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к вектору, предпочтительно экспрессионному вектору, содержащему выделенную нуклеотидную молекулу согласно изобретению, в частности SEQ ID No. 7-9, или гомологичную им молекулу, и к трансфицированной клетке-хозяину, содержащей указанный вектор или указанную нуклеотидную молекулу.

Последовательности нуклеиновой кислоты, определяющие locus Fer1L4, то есть последовательность нуклеиновой кислоты гена Fer1L4, а именно нуклеотидная последовательность Fer1L4, в частности нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID No. 7-9, и гомологичных им последовательностей, были эмпирически идентифицированы по последовательностям, расположенным выше и ниже сайта интеграции конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей экспрессионный кластер клеточной линии, экспрессирующей репортерный белок на высоком уровне. Эти последовательности нуклеиновой кислоты согласно изобретению представляют собой последовательности с новыми функциями, ассоциированными с повышенной и стабильной экспрессией нуклеиновой кислоты, например экзогенной нуклеиновой кислоты, содержащей представляющую интерес геномную кодирующую последовательность, которая, очевидно, функционирует по механизму, отличающемуся от механизма функционирования ранее описанных cis-действующих элементов, таких как промоторы, энхансеры, locus-регулирующие области, область присоединения к скаффолду или области присоединения к матрице.

Нуклеотидные последовательности согласно изобретению, очевидно, не имеют каких-либо открытых рамок считывания (ОРС), поэтому маловероятно, что они кодируют белки-трансактиваторы. Эксперименты по трансфекции продемонстрировали, что последовательности согласно изобретению обладают некоторыми свойствами cis-действующих элементов. Активность последовательности согласно изобретению не детектировалась в анализах по временной трансфекции, поэтому последовательности согласно изобретению, очевидно, также отличаются от промоторов и энхансерных элементов, которые были детектированы этими методами.

Настоящее изобретение также относится к применению нуклеотидной последовательности Fer1L4, в частности нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID No. 7-9, и гомологичных им последовательностей, в векторе, более конкретно в экспрессионном векторе, в частности в не-RMCE экспрессионном векторе, содержащем по меньшей мере одну представляющую интерес геномную кодирующую последовательность, в

частности, для продуцирования клеточных линий предпочтительно рандомизированным методом, например для продуцирования клеточных линий, обладающих повышенной экспрессией, в частности для продуцирования клеточных линий-сверхпродуцентов предпочтительно с высокой частотой интеграции и предпочтительно с более высокой стабильностью продуцирования. Предпочтительно такое применение предусматривает трансфекцию клеток нуклеотидными последовательностями Fer1L4, идентифицированными выше, предпочтительно векторами, содержащими указанные нуклеотидные последовательности, и, в результате, получение стабильно трансфицированных клеточных линий.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу продуцирования клеток или клеточных линий, предпочтительно клеток или клеточных линий-сверхпродуцентов с высокой стабильностью продуцирования, где нуклеотидные последовательности Fer1L4, в частности нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID No. 7-9, и гомологичных им последовательностей, предпочтительно интегрированных в вектор, более предпочтительно в экспрессионный вектор, а еще более предпочтительно в не-RMCE экспрессионный вектор, вводят в клетки или клеточные линии, а затем отбирают и получают стабильно трансфицированные клетки или клеточные линии. Присутствие последовательностей локуса Fer1L4 или его частей, идентифицированных в настоящей заявке, оказывает цис-действие на представляющие интерес гены и тем самым повышает уровень экспрессии независимо от их интеграции в геноме. Предполагается, что клеточные линии, полученные таким рандомизированным способом, будут обладать более высокой стабильностью продуцирования.

Настоящее изобретение предпочтительно относится к применению нуклеотидной последовательности Fer1L4 в экспрессионном векторе для продуцирования стабильной клеточной линии или клетки или клеточной линии или клетки с высоким уровнем транскрипционной активности.

Настоящее изобретение предпочтительно относится к вышеупомянутому применению, где нуклеотидная последовательность Fer1L4 выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID No. 7-9, и гомологичных им последовательностей.

Настоящее изобретение предпочтительно относится к способу получения продукта представляющей интерес геномной кодирующей последовательности, где указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, полученной способом продуцирования клетки или клеточной линии согласно изобретению в подходящей среде, и выделение продукта из этой среды.

В своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к SSI-содержащей клетке-хозяину согласно изобретению, где экзогенные нуклеотидные последовательности включают по меньшей мере один сайт FRT дикого типа, предпочтительно по меньшей мере два сайта FRT дикого типа, фланкирующие по меньшей мере одну представляющую интерес геномную кодирующую последовательность, или по меньшей мере один мутантный сайт FRT, предпочтительно по меньшей мере два мутантных сайта FRT, фланкирующих по меньшей мере одну представляющую интерес геномную кодирующую последовательность. Наиболее предпочтительно экзогенные нуклеотидные последовательности представляют собой один сайт FRT дикого типа и один мутантный сайт FRT, фланкирующие по меньшей мере одну представляющую интерес геномную кодирующую последовательность. Особенно предпочтительно, чтобы представляющая интерес геномная кодирующая последовательность, предпочтительно селективный маркерный ген, была расположена между FRT дикого типа, предпочтительно локализованным со стороны 5'-конца по отношению к представляющей интерес геномной кодирующей последовательности, предпочтительно селективного маркерного гена, и мутантным сайтом FRT, предпочтительно локализованным со стороны 3'-конца по отношению к представляющей интерес геномной кодирующей последовательности, предпочтительно селективного маркерного гена. Такая предпочтительная конфигурация дает гарантию того, что опосредуемый рекомбинацией кластерный обмен будет всегда происходить в той же самой ориентации.

В своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к способу продуцирования SSI-содержащей клетки-хозяина согласно изобретению, где указанный способ включает последовательно проводимые стадии а) трансфекции клетки, предпочтительно содержащей эндогенный ген Fer1L4, первым вектором, включающим первый обмениваемый кластер, содержащий по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации, в частности сайты FRT, фланкирующие, по меньшей мере, первую представляющую интерес геномную кодирующую последовательность, предпочтительно кодирующую mAb; б) отбора трансфицированных клеток, которые содержат по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации, в частности сайты FRT, фланкирующие по меньшей мере одну первую представляющую интерес геномную кодирующую последовательность, интегрированную в эндогенный ген Fer1L4, и обнаруживают высокопродуктивное и стабильное продуцирование продукта первой представляющей интерес геномной кодирующей последовательности; в) трансфекции клеток, полученных в стадии (б), вторым вектором, содержащим второй обмениваемый кластер, включающий по меньшей мере два соответствующих сайта-мишени для рекомбинации, в частности сайты FRT, фланкирующие по меньшей мере одну представляющую интерес геномную кодирующую последовательность, а именно селективный маркерный ген; д) осуществления сайта-направленного опосредуемого рекомбинацией кластерного обмена и е) отбора трансфицированных клеток, экспрессирующих вторую представляющую интерес геномную кодирующую



щую последовательность, предпочтительно селективный маркерный ген, с получением SSI-содержащей клетки-хозяина, включающей второй обменываемый кластер, стабильно интегрированный в геном согласно изобретению (см., например, фиг. 4).

Предпочтительно первая и вторая представляющие интерес генные кодирующие последовательности фланкированы по одному из их концов первым сайтом-мишенью для рекомбинации, а по другому концу - вторым сайтом-мишенью для рекомбинации, который отличается от первого сайта-мишени.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу продуцирования SSI-содержащей клетки-хозяина согласно изобретению, где в указанном способе применяется опосредуемый рекомбиназой кластерный обмен, в процессе которого первый обменываемый кластер, содержащий первую представляющую интерес генную кодирующую последовательность, предпочтительно кодирующую mAb и фланкированную сайтами-мишенями для рекомбинации, переносят в клетку-хозяина с помощью вектора, интегрированного в геном клетки-хозяина, в частности в "горячей точке", и после отбора трансфектантов в "горячей точке", а второй обменываемый кластер, например, представляющий собой часть кольцевой обменываемой плазмиды и состоящий по меньшей мере из одной представляющей интерес генной кодирующей последовательности, в частности второй представляющей интерес генной кодирующей последовательности, предпочтительно селективного маркерного гена, фланкированного соответствующими сайтами-мишенями для рекомбинации, переносят в клетку-хозяина, в результате чего осуществляется рекомбинация и обмен первой представляющей интерес генной кодирующей последовательности на вторую представляющую интерес генную кодирующую последовательность (см., например, фиг. 4). Преимущественно в предварительно определенный локус встраивают только одну копию представляющей интерес генной кодирующей последовательности, а не векторные последовательности, в частности плазмидные последовательности обменываемой плазмиды, интегрируют в геном хозяина.

Рассматриваемый здесь способ продуцирования SSI-содержащей клетки-хозяина является преимущественным, поскольку в стадиях а) и б) "горячая точка", указывающая на высокий уровень продуцирования и на стабильное продуцирование продукта представляющей интерес генной кодирующей последовательности, может быть идентифицирована с использованием, по меньшей мере, первой представляющей интерес генной кодирующей последовательности, например гена, кодирующего антитело, например mAb или его часть, и гена, имеющего промышленное применение, например гена, кодирующего биофармацевтически релевантный белок, а в стадиях с)-е) указанная первая представляющая интерес генная кодирующая последовательность, используемая для идентификации представляющей интерес "горячей точки", была полностью заменена так называемым нулевым кластером, в частности вторым обменываемым кластером, содержащим по меньшей мере одну вторую представляющую интерес генную кодирующую последовательность, а именно один селективный маркерный ген. Таким образом была создана SSI-содержащая клетка-хозяин, в которой отсутствуют ранее присутствующие последовательности первой представляющей интерес генной кодирующей последовательности, используемые для идентификации "горячей точки", что позволяет осуществлять дополнительный опосредуемый рекомбиназой кластерный обмен с введением в указанной "горячей точке" другой представляющей интерес генной кодирующей последовательности вместо второй представляющей интерес генной кодирующей последовательности, предпочтительно селективного маркерного гена. Полученные таким образом SSI-содержащие клетки-хозяева могут быть использованы для дополнительного опосредуемого рекомбиназой кластерного обмена с введением третьей представляющей интерес генной кодирующей последовательности в геном клетки-хозяина в идентифицированной "горячей точке".

В контексте настоящего изобретения термин "соответствующие сайты-мишени для рекомбинации" означает, что первый сайт из указанных сайтов-мишеней для рекомбинации в обменываемом кластере идентичен первому сайту-мишени для рекомбинации в другом обменываемом кластере, а второй сайт-мишень для рекомбинации в первом упомянутом обменываемом кластере идентичен второму сайту-мишени для рекомбинации в другом обменываемом кластере, что позволяет осуществлять обмен нуклеотидных последовательностей между этими сайтами-мишенями для рекомбинации. При этом предпочтительно, чтобы первый сайт-мишень для рекомбинации в обоих обменываемых кластерах отличался от второго сайта-мишени для рекомбинации в обоих обменываемых кластерах.

В своем предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к способу получения продукта представляющей интерес генной кодирующей последовательности, где указанный способ включает стадии i) трансфекции SSI-содержащей клетки-хозяина согласно изобретению вектором, включающим по меньшей мере один третий обменываемый кластер, где указанный кластер содержит по меньшей мере два соответствующих сайта-мишени для рекомбинации, фланкирующих по меньшей мере одну третью представляющую интерес генную кодирующую последовательность, и по меньшей мере один селективный маркер; ii) осуществления сайт-направленного опосредуемого рекомбинацией кластерного обмена с получением SSI-содержащей клетки-хозяина, включающей третью представляющую интерес генную кодирующую последовательность; iii) создания условий для экспрессии в SSI-содержащей клетке-хозяине, полученной в стадии (ii), третьей представляющей интерес генной кодирующей последовательности и iv) выделения продукта третьей представляющей интерес генной кодирующей последовательности.

сти.

Одним главным преимуществом настоящего изобретения является достижение природной стабильности продуцирования, присущей SSI-содержащей клетке-хозяину, полученной в стадии b), где указанная клетка-хозяин включает первую представляющую интерес генную кодирующую последовательность в идентифицированной "горячей точке", а именно ген Fer1L4, который может находиться в любом участке генома SSI-содержащей клетки-хозяина, включающей третью представляющую интерес генную кодирующую последовательность. Такая стабильность не зависит от отбора, что позволяет сделать вывод, что "горячая точка" идентифицируется в стадиях а) и б) по признакам, ассоциированным с последовательностями, находящимися возле этой "горячей точки" или в каком-либо другом сайте генома. При конструировании клеточной линии на основе случайной векторной интеграции было предпринято множество попыток найти такой сайт, поскольку такая интеграция является очень редким событием. Таким образом, настоящее изобретение позволяет избежать проведения продолжительных исследований на стабильность клеточной линии для отбора подходящих клеточных линий, что, в целом, позволяет сократить время и материальные затраты на научно-исследовательские работы. Кроме того, настоящее изобретение позволяет осуществлять культивирование клеток без стадии отбора после опосредуемого рекомбинацией кластерного обмена, а это означает, что такой технологический процесс имеет больше шансов получить разрешение Регуляторных органов на его применение. При этом преимущественно "горячая точка Fer1L4" согласно изобретению была определена и идентифицирована с использованием mAb, но предпочтительно без использования флуоресцентного маркера.

Настоящее изобретение относится к способу продуцирования SSI-содержащей клетки-хозяина, в котором экзогенную нуклеотидную последовательность вводят в эндогенный ген Fer1L4 этой клетки посредством нацеленной интеграции. При этом может быть проведен любой из ряда методов направленной доставки нуклеотидной последовательности в конкретный представляющий интерес сайт генома, и такие методы включают гомологичную рекомбинацию; рекомбинацию, опосредуемую нуклеазами, например гомологичную рекомбинацию, опосредуемую парвовирусами, нуклеазами "цинковые пальцы", эффекторными нуклеазами, подобными активатору транскрипции, или сконструированными мегануклеазами (см., например, Russell & Hirata, Nat. Med. 18(4):325-30, 1998; публикацию заявки на патент США No. 20120070890; патент США No. 6528313; публикацию заявки на патент США No. 20090258363). Экзогенная нуклеотидная последовательность, введенная таким методом, может иметь любой из описанных здесь признаков. Так, например, экзогенная нуклеотидная последовательность может включать по меньшей мере одну представляющую интерес генную кодирующую последовательность и/или по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющая интерес генная кодирующая последовательность содержит по меньшей мере один селективный маркерный ген.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к способу продуцирования SSI-содержащей клетки-хозяина, где указанный способ включает введение экзогенной нуклеотидной последовательности в эндогенный ген Fer1L4 в клетке. Экзогенную нуклеотидную последовательность предпочтительно вводят путем гомологичной рекомбинации между геном Fer1L4 и полинуклеотидом, где указанный полинуклеотид включает а) первую нуклеотидную последовательность, гомологичную первой части гена Fer1L4, б) экзогенную нуклеотидную последовательность и с) вторую нуклеотидную последовательность, гомологичную второй части гена Fer1L4. В этом другом варианте осуществления изобретения введение экзогенной нуклеотидной последовательности предпочтительно облегчается благодаря использованию вирусного вектора, например вектора на основе аденоассоциированного вируса, который опосредует гомологичную рекомбинацию, или благодаря использованию экзогенной нуклеазы, например нуклеазы "цинковые пальцы", эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции, или сконструированной мегануклеазы. Особенно предпочтительно использовать вектор на основе аденоассоциированного вируса. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения экзогенная нуклеотидная последовательность фланкирована сайтами-мишенями для рекомбинации, предпочтительно сайтами loxP.

В своем аспекте А настоящее изобретение также относится к способу продуцирования SSI-содержащей клетки-хозяина, где указанный способ включает последовательно проводимые стадии а) получения клетки, содержащей эндогенный ген Fer1L4, где эндогенная нуклеотидная последовательность интегрирована в указанный ген Fer1L4, и где эндогенная нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации, фланкирующих по меньшей мере одну первую представляющую интерес генную кодирующую последовательность; б) трансфекции клеток, полученных в стадии (а), вектором, содержащим первый обменываемый кластер, где указанный кластер включает по меньшей мере два соответствующих сайта-мишени для рекомбинации, фланкирующих по меньшей мере одну вторую представляющую интерес генную кодирующую последовательность, а именно селективный маркерный ген; с) осуществления сайт-направленного опосредуемого рекомбинацией кластерного обмена и d) отбора трансфицированных клеток, экспрессирующих вторую представляющую интерес генную кодирующую последовательность, предпочтительно селективный маркерный ген, с получением SSI-содержащей клетки-хозяина, включающей первый обменываемый кластер, стабильно ин-

тегрированный в ее геном.

Настоящее изобретение также относится к способу продуцирования SSI-содержащей клетки-хозяина, где указанный способ включает последовательно проводимые стадии а) получения клетки, содержащей эндогенный ген Fer1L4, где экзогенная нуклеотидная последовательность интегрирована в указанный ген Fer1L4, и где экзогенная нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации, фланкирующих по меньшей мере одну первую представляющую интерес генную кодирующую последовательность; б) трансфекции клеток, полученных в стадии (а) вектором, содержащим первый обмениваемый кластер, где указанный кластер включает по меньшей мере два соответствующих сайта-мишени для рекомбинации, фланкирующих по меньшей мере одну вторую представляющую интерес генную кодирующую последовательность, а именно селективный маркерный ген; с) осуществления сайт-направленного опосредуемого рекомбинацией кластерного обмена и d) отбора трансфицированных клеток, экспрессирующих вторую представляющую интерес генную кодирующую последовательность, предпочтительно селективный маркерный ген, с получением SSI-содержащей клетки-хозяина, включающей первый обмениваемый кластер, стабильно интегрированный в ее геном.

Настоящее изобретение также относится к определенному выше способу согласно аспекту А, где указанный способ также включает i) трансфекцию SSI-содержащей клетки-хозяина вектором, содержащим по меньшей мере один второй обмениваемый кластер, где указанный кластер содержит по меньшей мере два соответствующих сайта-мишени для рекомбинации, фланкирующих по меньшей мере одну третью представляющую интерес генную кодирующую последовательность, и по меньшей мере один селективный маркер; ii) осуществление сайт-направленного опосредуемого рекомбинацией кластерного обмена с получением SSI-содержащей клетки-хозяина, включающей третью представляющую интерес генную кодирующую последовательность; iii) создание условий для экспрессии в SSI-содержащей клетке-хозяине, полученной в стадии (ii), третьей представляющей интерес генной кодирующей последовательности и iv) выделение продукта третьей представляющей интерес генной кодирующей последовательности.

Настоящее изобретение также относится к применению клетки, предпочтительно клетки CHO, содержащей эндогенный ген Fer1L4, предпочтительно ген Fer1L4 CHO, для продуцирования стабильной клеточной линии с высоким уровнем транскрипционной активности.

Перед более подробным описанием настоящего изобретения следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается конкретно описанными вариантами его осуществления, и очевидно, что в него могут быть внесены некоторые изменения. При этом также следует отметить, что используемая здесь терминология употребляется только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения, и не должна рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения, определяемого лишь в прилагаемой формуле изобретения.

Если это не оговорено особо, все научные и технические термины, используемые в настоящей заявке, имеют свои общепринятые значения, известные специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя для осуществления настоящего изобретения или для проведения анализов в соответствии с настоящим изобретением могут быть применены любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь методам и материалам, однако в настоящей заявке описаны возможные для применения и предпочтительные методы и материалы. Все упомянутые здесь публикации вводятся посредством ссылки в представленное здесь обсуждение и описание методов и/или материалов, к которым относятся эти публикации. Следует отметить, что представленное здесь раскрытие изобретения отменяет любое раскрытие публикации, введенное в настоящее описание посредством ссылки, при условии отсутствия каких-либо противоречий.

При этом следует отметить, что в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, например, слово "a cell" (клетка) может включать множество клеток, а слово "the vector" (вектор) может означать один вектор или несколько векторов и их эквиваленты, известные специалистам, и т.п.

В настоящей заявке приводится обсуждение лишь публикаций, появившихся до даты подачи настоящей заявки. Ничто здесь не должно быть истолковано как признание того, что авторы изобретения не имеют право датировать такую публикацию задним числом на основании предшествующего изобретения. Кроме того, даты представленных публикаций могут отличаться от фактических дат этих публикаций, что может привести к необходимости в их независимом подтверждении.

Другие предпочтительные варианты осуществления изобретения представлены в зависимых пунктах формулы изобретения.

SEQ ID No. 1-3 представляют собой нуклеотидные последовательности векторов, используемых в настоящем изобретении.

SEQ ID No. 4-6 представляют собой праймеры, используемые в настоящем изобретении.

SEQ ID No. 7 и 8 представляют собой 3'-локализованные последовательности гена Fer1L4 CHO.

SEQ ID No. 9 представляет собой 5'-локализованную последовательность гена Fer1L4 CHO и

SEQ ID No. 10 и 11 представляют собой дополнительные праймеры, используемые в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение также приводится со ссылками на примеры и прилагаемый графический

материал.

### Описание графического материала

На фиг. 1 представлен вектор pRY17 (SEQ ID No. 1), используемый для идентификации "горячей точки" в CHOK1SV. LC1 и HC1 представляют собой легкую и тяжелую цепи химерного моноклонального антитела IgG4, cB72.3. hCMV означает ранний промотор гена hCMV-MIE, где "Int" означает его первый интрон, интрон A, а фланкирующие экзоны, кодирующие 5'-UTR, обозначены "Ex1" и "Ex2" соответственно. Сайты FRT дикого типа и мутантные сайты FRT F5 обозначены F и F5 соответственно. Последовательности полиаденилирования, раннего промотора SV40 и  $\beta$ -лактамазы обозначены pA, SV40 и bla соответственно. GS означает кДНК глутамин-синтетазы, а Hyg (-ATG) означает ген гигромицин-фосфотрансферазы, не содержащий иницирующего метионинового кодона и промотора.

На фиг. 2 представлен "промежуточный" вектор, pRY37 (SEQ ID No. 2), используемый для получения SSI-содержащей клетки-хозяина 10E9. Этот вектор содержит мутантный сайт FRT (F5) и сайт FRT дикого типа (F), фланкирующий транскрипционные единицы, включающие гены тимидинкиназы (TK) и пурамицин-ацетилтрансферазы (PAC). Транскрипция в каждом из этих векторов иницируется ранним промотором SV40 (SV40E). Вектор pRY37 был введен в клетки 11A7 вместе с вектором pOG44 (Invitrogen), кодирующим FLP-рекомбиназу. Клеточные линии отбирали в присутствии пурамицин-содержащей среды, а затем скринировали на RMCE между последовательностями FRT pRY37 и эквивалентными последовательностями pRY17, включенными в геном 11A7 (см. фиг. 3). После скрининга и клонирования выделяли клеточную линию 10E9 ("SSI-хозяин"), в которой транскрипционные единицы CB72.3 mAb были заменены транскрипционными единицами TK и PAC.

На фиг. 3 показан таргетирующий вектор для создания mAb-продуцирующих клеточных линий в SSI-хозяине 10E9. Этот вектор, pRY21 (SEQ ID No. 3) включает транскрипционные единицы, содержащие гены Myo mAb (HC2 и LC2), фланкированные мутантными сайтами (F5) и сайтами FRT дикого типа. Иницирующий метиониновый кодон был добавлен с сохранением рамки считывания к 5'-концу сайта FRT дикого типа (ATG+F), а перед ним находится ранний промотор SV40 (SV). Транскрипция генов HC2 и LC2 запускается промотором главного предраннего гена 1 hCMV (hCMV-MIE) и его первым интроном, интроном A (Int A) и фланкирующими экзонами, кодирующими 5'-UTR и обозначенными "Ex1" и "Ex2" соответственно. Ген  $\beta$ -лактамазы обозначен bla.

На фиг. 4 проиллюстрирован способ получения SSI-хозяина 10E9 из клеточной линии 11A7. На этой диаграмме схематически представлена одна копия линейного и интегрированного в геном вектора pRY17, содержащего транскрипционные единицы mAb CB72.3 (HC1 и LC1), фланкированные мутантным сайтом FRT F5 и сайтом FRT дикого типа в клеточной линии 11A7. Перед трансфекцией, вектор pRY17 был разрезан в середине гена [ $\beta$ -лактамазы (bla) ферментом Pvu I, а затем линейный вектор был фланкирован 5'-(bla L) и 3'-(bla R) частями этого гена. Вектор pRY37 был введен в клеточную линию 11A7 вместе с плазмидой, кодирующей FLP-рекомбиназу, а рекомбинация (показанная крестиками) происходит между аналогичными сайтами, что приводит к RMCE транскрипционных единиц mAb с тимидинкиназой (TK) и транскрипционных единиц пурамицин-ацетилтрансферазой (PAC), каждая из которых иницируется ранним промотором SV40 (SV).

На фиг. 5 проиллюстрирован способ получения mAb-продуцирующей клеточной линии из SSI-хозяина, 10E9.

Таргетирующий вектор, pRY21 (фиг. 3, SEQ ID No. 3) содержит транскрипционные единицы для второго (Myo) mAb (HC2 и LC2), фланкированные вышерасположенным мутантным сайтом FLP (F5) и нижерасположенным ранним промотором SV40 (SV), который сам находится выше сайта FRT дикого типа, присоединенного, с сохранением рамки считывания, к метиониновому иницирующему кодону (ATG-F). В присутствии FLP-рекомбиназы и таргетирующего вектора pRY21, гены тимидинкиназы (TK) и пурамицин-ацетилтрансферазы (PAC) и ассоциированные с ними промоторы заменяют посредством RMCE на новые транскрипционные единицы антитела mAb Myo. В результате этого был создан функциональный гибридный ген, состоящий из сайта FRT дикого типа и гена гигромицина (ATG-F-Lnk-Hyg). Поэтому, клетки, в которых происходит специфический RMCE, могут быть отобраны в присутствии гигромицина и ганцикловира.

На фиг. 6 проиллюстрировано сравнение экспрессии антител в SSI-пулах и в клональных клеточных линиях, образованных в результате случайного процесса или FLP-опосредованной сайт-специфической интеграции (SSI). Клоны, образующиеся посредством случайной интеграции, были продуцированы способом, идентичным способу продуцирования клеточной линии 11A7 в фазе 1. SSI-пулы (раунд 1 SSI) и клональные клеточные линии (раунд 2 SSI и раунд 3 SSI) были получены в различных условиях трансфекции и отбора, описанных в разделе "Метод". Раунд 3 SSI проводили в 4 различных условиях отбора: 200 мкг/мл, без MSX (•), 200 мкг/мл гигромицина с MSX (◆), 400 мкг/мл гигромицина без MSX (▲) или 400 мкг/мл гигромицина с MSX (▼).

Клональные клеточные линии, полученные с применением всех этих способов, размножали в шейкерных колбах. Продуктивность клональных клеточных линий оценивали на день 7 в шейкерных колбах для последней партии (см. методы).

На фиг. 7 показана структура экзонов гена Fer1L4 на минус-цепи scaffold1492, также известной как JH000254.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/JH000254>). Локализация 5'- и 3'-сайтов интеграции обозначена 1750049 и 1760965 соответственно.

На фиг. 8 проиллюстрировано картирование ридов 10E9 на pRY17-GA-Q с использованием BWA. При исследовании этой карты было обнаружено, что множество неспаренных ридов (черные стрелки) картированы у 5'-конца фрагмента HC (который имеет делецию в 214 п.о. у 5'-конца полноразмерной HC).

На фиг. 9 показана структура области "посадки" в гене Fer1L4 SSI-содержащей клетки-хозяина 10E9. (A) Зона охвата WGRS для области "посадки" накладывается на "однокопийную модель" и ее более подробная схема показана ниже. (B) Данные Саузерн-блот-анализа дают основание предположить, что могут присутствовать две копии области "посадки". Геномную ДНК клеток 10E9 гидролизуют рестрикционными ферментами BmgI или PmlI и анализируют с помощью Саузерн-блот-анализа. Саузерн-блоты гибридизовали с зондом ТК, и выделяли два фрагмента, которые включали две копии области "посадки" (показаны на карте как "двухкопийная модель"). Такая двухкопийная модель соответствует данным WGRS.

На фиг. 10 схематически представлены сайты интеграции клеточных линий 10E9 (SSI-содержащей клетки-хозяина) и RMCE (экспрессирующих представляющий интерес ген). Локализация в геноме показана пунктирными вертикальными линиями и нуклеотидными координатами скаффолда (unplaced scaffold) CHO-K1 Scaffold1492, принадлежность которого к какой-либо хромосоме неизвестна, (регистрационный номер JH000254.1, идентичный NW\_003613833.1). Ген Fer1L4 показан стрелкой, а геномный фрагмент представлен сплошной линией. Прерывающаяся пунктирная линия означает очень большое расстояние. 5'- и 3'-фланкирующие последовательности показаны белыми и черными указателями соответственно.

На фиг. 11 представлен график области охвата ридов ре-секвенирования всего картированного генома на однокопийной модели интегрированного вектора. Высота серой диаграммы равна области охвата для каждого основания без выравнивания (показано для каждой RMCE-генерированной клеточной линии, 1-4). Область охвата у фланкирующей области приблизительно одинакова для всех клеточных линий. Однако область охвата для двух наилучших продуцентов в верхней части чертежа приблизительно в 1,4-2,3 раза больше области охвата двух клеточных линий с низким уровнем продуцирования, которые указаны в нижней части чертежа. Отличительные признаки wFRT отмечены звездочками, а отличительные признаки mFRT показаны черными кружками. (Также показаны другие отличительные признаки: HC с делецией 214 п.о. представляет собой остальные cB72.3, оставшиеся в "горячей точке" после продуцирования SSI-хозяина 10E9; BlaR представляет собой 5'-часть гена бета-лактамазы; Muo-LC и Muo-HC представляют собой последовательности, кодирующие HC (тяжелую цепь) и LC (легкую цепь) mAb против миостатина, и присутствующие в "горячей точке" после RMCE; Hvg=гигромицин; BlaL представляет собой 3'-часть гена бета-лактамазы, а GS-кДНК представляет собой последовательность вектора pRY17, кодирующую глутаминсинтазу.)

На фиг. 12 представлен график области охвата картированных ридов последовательности РНК на области LC и HC Muo интегрированного вектора (для RMCE-генерированных клеточных линий 1-4). Высота диаграммы равна области охвата для каждого основания без выравнивания.

### Примеры

#### Пример 1.

##### A) Материалы и методы.

##### 1. Конструирование вектора.

Были синтезированы и полностью секвенированы все векторные последовательности. Все гены пурамицилин-ацетилтрансферазы (PAC), гигромицин-фосфотрансферазы (Hvg) и mAb были оптимизированы и адаптированы по смещению кодонов *Stricetulus griseus* до синтеза генов. Большая часть pRY17 (фиг. 1) происходит от pCB72.3-GA-HC-LC (Kalwy et al. (2006), Mol. Biotechnol, 34, pages 151-156). Последовательности сайтов рекомбинации FRT дикого типа (F) и мутантного F5 FRT (F5), присутствующие во всех векторах, описаны в публикации Schlake и Bode (Schlake & Bode, 1994, Biochemistry 33:12746-12751). Матричные последовательности (до синтеза генов с оптимизацией или без оптимизации гена) были получены путем лигирования с сохранением рамки считывания, последовательности рекомбинации F и линкера вектора pRY17 (фиг. 1), которые были взяты из вектора pFRT/lacZeo (Invitrogen). Лигирование с сохранением рамки считывания, метионинового иницирующего кодона и последовательности рекомбинации F в pRY21 (фиг. 3) осуществляли на основе плазмиды pCDNAT5/FRT (Invitrogen). Во всех векторах используемые ранние промоторы SV40 (кроме одного промотора, который ассоциирован с транскрипционной единицей GS и который происходит от pCB72.3-GA-HC-LC) получали из вышеупомянутых векторов Invitrogen. Генные последовательности тимидинкиназы (TK) и PAC в pRY37 происходили от pWSTK6 (gb: EU530625) и pPUR (Clontech, gb:U07648) соответственно.

##### 2. Анализ партий клеток в шейкерных колбах и партий клеток в шейкерных колбах с подпиткой.

Для проведения анализа партий клеток в шейкерных колбах клетки высевали при плотности  $3 \times 10^5$  жизнеспособных клеток/мл в 125-миллилитровых шейкерных колбах в 30 мл кондиционированной среды

(CD) клеток CHO, в которую были добавлены различные селективные агенты (как описано ниже), и инкубировали при 37°C в воздухе с повышенной влажностью и с 5% CO<sub>2</sub> (об./об.) в инкубаторе, снабженном орбитальным шейкером, установленным на 140 об/мин. Кондиционированную среду собирали на 7-й день культивирования и концентрацию антитела в этой кондиционированной среде определяли с помощью ВЭЖХ на колонке с белком А.

Для проведения анализа партий клеток в шейкерных колбах с подпиткой клетки высевали при плотности  $3 \times 10^5$  жизнеспособных клеток/мл в 500-миллилитровых шейкерных колбах, каждая из которых содержала 100 мл патентованной среды, и инкубировали при 37°C в воздухе с повышенной влажностью и с 5% CO<sub>2</sub> (об./об.) в инкубаторе, снабженном орбитальным шейкером, установленным на 140 об/мин. Клетки подпитывали, начиная с 3-го дня культивирования, патентованной питательной средой, состоящей из смеси аминокислот и микроэлементов. Жизнеспособность клеток и концентрации этих жизнеспособных клеток ежедневно определяли на автоматическом анализаторе жизнеспособности клеток Vi-CELL™. Концентрацию антитела в среде определяли с помощью ВЭЖХ на колонке с белком А, начиная с 6-го дня культивирования и до сбора клеток на 14-й день.

### 3. Анализ на стабильность.

Клетки субкультивировали через каждые 3 и 4 дня в 125-миллилитровой шейкерной колбе в 30 мл кондиционированной среды клеток CHO, в которую были добавлены различные селективные агенты (как описано ниже). Для различного числа генераций (1 генерация эквивалентна 1 удвоению популяции) приготавливали дубликаты шейкерных колб для партий клеток с подпиткой, как описано выше. Концентрацию клеток, жизнеспособность клеток и концентрацию mAb определяли, как описано выше. Если продуктивность клеточной линии изменялась на >30% для 70 генераций, то это означает, что такая продуктивность является нестабильной.

### 4. Проточная цитометрия для клонирования отдельных клеток.

Клонирование отдельных клеток осуществляли на клеточном сортере FACS Aria II, снабженном компьютерной программой FACSDiva v6.0 и охлаждаемым воздухом лазером, излучающим на длине волны 488 нм. Погибшие клетки были исключены на точечной диаграмме FSC/SSC (прямое светорассеяние/боковое светорассеяние), а дуплеты были исключены на точечной диаграмме FSC, построенной по двум параметрам "ширина/площадь". Гейт клеточного сортера для живых клеток представляет собой комбинацию двух точечных диаграмм.

### 5. Производство SSI-содержащих клеток-хозяев.

Трансфекцию родительских pRY17-экспрессирующей клеточной линии с нулевым вектором pRY37, содержащим вторую представляющую интерес генную кодирующую последовательность, а именно селективный маркерный ген, осуществляли с использованием системы Freestyle™ MAX CHO (Invitrogen). В этих целях за 24 ч до повторной трансфекции для RMCE, отобранную pRY17-трансфицированную клеточную линию (11A7) высевали в экспрессионную среду для клеток CHO Freestyle™ при плотности  $5 \times 10^5$  клеток/мл в шейкерной 125-мл колбе. На день трансфекции приблизительно  $3 \times 10^7$  клеток в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл котрансфицировали 33,75 мкг плазмиды pOG44 (Invitrogen, gb:X52327) и 3,75 мкг pRY37 (9:1) с реагентом Freestyle™ MAX в 125-миллилитровой шейкерной колбе в соответствии с инструкциями производителей. После трансфекции клетки высевали в 48-луночные планшеты, содержащие патентованную среду с определенным химическим составом, в которую было добавлено 25 мкМ MSX и 7 мкг/мл пуромицина. Через три недели после посева среду из каждой лунки, содержащей жизнеспособные клетки, скринировали на производство антитела на биосенсоре ForteBio с использованием белка А. Среду от клеточных линий без детектируемого антитела заранее загружали в 125-миллилитровые шейкерные колбы, содержащие кондиционированную среду CHO, в которую было добавлено 25 мкМ MSX и 1 мкг/мл пуромицина.

### 6. Производство клеточных линий, происходящих от хозяина 10E9.

Эксперименты по RMCE были разделены на 3 отдельных "раунда" и описаны здесь и далее в разделе "Результаты" (раунды определены на фиг. 6).

В раундах 1 и 2 трансфекцию SSI-содержащей клетки-хозяина 10E9 SSI-несущим таргетирующим вектором, pRY21, осуществляли с использованием системы Freestyle™ MAX CHO (Invitrogen). В этих целях за 24 ч до повторной трансфекции для RMCE SSI-содержащие клетки-хозяева 10E9 высевали в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл в 125-миллилитровую шейкерную колбу, содержащую экспрессионную среду для клеток CHO Freestyle™, в которую было добавлено 25 мкМ MSX и 1 мкг/мл пуромицина. На день трансфекции приблизительно  $3 \times 10^7$  клеток в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл котрансфицировали 33,75 мкг плазмиды pOG44 (Invitrogen, gb:X52327) и 3,75 мкг pRY37 (9:1) с реагентом Freestyle™ MAX в 125-миллилитровой шейкерной колбе в соответствии с инструкциями производителей. После трансфекции клетки высевали в 125-миллилитровую шейкерную колбу, содержащую 30 мл экспрессионной среды для клеток CHO Freestyle™ (Invitrogen), в которую было добавлено 25 мкМ MSX. Через 48 ч после RMCE трансфектанты раунда 1 высевали в 48-луночные планшеты, содержащие патентованную среду с определенным химическим составом, в которую было добавлено 25 мкМ MSX, 400 мкг/мл гигромицина (позитивный отбор) и 3 мкМ ганцикловира (негативный отбор). Через четыре недели концентрацию mAb

в среде, взятой из лунок, содержащих жизнеспособные клетки, определяли на биосенсоре ForteBio Octect с использованием белка А. Клетки, секретирующие mAb в среду, размножали и выдерживали в шейкерных колбах, содержащих кондиционированную среду СНО, в которую было добавлено 200 мкг/мл гигромицина и 25 мкМ MSX. Затем эти клеточные пулы оценивали на продуктивность антител с помощью анализа партий клеток в шейкерных колбах (как описано выше). Для анализа на стабильность MSX удаляли из субкультуры в условиях, указанных на фиг. 6.

После 48-часового восстановления в шейкерных колбах трансфектанты раунда 2 высевали в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл в 125-миллилитровую шейкерную колбу, содержащую кондиционированную среду для клеток СНО, в которую было добавлено 400 мкг/мл гигромицина (позитивный отбор). Через 5 дней добавляли 3 мкМ ганцикловира (негативный отбор). Клетки пассировали непрерывно через каждые 3-4 дня в той же самой среде в течение 3 недель в той же самой шейкерной колбе. Выжившие клетки были подвергнуты одноклеточному клонированию на устройстве FACS Aria II в 96-луночных планшетах, содержащих патентованную среду с определенным химическим составом, в которую было добавлено 400 мкг/мл гигромицина и 3 мкМ ганцикловира. Через три недели концентрацию mAb в среде, взятой из лунок, содержащих растущие жизнеспособные клетки, определяли на биосенсоре ForteBio Octect с использованием белка А. Клоны, секретирующие mAb в культуральную среду, размножали и выдерживали в шейкерных колбах, содержащих кондиционированную среду СНО, в которую было добавлено 200 мкг/мл гигромицина и 25 мкМ MSX. Затем эти клоны оценивали на продуктивность антител с помощью анализа партий клеток в шейкерных колбах (как описано выше). Для анализа на стабильность MSX удаляли из субкультуры в условиях, указанных на фиг. 6.

Для трансфекций раунда 3  $1 \times 10^7$  SSI-содержащих клеток-хозяев 10E9 котрансфецировали путем электропорации с использованием 45 мкг плазмиды pOG44 (Invitrogen, gb:X52327) и 5 мкг pRY21 при 900 мкФ, 300В. После трансфекции клетки высевали в колбу Т-75, содержащую 20 мл патентованной среды с определенным химическим составом. Через 48 ч в среду добавляли 200 или 400 мкг/мл гигромицина, а через 6 дней добавляли 3 мкМ ганцикловира. В некоторых случаях (как описано в пояснениях на фиг. 6) добавляли 25 мкМ MSX и гигромицин для отбора. Для трансфекций во всех тестируемых условиях клетки отбирали в течение 3 недель в указанных условиях. В течение этого периода времени кондиционированную среду, содержащуюся в колбе Т-75, заменяли свежей средой, содержащей лекарственные средства для позитивного и негативного отбора, проводимого через каждые 3-4 дня. После достижения жизнеспособности >90%, клетки были подвергнуты одноклеточному клонированию на устройстве FACS Aria II в 96-луночных планшетах, содержащих описанную ранее патентованную среду с определенным химическим составом, в которую было добавлено 200 или 400 мкг/мл гигромицина вместе с 25 мкМ MSX или в отсутствие MSX (как описано в пояснениях на фиг. 6). Концентрацию антитела в кондиционированной среде, взятой из лунок, содержащих растущие жизнеспособные клетки, определяли на биосенсоре ForteBio Octect с использованием белка А. Отобранные клональные клеточные линии размножали и субкультивировали в 125-миллилитровых шейкерных колбах, содержащих кондиционированную среду для клеток СНО, в которую было добавлено 200 мкг/мл гигромицина и 25 мкМ MSX. Затем эти клоны оценивали на продуктивность антител с помощью анализа партий клеток в шейкерных колбах (как описано выше). Для анализа на стабильность гигромицин и MSX удаляли из субкультуры в условиях, указанных в пояснениях на фиг. 6.

#### 7. Анализ данных.

Интеграл по времени площади под кривой роста (интеграл по времени, где переменной является концентрация жизнеспособных клеток (IVC);  $10^6$  клеток в день/мл) вычисляли методом, описанным Renard и др. (Renard et al., 1988, Biotechnology Letters 10:91-96) по следующей формуле:

$$IVC = \sum_{k=1}^n \left( \frac{X_{v0} + X_{v1}}{2} \cdot (t_1 - t_0) \right)$$

где  $X_{v0}$ =концентрация жизнеспособных клеток в первом образце ( $10^6$ /мл);  $X_{v1}$ =концентрация жизнеспособных клеток во втором образце ( $10^6$ /мл),  $t_0$ =пройденное время для первого образца (дни),  $t_1$ =пройденное время для второго образца (дни).

#### 8. "Прогулка" по ДНК.

Для получения данных о 3'-фланкирующих геномных последовательностях был использован набор для проведения анализа методом "прогулки" по ДНК, Seegene DNA Walking SpeedUp™ Kit II, в соответствии с инструкциями производителей. Были использованы праймеры, специфичные к гену бета-лактамазы (bla); праймеры, специфичные к bla в 3'-ветви схематически представленного линейно интегрированного вектора pRY17 (bla R, фиг. 3) в клеточной линии GS-CHOK1SV 11A7; TSP1fwd (SEQ ID No. 4); TSP2fwd (SEQ ID No. 5) и TSP3fwd (Seq ID No. 6).

#### 9. Секвенирование генома хозяина 10E9.

Геномную ДНК 10E9 фрагментировали и создавали библиотеку последовательностей со спаренными концами, подходящую для секвенирования на платформе HiSeq с использованием набора TrueSeq для приготовления образцов ДНК (TrueSeq DNA Sample Preparation kit) в соответствии с инструкциями производителей. Созданная библиотека имела ожидаемый размер в пределах от 300 до 500 п.о. Анализ кон-

троля качества (QC) созданной библиотеки, проводимый путем непрерывной обработки образца на био-анализаторе Agilent 2100, показал, что эта библиотека имеет приемлемое качество, фрагменты ожидаемого размера и хороший выход. Созданную библиотеку использовали в системе cBot для создания кластеров в соответствии с инструкциями производителей. Клетки в проточных кюветах, содержащие амплифицированные кластеры, секвенировали на Hi-Seq 2000 с использованием 2×100 пар оснований со спаренными концами. Риды картировали на контигах CHO-K1 (Xu X et al. 2011, Nature Biotechnol. 29:735-742) с использованием программы Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (Li H. & Durbin R. 2009 25:1754-1760).

#### В) Результаты.

Фаза I. Продуцирование родительских mAb-экспрессирующих клеточных линий.

Целью проведения фазы I является получение высокопродуктивной mAb-экспрессирующей клеточной линии GS-CHOK1SV, обладающей хорошими характеристиками роста и стабильной продуктивностью, а также содержащей только один локус интеграции и наименьшее возможное число векторных интегрантов в этом локусе. Был сконструирован модифицированный "вектор с удвоенным геном" Lonza GS, pRY17 (фиг. 1), кодирующий химерное mAb, cB72.3 (Whittle et al., 1987, Protein Eng 1:499-505). В pRY17, 48 п.о.-последовательности рекомбинации F дикого типа и мутантного F5 фланкируют транскрипционные единицы HC и LC mAb. Последовательности рекомбинации F5 и F, несмотря на то что они являются функционально эквивалентными, обладают минимальной перекрестной активностью рекомбинации, поэтому они позволяют осуществлять эффективный и направленный RMCE, катализируемый FLP рекомбиназой (Schlake & Bode, 1994, Biochemistry 33:12746-12751). Исходные клеточные линии GS-CHOK1SV, полученные в результате pRY17-трансфекции, не обладали способностью эффективно транскрибировать или транслировать ген резистентности к гигромицину, что обусловлено отсутствием иницирующего метионинового кодона или промотора в положении непосредственно перед этим гибридным геном.

Важно отметить, что векторный ген GS был расположен за пределами обмениваемого кластера, поэтому он сохранялся в геноме полученных клеточных линий после RMCE. При этом следует избегать какого-либо возможного нарушения метаболизма глутамина в любой производной клеточной линии; поэтому родительские клеточные линии GS-CHOK1SV были отобраны в среде, не содержащей глутамина, но содержащей 50 мкМ метионин-сульфоксимида (MSX), где происходила экспрессия эндогенной и векторной глутамин-синтетазы. Ген гигромицин-В-фосфотрансферазы, не содержащий промотора и дефицитный по иницирующему трансляцию метионину (-ATG), встраивали между последовательностью, кодирующей линкер (Lnk), и последовательностью рекомбинации F (фиг. 1). Векторы, используемые для RMCE во второй фазе данного исследования, содержат ранний промотор SV40 и иницирующий метионин (ATG), необходимые для вырабатывания резистентности к гигромицину. Полностью функциональный ген резистентности к гигромицину был создан только тогда, когда происходила рекомбинация с последовательностью рекомбинации F дикого типа в геноме (фиг. 1).

Вектор pRY17, содержащий последовательности рекомбинации FRT, вводили в клетки CHOK1SV путем проведения стандартной процедуры получения клеточных линий, а затем на ключевых стадиях данного способа проводили тщательный скрининг для гарантии получения клеточных линий с наилучшей комбинацией таких свойств, как рост и продуктивность. Кроме того, белок cB72.3, происходящий от выбранных клеточных линий, обладал такими же качественными характеристиками продукта, как и препарат, происходящий от предыдущей клеточной линии GS-CHOK1SV (Birch & Racher, 2006, Adv. Drug Deliv. Rev. 58:671-685). Предпочтительно, чтобы число копий генов HC и LC, происходящих от клеточных линий-кандидатов, было почти одинаковым. Для этой цели были проведены три независимых раунда электропорации, каждая с использованием 50 мкг линейаризованного pRY17 и  $1 \times 10^7$  клеток CHOK1SV. Трансфектанты, полученные после всех трех раундов электропорации, отбирали в среде, содержащей 50 мкМ MSX, и ~1500 выживших клеточных пулов скринировали на продуцирование антитела через 3 недели после трансфекции. В конечном счете, все 79 клонов оценивали в шейкерной колбе на 7-й день, а затем во всех 79 клонах была определена концентрация mAb cB72.3. Все RMCE-производные клеточных линий выдерживали в среде, содержащей 25 мкМ MSX, если это не оговорено особо. Из 79 оцененных клонов 38 клонов были отобраны для последующего анализа партии культуры, полученной в шейкерных колбах с подпиткой. 6 наилучших клонов с оптимальными свойствами, относящимися к продуктивности и росту, были отобраны (табл. 1) для генетической характеристики (см. методы).



Таблица 1

Рост клеток и продуцирование антитела для 6 наилучших клональных клеточных линий в фазе I, культивируемых в шейкерных колбах для партии клеток и для партии клеток с подпиткой (n=2)

Клеточная линия	Партия	Партия с подпиткой			
	Концентрация продукта (мг/л) - День 7	Оценка IVCC (10 <sup>6</sup> клеток/мл)	Концентрация продукта (мг/л) - День 14	Удельная скорость продуцирования (мг/клетка.день)	Максимальная плотность клеток (10 <sup>6</sup> клеток/мл)
1G11	637,73	73,55	3385	47,3	9,00
6B5	273,73	97,89	2029	21,2	13,40
8F10	427,41	125,48	2976	25,0	15,32
11A7	457,88	149,6	3570	25,1	19,13
14D11	378,83	86,32	3251	39,2	10,33
18C11	480,27	90,45	2953	35,5	11,05

Для оценки сайта интеграции pRY17 в геноме СКОК1SV получали хромосомы в метафазе от 6 клонов и зондировали DIG-меченным pRY17 (данные не приводятся). Все клоны 1G11, 6B5, 8F10, 14D11 и 11A7, очевидно, имеют только один локус интеграции в теломерной области отдельной хромосомы. С другой стороны, клон 18C11, очевидно, имеет два различных сайта интеграции, поэтому он не был отобран для дальнейшего исследования. Для определения числа копий генов в каждой клеточной линии из активно растущих клеток была получена геномная ДНК, которую обрабатывали ультразвуком. Для кол.ПЦР-анализа GAPDH включали в качестве эндогенного контроля, а pRY17 "впрыскивали" в ДНК клетки-хозяина в качестве позитивного контроля. Число копий генов на клетку для HC и LC вычисляли как отношение их усредненных копий к усредненным копиям GAPDH. Как показано в табл. 2, из 5 проанализированных клонов 11A7 имел наименьшее число копий генов HC и LC. Саузерн-блот-анализ геномной ДНК показал, что HC и LC могут детектироваться во всех 5 клонах, а интенсивность полос указывает на число копий генов, определенных с помощью кол.ПЦР (данные не приводятся).

Таблица 2

Анализ копий генов HC и LC cB72.3 в 5 из 6 клональных клеточных линий с помощью кол.ПЦР

Клеточная линия	Усредненное число копий HC/клетку	Усредненное число копий LC/клетку
1G11	15,58	13,95
6B5	44,46	47,91
8F10	40,46	38,41
11A7	6,57	3,57
14D1	9,75	9,31

Из 5 клонов, которые были отобраны для их использования в исследованиях на стабильность согласно изобретению (табл. 3), 11A7 сохранял аналогичную продуктивность через 7 месяцев (220 генераций), тогда как другие клоны обнаруживали заметную потерю продуктивности за первые 3 месяца исследования (80 генераций). В целом, 11A7 имеет не только одну из лучших комбинаций таких параметров, как хорошие профили роста и продуктивности, но также и наименьшее число копий генов с одним сайтом интеграции. Важно отметить, что 11A7 является самым стабильным клоном из 6 клонов с точки зрения его продуктивности. Самым важным является то, что качество продукта было сравнимым для 220 генераций. 11A7 был выбран как родительский клон для проведения первого раунда RMCE: фаза II.

Таблица 3

Анализ на стабильность 5 наилучших SSI-содержащих клональных клеточных линий

Клеточная линия	Продуцирование антитела (мг/л) для данного числа генераций									
	10	40	80	100	120	140	160	180	200	220
1G11	2809,00	2977,00	2675,86	2553,18	2464,09	2047,00	-	-	-	-
11A7	2946,00	2776,82	2546,47	2464,99	2395,90	2421,00	2425,00	2498,00	2496,00	2676,00
6B5	1548,00	1791,94	1580,33	-	-	-	-	-	-	-
8F10	2433,00	2593,00	2760,20	-	-	-	-	-	-	-
14D11	2629,00	2521,08	2358,44	-	-	-	-	-	-	-

5 наилучших SSI-содержащих клональных клеточных линий непрерывно культивировали в шейкерных колбах для различных генераций в присутствии MSX. Как показано для различных генераций, все 5 SSI-содержащих клональных клеточных линий анализировали в шейкерных колбах для партий культур с подпиткой на продуцирование антитела (n=2).

Фаза II - генерирование SSI-содержащих клеток-хозяев.

Хотя, в целом, можно сконструировать вектор для нацеленной доставки (таргетирующий вектор), в котором исходные транскрипционные единицы mAb в 11A7 будут заменены новыми транскрипционными единицами mAb, однако предпочтительно, чтобы такие исходные единицы были полностью удалены из генома. Для этого был сконструирован дополнительный нулевой таргетирующий вектор, pRY37 (фиг. 2), который не включает гены mAb. Вместо этого, он кодирует маркеры позитивного и негативного отбора, пурамицин-ацетилтрансферазу (PAC) и тимидинкиназу (TK) соответственно, которые были флан-

кированы последовательностями рекомбинации F и F5 в такой же ориентации, как и pRY17 (фиг. 1). После RMCE эти маркеры, как и предполагалось, заменяли исходное mAb CB7 2.3 в том же самом локусе в исходном геноме 11A7. PAC необходима для отбора клеточных линий, которые подвергаются RMCE с pRY37. ТК превращает пролекарство ганцикловир в токсический фосфорилированный нуклеотидный аналог (Wood & Crumpacker, 1996, New England Journal of Medicine 335, pages 721-729). Это очень важно для проведения последующего негативного отбора в фазе III: Отбор с использованием ганцикловира обогащает RMCE-пул клетками, которые могут подвергаться RMCE, благодаря уничтожению клеток, которые не могут выполнять такую функцию.

Из пулов выживших клеточных линий, которые были негативными по экспрессии mAb, была выбрана одна клеточная линия, 136-A4, для последующей характеристики с помощью Саузерн-блот-анализа (данные не приводятся). В этой клеточной линии в геноме 136-A4 было подтверждено присутствие ТК. Рестрикционное картирование указывало на присутствие только двух копий pRY37 в "горячей точке", и такое присутствие было подтверждено путем последующего геномного секвенирования дочернего клона 10E9. Это число копий было значительно меньше, чем число копий pRY17, обнаруженных в линии 11A7 (табл. 2). Для получения гомогенного SSI-хозяина авторы проводили одноклеточное клонирование 136-A4 на FACS Aha II и определяли профили роста 26 клональных производных. Из этих производных были отобраны два клональных производных с наилучшими профилями роста, 10E9 и 8C8, для последующей характеристики с помощью Нозерн-блот-анализа. Нозерн-блот-анализ РНК этих дочерних клонов подтвердил отсутствие мРНК HC и LC сB72.3 (данные не приводятся). В целом, эти результаты показали, что 10E9 представляет собой клеточную линию-хозяина, которая является подходящим кандидатом на проведение теста на RMCE в фазе III.

Фаза III - RMCE с использованием таргетирующего вектора для Myo mAb.

Для того чтобы продемонстрировать эффективность новой SSI-содержащей клеточной линии-хозяина 10E9, был сконструирован таргетирующий вектор, pRY21 (фиг. 3). Этот вектор содержит гены HC и LC для Myo mAb, фланкированные последовательностями рекомбинации F и F5 в той же самой ориентации, как и в векторах pRY17 (фаза I) и pRY37 (фаза II). Этот вектор также содержит ранний промотор SV40 (SV40E), расположенный перед метиониновым иницирующим кодоном, присоединенным в той же рамке считывания к последовательности рекомбинации F (ATG + F). При "правильном" RMCE ATG + последовательность F находятся в одной рамке считывания с геном гигромицин В-фосфотрансферазы, не содержащим промотора и дефицитным по иницирующему трансляцию метионину (-ATG). Было осуществлено три раунда котрансфекции клеток 10E9 плазмидами pRY21 и pOG44. В первых двух раундах клетки были трансфицированы системой MAX CHO Free style™, а в раунде 3 клетки были трансфицированы путем электропорации. Кроме того, в раунде 1 проводили совместный отбор с использованием ганцикловира и гигромицина в виде пулов, в раунде 2 проводили последовательный отбор сначала с использованием 400 мкг/мл гигромицина, а затем ганцикловира в виде пулов, после чего проводили одноклеточное клонирование на FACS Aria II, а в раунде 3 проводили последовательный отбор сначала с использованием 200 или 400 мкг/мл гигромицина, а затем ганцикловира в виде пулов, после чего проводили одноклеточное клонирование на FACS Aria II (фиг. 6). В раунде 3 MSX отсутствовал в культуральной среде при проведении теста в двух условиях.

Данные по продуктивности, полученные для различных пулов в раунде 1, были аналогичными, что позволяет предположить, что члены каждого пула клеточных линий, вероятно, имеют аналогичные продуктивности. Интервал уровней продуктивности в пулах был гораздо уже, чем в клональных или неклональных клеточных линиях, полученных в результате случайной интеграции (фиг. 6). При сравнении клональных клеточных линий, выделенных в различных условиях отбора после проведения раундов 2 и 3, было обнаружено, что сверхпродуцирующие клональные клеточные линии присутствуют в группе, отобранной в отсутствие MSX, но не в группе, отобранной в присутствии MSX. В клеточных линиях, культивированных в отсутствие MSX, наблюдалось различие в продуктивностях культур, отобранных с использованием различных концентраций гигромицина в селективной среде, однако такого различия не наблюдалось, если MSX присутствовал в среде.

Сначала, в фазе I была выделена в высокой степени стабильная клеточная линия GS-CHOK1V 11A7, которая сохраняет свою стабильность в 220 генерациях. Этот признак, то есть стабильность, может наследоваться в производных клеточных линиях, генерированных посредством RMCE в фазе III. В соответствии с этим 3 клеточных пула раунда I фазы III были оценены на стабильность в расширенных исследованиях, проводимых в двух различных условиях (табл. 4).

Таблица 4

Число генераций	Концентрация антитела (мг/л) в культурах партий клеточных линий с подпиткой					
	70C2		72A3		74B5	
	(+/+)	(-/ +)	(+/+)	(-/ +)	(+/+)	(-/ +)
10	1240	1140	1510	1430	1310	1170

40	1070	1140	1400	1250	1370	1190
70	1100	1170	1400	1200	1370	1240
100	1030	1270	1700	1490	1700	1400

Раунд 1: три отобранных клеточных линии размножали в шейкерных колбах и непрерывно культивировали в двух различных условиях; + гиргомидин/+ MSX (+/+) или -MSX/+ гиргомидин (-/+). В различные периоды времени культуры, полученные в дубликатах в шейкерных колбах для партий клеток с подпиткой, приготавливали из непрерывных культур всех 3 SSI-содержащих клеточных линий-хозяев в обоих условиях, и через 14 дней определяли концентрацию  $\text{Mu0 mAb}$  в среде.

Независимо от условий, все три протестированных пула удовлетворяли критериям стабильной клеточной линии. Кроме того, в исследованиях на стабильность одного и того же типа было оценено всего 12 клональных клеточных линий, по 6 в каждом раунде 2 и 3 (табл. 5 и 6 соответственно). При отборе было обнаружено, что все 12 клональных клеточных линий сохраняли такой признак, как стабильность. Интересно отметить, что 6 клональных клеточных линий раунда 3 (табл. 4) были стабильными даже в отсутствие любых селективных агентов. Этот признак имеет огромное значение для приготовления биофармацевтических препаратов.

Таблица 5

Число генераций	Концентрация антитела (мг/л) в культурах партий клеточных клонов с подпиткой											
	11F6		11F11		12C3		13F7		13G8		15E9	
	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)
10	1470	1390	1920	1860	1480	1360	1960	1870	2020	2020	2150	2100
40	1300	1420	1870	1680	1770	1590	1850	1860	1940	2010	2020	2100
70	1350	1350	1870	1650	1770	1600	1850	1760	1840	1890	2060	2060
100	1200	1580	2180	1930	2160	1790	2094	1950	1970	2020	2500	2360

Раунд 2: шесть одноклеточных клонов непрерывно культивировали в двух различных условиях; + гиргомидин/+ MSX (+/+) или -MSX/- гиргомидин (-/-), а затем эти клоны периодически анализировали путем культивирования партий клеток с подпиткой, как описано для раунда 1 (табл. 4).

Таблица 6

Число генераций	Концентрация антитела (мг/л) в культурах партий клеточных клонов с подпиткой													
	2H4		4H7		A5B8		A7D5		A8A10		A8G1			
	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(-)/(-)		
10	2400,0	2400,0	2200,0	2400,0	1900,0	2100,0	2200,0	2300,0	1300,0	1400,0	1400,0	1500,0		
40	2460,0	2440,0	2330,0	2240,0	2100,0	2070,0	2320,0	2320,0	1580,0	1570,0	1490,0	1500,0		
70	2080,0	2150,0	1980,0	2070,0	1910,0	1930,0	1990,0	2120,0	1490,0	1610,0	1360,0	1380,0		
100	2389,0	2359,0	2655,0	2510,0	2215,5	2276,5	2343,0	2536,0	1760,0	2009,0	1637,5	1656,5		
130	2477,5	1937,5	3401,0	2505,0	2392,0	1970,0	2496,0	2311,0	1760,0	1870,0	1552,0	1029,0		

Раунд 3: шесть одноклеточных клонов непрерывно культивировали в двух различных условиях; -MSX/+ гиргомидин (-/+), или -MSX/- гиргомидин (-/-), а затем эти клоны периодически анализировали путем культивирования партий клеток с подпиткой, как описано для раунда 1 (табл. 4).

Характеризация геномных последовательностей, фланкирующих "горячую точку".

3'-фланкирующая последовательность.

3'-фланкирующая последовательность размером 500 п.о. (SEQ ID No. 7), полученная методом "прогулки по ДНК" Seegene DNA на основе bla R (фиг. 3), была использована для blast-поиска контигов по программе секвенирования генома CHO-K1 (Xu X et al., 2011, Nature Biotechnol. 29:735-742), которая является общедоступной и имеется в базе данных NCBI. Уникальная область, локализованная на геномном скаффолде, принадлежность которого к какой-либо хромосоме неизвестна, scaffold1492 (регистрационный номер JH000254.1, идентичный NW\_003613833.1), была обнаружена на минус-цепи в положениях 1760466-1760965. 500 п.о.-последовательность (SEQ ID No. 7) удлиняли до 2000 п.о. (Seq ID No. 8) путем картирования ридов 10E9 с широкой областью охвата на скаффолде 1492 (данные не приводятся).

3'-фланкирующая последовательность, идентифицированная методом "прогулки по ДНК" Seegene DNA (см. методы), была использована для blast-поиска контигов по программе секвенирования генома CHO-K1 (Xu X et al. 2011, Nature Biotechnol. 29:735-742), которая является общедоступной и имеется в базе данных NCBI. С использованием этих данных и данных секвенирования последовательности генома Illumina HiSeq, полученных для SSI-содержащей клеточной линии-хозяина 10E9, была обнаружена уникальная область, локализованная на геномном скаффолде, принадлежность которого к какой-либо хромосоме неизвестна, scaffold1492 (регистрационный номер JH000254.1, идентичный NW\_003613833.1). Было обнаружено, что эта последовательность локализована в предсказанном гене Fer1L4 (fer-1-подобном гене 4) (NCBI Gene ID: 100755848) в scaffold1492 на минус-цепи (скаффолд 1492, нуклеотиды 1746191-781992; всего 35802 нуклеотидов). 5'-фланкирующая последовательность, очевидно, локализована между экзонами 39 и 40, а 3'-фланкирующая последовательность, очевидно, локализована между экзонами 28 и 29 (см. фиг. 7).

5'-фланкирующая последовательность.

Риды Illumina от геномной ДНК 10E9 картировали на pRY17 (SEQ ID No. 1) с использованием программы Burrows-Wheeler Aligner (BWA). При исследовании этой карты было обнаружено, что множество неспаренных ридов (показано черными стрелками на фиг. 8) картированы у 5'-конца 3'-части HC cB72.3. Этот анализ позволяет предположить, что по меньшей мере один фрагмент cB72.3 HC (с делецией 214 п.о. у 5'-конца) остается в "горячей точке" 10E9. Нозерн-блот-анализ (данные не приводятся) показал, что

в клетках 10E9 отсутствует мРНК LC или HC сВ72.3, что позволяет предположить, что усеченная HC в сВ72.3 является нефункциональной. Затем эквивалентные спаренные риды использовали для blast-поиска контигов по программе секвенирования генома CHO-K1 (Xu X et al., 2011, Nature Biotechnol. 29:735-742). Все они были сопоставлены путем выравнивания по тем же положениям (1750048-1750183) на геномном скаффолде, принадлежность которого к какой-либо хромосоме неизвестна, scaffold1492 (регистрационный номер JH000254.1, идентичный NW\_003613833.1). Это позволяет удлинить 5'-фланкирующую последовательность максимум до 822 п.о. (SEQ ID No. 9).

Пример 2.

А) Материалы и методы.

1. Саузерн-блот-анализ.

5-10 мкг геномной ДНК, выделенной из пассажей 2 и 4 каждого клона и очищенных с использованием набора Blood & Cell Culture DNA Maxi Kit от QIAGEN (Qiagen), гидролизовали рестриктирующей(ими) эндонуклеазой(ами) в течение 15 ч при 37°C. Гидролизованную ДНК два раза экстрагировали равным объемом смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт, pH8,0 (1:1, об./об.), а затем только хлороформом, после чего осаждали этанолом и подвергали электрофорезу на 0,7% (мас./об.) агарозном геле либо в 0,5×TBE-буфере (50×TBE: Lonza), либо в 1×TAE-буфере (40 мМ трис, pH 7,7, 2,5 мМ EDTA). Гель переносили на мембрану Hybond-N (Amer-sham) с помощью вакуумной системы в основном в соответствии с инструкциями производителей (Appligene, Pharmacia). Мембраны Hybond-N подвергали УФ-фиксации, предварительно гибридизовали в буфере для гибридизации, содержащем 5× раствор Денхардта, приготовленный из 50× маточного раствора (Sigma), в 6×SSC (1×SSC: 0,15М хлорида натрия, 15 мМ цитрата натрия) и 10% (мас./об.) ДСН, или только в буфере Rapid-hyb (GE healthcare).

ТК-зонды получали с помощью ПЦР с использованием следующих серий праймеров:

прямой ТК-праймер: 5'-AGATCACCATGGGCATGCCTTAC-3' (SEQ ID № 10);

обратный ТК-праймер: 5' AACACGTTGTACAGGTCGCCGTT-3' (SEQ ID № 11).

Вектор pRY37 использовали в качестве матрицы для зонд-генерирующей ПЦР с проведением циклов в следующих условиях: 15 нг матрицы/50 мкл реакционной смеси; ДНК-полимераза Taq (Roche); 94°C, 2 мин, 30 циклов, 94°C, 30 с, 55°C, 1 мин и 72°C, 30 с, конечное удлинение при 72°C в течение 7 мин. 25 нг ПЦР-продукта метили [ $\gamma$ -32P] dCTP (111 ТБк/ммоль, Perkin Elmer) с использованием набора Megaprime и очищали на колонке для ник-трансляции (Amersham). Гибридизацию осуществляли в том же самом буфере для предварительной гибридизации в течение 2-20 ч при 65°C. После гибридизации мембраны промывали в условиях самой высокой жесткости, а именно 0,1×SSC, 0,1% (мас./об.) ДСН при 65°C. Блоты экспонировали на люминофорном экране с длительным послесвечением (Bio-Rad), а экраны с экспонированными блотами визуализировали с использованием визуализирующей системы Personal Molecular Imager (PMI) System (Bio-Rad).

2. Картирование и выравнивание.

Риды со спаренными концами в формате FASTQ вводили в геномные матрицы для картирования. Векторные последовательности и популяцию CHOK1SV индексировали как матрицы для картирования. Риды со спаренными концами сопоставляли с матрицами путем выравнивания с использованием программы Bowtie2 (Langmead B, & Salzberg SL, 2012, Nature methods, 9 (4), 357-9) с параметрами по умолчанию (-D 5 -R 1 -N 0 -L 25 -i S,1,2.00) для очень быстрого локального выравнивания. Область охвата нормализовали как <raw coverage> \*500M/<number of reads> для сравнения различных образцов.

3. Идентификация сайтов интеграции.

2 X 100 ридов со спаренными концами в SSI-содержащем штамме-хозяине 10E9 секвенировали на севенаторе Illumina Hi-Seq 2000 со средней областью охвата 40 X. Риды последовательности картировали на векторе pRY17, который представляет собой первый вектор, интегрированный в геном CHOK1SV. Риды, покрывающие сайты интеграции, называются химерными ридами, поскольку они содержат последовательность, которая была картирована на геноме CHOK1SV, а также на интегрированной векторной последовательности. Поскольку картирование осуществляли путем локального выравнивания, то химерные риды имели характеристики, частично совпадающие с характеристиками векторных последовательностей, имеющих выступающие концы, которые могут быть картированы на геномной последовательности. Помимо химерных ридов имеются и другие риды, в которых один конец спаренного рида картирован только на векторной последовательности, а другой конец картирован на геномной последовательности. Эти пары ридов называются парами несоответствующих ридов. Последовательности выступающих концов и некартированные риды от пар несоответствующих ридов собирали и использовали для поиска геномного ансамбля CHOK1SV с использованием программы blast в целях идентификации фланкирующей последовательности сайтов интеграции исходя их сходства последовательностей.

4. Область "посадки".

Структура области "посадки" (экзогенных последовательностей, введенных в "горячую точку", которая содержит сайты рекомбинации для интеграции экспрессионных кластеров представляющих интерес генов посредством RMCE) была определена на основе данных Саузерн-блот-анализа и анализа ресеквенирования всего генома (WGRS) клеточной линии 10E9 (фиг. 9). Риды, происходящие от 10E9, кар-

тировали на векторной последовательности с использованием того же самого алгоритма, который был применен для картирования сайтов интеграции. Химерные риды также наблюдались в сайтах дубликации, делеции или инсерции. Коррекцию по предполагаемой последовательности области "посадки" осуществляли исходя из тщательных исследований сайтов, в которых образовывались химерные риды.

#### 5. Количественный анализ последовательности РНК.

Матрицу, используемую для картирования ридов, конструировали с использованием "однокопийной" модели области "посадки", полученной после ре-секвенирования всего генома (см, выше). Риды, полученные в результате секвенирования последовательности РНК, картировали на матрице с помощью программы BWA с параметрами по умолчанию. Число ридов на LC и HC нормализовали по величинам RPKM, где риды в тысячу пар оснований транскриптома на миллион картированных ридов вычисляли по следующей формуле:

$$RPKM = \frac{\text{number of reads overlapping with the exons}}{\frac{\text{total number of mapped reads}}{10^6} \times \frac{\text{total length of all exons}}{10^3}}$$

Число ридов, перекрывающихся с экзонами, получали для каждого интервала с использованием пакета инструментальных программ (bedtools) (Quinlan AR & Hall IM, 2010, Bioinformatics. 26, 6, p. 841-842) со следующими командами: bedtools coverage -abam <bam file> -b intervals in bed>.

#### В) Результаты.

Структура области "посадки" в SSI-содержащей клетке-хозяине 10E9.

Модель структуры области "посадки" в "горячей точке" Fer1L4 была создана на основе ожидаемых событий RMCE в процессе получения клеточной линии 10E9 из 11A7 с использованием нулевого таргетирующего вектора pRY37 (фиг. 4). Эта модель называется "однокопийной" моделью и соответствует WGRS-данным, полученным для клеточной линии 10E9 (фиг. 9A). Однако данные Саузерн-блот-анализа позволяют предположить, что такая модель фактически должна содержать две копии (фиг. 9B). Эту "двухкопийную" модель уточняли на основе полученных данных и использовали для облегчения интерпретации mAb-продуцирующих клеточных линий, полученных в результате RMCE, проводимом в хозяине 10E9. Эта "двухкопийная" модель позволила авторам объяснить, почему одна или две копии транскрипционных единиц антител могут быть включены в область "посадки" посредством RMCE с использованием таргетирующего вектора pRY21.

Фланкирующие последовательности в RMCE-производных клеточных линиях.

Были созданы четыре рекомбинантных клеточных линии, происходящих от 10E9 и экспрессирующих моноклональное антитело против миостатина (Muo) посредством RMCE (с использованием таргетирующего вектора pRY21), и были определены 5'- и 3'-фланкирующие последовательности в каждой из этих клеточных линий методами, описанными ранее. В процессе RMCE происходит соответствующая геномная реаранжировка с образованием новой 3'-фланкирующей последовательности в производных клеточных линиях (фиг. 10). 5'-фланкирующая последовательность в RMCE-производных клеточных линиях является такой же, как и в 10E9, в сайте интеграции в положении нуклеотида 1750049 (на скаффолде, принадлежность которого к какой-либо хромосоме неизвестна, CHO-K1 scaffold1492 (регистрационный номер JH000254.1, идентичный NW\_003613833.1). Однако новые 3'-фланкирующие последовательности отличались, то есть 3'-сайт интеграции в SSI-содержащей клеточной линии-хозяине 10E9 находится в нуклеотиде 1760965, а во всех RMCE-производных клеточных линиях он находился в нуклеотиде 1435427 (в вышеупомянутом скаффолде, фиг. 10).

Определение числа копий интегрированного кластера в клеточных линиях, генерированных посредством RMCE.

Риды секвенирования геномов каждой из этих клеточных линий картировали на модели, в которой одна копия была интегрирована в "горячую точку". Число копий Muo вычисляли исходя из средней области охвата на области LC и HC. Средняя область охвата для этих четырех клеточных линий составляла 41, 34, 18, 27 на области LC и 32, 27, 14, 19 на области HC соответственно.

Данные для области охвата показали, что для получения клеток-сверхпродуцентов может потребоваться по меньшей мере еще одна копия HC и LC (табл. 7). Данные для области охвата графически представлены на фиг. 11.

Таблица 7

Область охвата ридов последовательности и удельная скорость продуцирования (qP) Муо-продуцирующих RMCE-клеточных линий.

Число копий указано в скобках после величины области охвата

Клеточная линия	qP (пг/клетка в день)	Область охвата	
		LC	HC
1	20	41 (2)	32 (2)
2	19	34 (2)	27 (2)
3	10, 2	18 (1)	14 (1)
4	10	27 (1)	19 (1)

Исходя из этих наблюдений была создана новая модель локуса после RMCE, в которую была включена дополнительная копия Муо. Это было достигнуто путем встраивания другой копии фрагмента, простирающегося от начала первого сайта wFRT до начала второго сайта wFRT (оба они показаны звездочками на фиг. 11) непосредственно перед началом второго wFRT. С использованием этой "двухкопийной" модели авторы имели возможность полностью определить число наблюдаемых ридов в клеточных линиях с высокой qP, если они были снова картированы на этой модели.

Дополнительное подтверждение "двухкопийной" модели в Муо-продуцирующих клеточных линиях с высокой qP было получено на основе данных секвенирования РНК каждой клеточной линии. Риды секвенирования РНК от каждой из Муо-продуцирующих клеточных линий картировали на одной исходной "однокопийной" модели (фиг. 12) с использованием программы BWA (Li H. & Durbin R. 2009, *Bioinformatics*, 25:1754-60) с параметрами по умолчанию. Число копий Муо определяли путем вычисления величин RPKM (Mortazavi et al.(2008), *Nature Methods* 5, 621-628) для областей LC и HC. Величины RPKM составляют 43135, 40059, 23204, 29334 в области LC и 38572, 32384, 17878, 20751 в области HC соответственно. Эти данные, полученные авторами после секвенирования всего генома, также подтвердили, что "двухкопийная" модель может быть предложена для ее использования в целях получения клеток-сверхпродуцентов.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клетка-хозяин, способная к стабильной высокопродуктивной сайт-специфической интеграции (SSI-клетка-хозяин), содержащая эндогенный ген Fer1L4 (fer-1-подобного белка 4), где в указанный ген Fer1L4 интегрирована экзогенная нуклеотидная последовательность, включающая ген, представляющий интерес, и по меньшей мере один ген селективного маркера, причем указанная экзогенная нуклеотидная последовательность фланкирована по меньшей мере двумя сайтами-мишенями для рекомбинации, обеспечивающими сайт-специфическую интеграцию экзогенных нуклеотидных последовательностей, причем SSI-клеткой-хозяином является клетка линии CHO.

2. SSI-клетка-хозяин по п.1, где указанный ген, представляющий интерес, кодирует детектируемый белок, антитело, пептидный антиген, фермент, гормон, фактор роста, рецептор или другой биологически активный белок, в частности гибридный белок.

3. SSI-клетка-хозяин по п.1, где указанными сайтами-мишенями для рекомбинации являются сайты FRT.

4. SSI-клетка-хозяин по п.3, где указанные сайты FRT представляют собой сайты FRT дикого типа или мутантные сайты FRT.

5. SSI-клетка-хозяин по п.1, где указанные сайты-мишени для рекомбинации независимо выбраны из сайта FRT дикого типа и мутантного сайта FRT.

6. SSI-клетка-хозяин по п.1, где указанный ген селективного маркера кодирует глутаминсинтетазный селективный маркер, гигромициновый селективный маркер, пурамициновый селективный маркер или тимидинкиназный селективный маркер.

7. SSI-клетка-хозяин по любому из предшествующих пунктов, где указанные сайты-мишени фланкированы одной из нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID No. 7-9 и гомологичных им последовательностей.

8. SSI-клетка-хозяин по любому из предшествующих пунктов, где указанная экзогенная нуклеотидная последовательность замещает часть гена Fer1L4.

9. Способ получения SSI-клетки-хозяина, включающей обмениваемую кассету, стабильно интегрированную в геном, где способ включает следующие стадии:

а) трансфекцию SSI-клетки-хозяина по любому из пп.1-8 вектором, содержащим обмениваемую кассету, причем указанная кассета содержит по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации, соответствующих по меньшей мере двум сайтам-мишеням для рекомбинации, содержащимся в исходной SSI-клетке-хозяине, и фланкирующих по меньшей мере один ген, представляющий интерес, и по меньшей мере один ген селективного маркера;

б) осуществление сайт-направленного опосредуемого рекомбинацией обмена экзогенной нуклеотидной последовательности из исходной SSI-клетки-хозяина с указанной обмениваемой кассетой и

с) отбор трансфицированных клеток, экспрессирующих ген, представляющий интерес, с получением SSI-клетки-хозяина, включающей указанную обмениваемую кассету, стабильно интегрированную в ее геном и содержащую указанный ген.

10. Способ получения продукта гена, представляющего интерес, включающий следующие стадии: а) трансфекцию SSI-клетки-хозяина, полученной способом по п.9, вектором, содержащим другую обмениваемую кассету, причем указанная кассета содержит по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации, соответствующих по меньшей мере двум сайтам-мишеням для рекомбинации, содержащимся в трансфицируемой клетке, и фланкирующих по меньшей мере один другой ген, представляющий интерес, и по меньшей мере один ген селективного маркера; б) осуществление сайт-направленного опосредуемого рекомбинацией обмена одной кассеты на другую кассету с получением SSI-клетки-хозяина, включающей указанный другой ген, представляющий интерес; с) создание условий для экспрессии в полученной SSI-клетке-хозяине указанного другого гена, представляющего интерес; и д) выделение продукта другого гена, представляющего интерес.

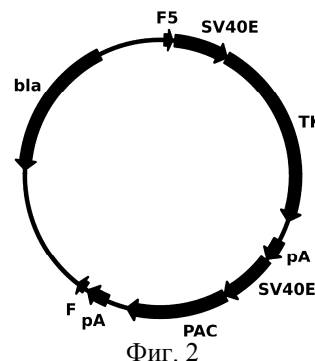
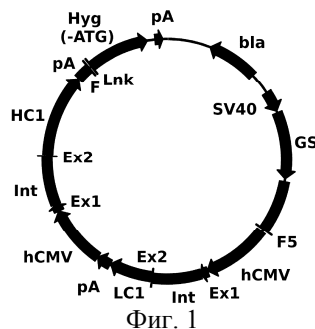
11. Способ получения продукта гена, представляющего интерес, где указанный способ включает культивирование SSI-клетки-хозяина, полученной способом по п.9, в подходящей среде и выделение продукта из этой среды.

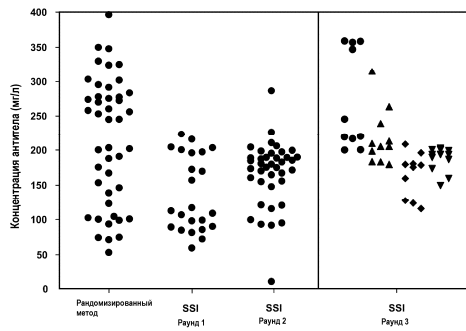
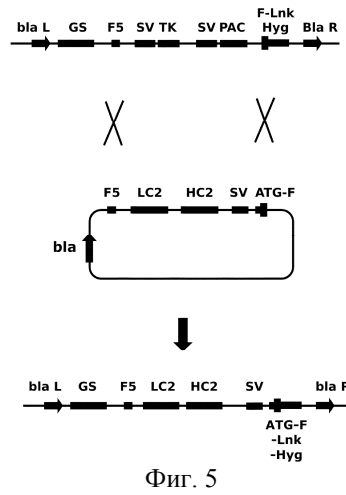
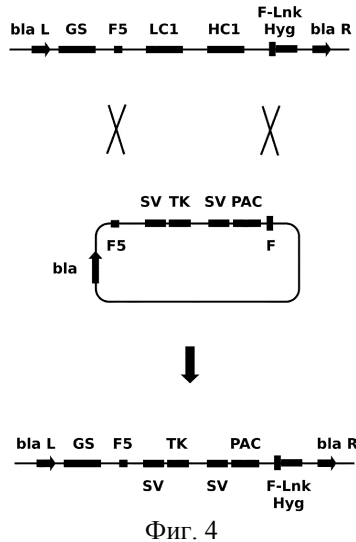
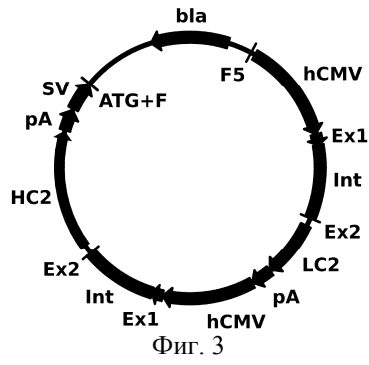
12. Способ получения клетки-хозяина, способной к стабильной высокопродуктивной сайт-специфической интеграции по п.1, где указанный способ включает введение экзогенной нуклеотидной последовательности в эндогенный ген *Fer1L4* в клетке линии CHO путем нацеленной интеграции, где указанная экзогенная нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере один ген, представляющий интерес, а также по меньшей мере один ген селективного маркера и по меньшей мере два сайта-мишени для рекомбинации, фланкирующих экзогенную нуклеотидную последовательность.

13. Способ по п.12, где нацеленную интеграцию экзогенной нуклеотидной последовательности осуществляют посредством гомологичной рекомбинации между геном *Fer1L4* и полинуклеотидом, где указанный полинуклеотид содержит:

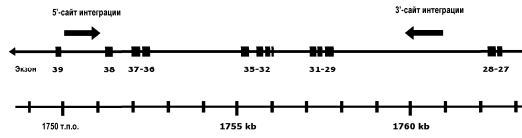
- а) первую нуклеотидную последовательность, гомологичную первой части гена *Fer1L4*;
- б) экзогенную нуклеотидную последовательность и
- с) вторую нуклеотидную последовательность, гомологичную второй части гена *Fer1L4*.

14. Способ по п.12, где нацеленную интеграцию экзогенной нуклеотидной последовательности обеспечивают использованием вирусного вектора, такого как вектор на основе аденоассоциированного вируса, который опосредует гомологичную рекомбинацию, или использованием экзогенной нуклеазы, такой как нуклеаза "цинковые пальцы", эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции, или сконструированная мегануклеаза.

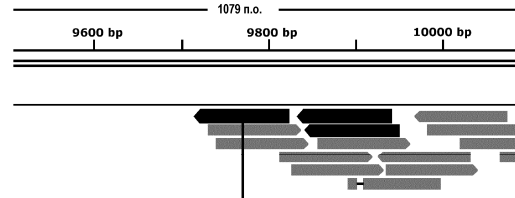




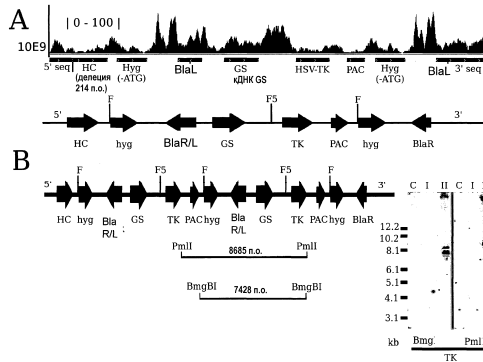




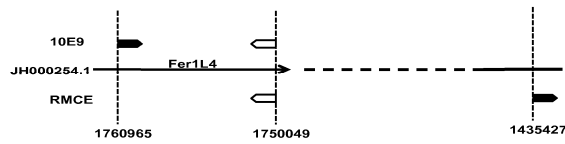
Фиг. 7



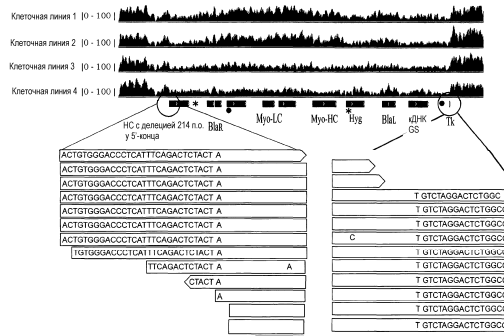
Фиг. 8



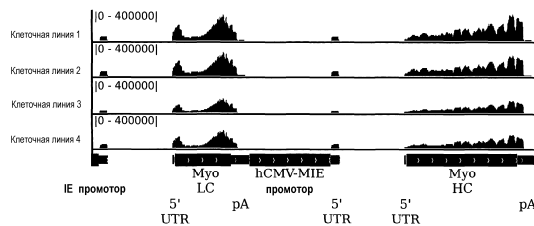
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12