

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044302**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.15

(21) Номер заявки
202191602

(22) Дата подачи заявки
2014.03.14

(51) Int. Cl. **C12N 5/02** (2006.01)
C12N 5/07 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(54) НЕ СОДЕРЖАЩАЯ СЫВОРОТКИ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

(31) 61/790,136; 14/211,245

(32) 2013.03.15; 2014.03.14

(33) US

(43) 2021.08.31

(62) 202190326; 2014.03.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАТЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Ошоди Шадиа, Джонсон Эми, Лоуренс
Шаун (US)**

(74) Представитель:
**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф., Парамонова К.В. (RU)**

(56) HIROSHI MATSUOKA et al., Improvement of production rate on recombinant CHO cells in two-stage culture, BMC Proceedings [онлайн], июнь 2013, Найдено в Интернет: <doi:10.1186/1753-6561-7-S6-P50>, фиг. 1, таблица 1

WO-A1-0075319

US-A1-20100285533

EP-A1-1321515

SHUANGPING SHI et al., A High-throughput Automated Platform for the Development of Manufacturing Cell Lines for Protein Therapeutics, J Vis Exp. 2011; (55): 3010 [онлайн], 22.09.2011, Найдено в Интернет: <doi:10.3791/3010>, Screening and selection of highly productive clones

(57) В изобретении описана улучшенная не содержащая сыворотки среда для культивирования клеток животных, которую можно использовать для получения представляющего интерес белка. В не содержащие сыворотки среды или среды химически определенного состава для улучшения плотности жизнеспособных клеток, для снижения времени удвоения клеток и для увеличения продукции представляющего интерес белка можно добавлять орнитин или комбинацию орнитина и путресцина.

B1

044302

**044302
B1**

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Изобретение относится к средам для культивирования клеток и для получения рекомбинантных белков. Изобретение конкретно относится к не содержащим сыворотки средам для культивирования рекомбинантных клеток СНО для получения белковых биотерапевтических средств.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Среды для культивирования клеток, содержащие компоненты сыворотки или гидролизата белков (т.е., пептоны и триптоны) имеют длительную историю применения в получении рекомбинантных белков из культивируемых клеток. Эти компоненты содержат факторы роста и широкий спектр других неохарактеризованных элементов, благоприятных для роста и культуры клеток. Однако они также содержат неохарактеризованные элементы, которые уменьшают рост или иным образом отрицательно воздействуют на продукцию рекомбинантного белка. Они также могут являться нежелательным потенциальным источником вариабельности. Несмотря на их недостатки, преимущества использования сывороток и гидролизатов перевешивают определенные недостатки и их широко использовали во многих применениях культур клеток.

Как правило, биологические терапевтические средства (биофармацевтические средства) для человека получают в культурах клеток млекопитающих, в частности в культуре клеток СНО. Присутствие неохарактеризованных или частично охарактеризованных компонентов в этих культурах клеток для получения биофармацевтических средств для применения для человека крайне нежелательно. Использование таких неохарактеризованных или частично охарактеризованных компонентов не только вносит производственные и нормативные несоответствия, но и повышает возможность вирусной или грибковой инфекции продуцирующей культуры.

Другим важным фактором при выборе с культивирования является снижение вариабельности состава и выхода лекарственного продукта от партии к партии. Сыворотки, гидролизаты и другие неопределенные элементы вносят вариабельность в выход, состав и качество партии биофармацевтических препаратов. Качество и чистота элементов среды также может влиять на выход, так как титры лекарственных средств часто частично зависят от поддержания конкретного баланса питательных веществ. Когда относительные количества питательных веществ варьируют от одной партии среды к другой, выход лекарственного средства может варьировать и эта вариабельность может являться неприемлемой или невыгодной.

Использование сред, содержащих сыворотку, или сред на основе гидролизатов вносит трудности в дальнейшую переработку. Концентрация желаемого биофармацевтического средства в культуре, как правило, составляет порядка нескольких грамм на литр. Присутствие сыворотки и гидролизатов в средах может добавлять более 10 г/л неохарактеризованных пептидов и белков, которые необходимо удалить на последующих этапах обработки. Также сыворотка и гидролизаты могут вносить вариабельность в количество металлов и других микроэлементов в средах. Таким образом, удаление сыворотки и гидролизатов из сред для культивирования устраняет эти вариации и потенциальные препятствия для получения и обработки лекарственного вещества.

Наряду с другими преимуществами использования не содержащих сывороток и гидролизатов сред включают снижение стоимости, снижение вариабельности между партиями лекарственных средств и минимизация риска внесения непредусмотренных средств из неопределенных и неочищенных компонентов. Кроме того, когда среды при запуске разных партий являются определенными и одинаковыми, подобным образом можно минимизировать оценочные запуски для тестирования новых партий сред по отношению к используемым средам. Таким образом, в данной области существует необходимость в средах для культивирования клеток млекопитающих, где среды являются химически определенными и не содержат сывороток и гидролизатов, или среды не содержат сывороток и содержат низкие контролируемые уровни гидролизатов, и при этом обеспечивают значительный и активный рост и поддержание клеток и продукцию биофармацевтических лекарственных веществ с высокими титрами.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Авторы изобретения сделали неожиданное открытие, что добавление орнитина, с путресцином или без, в среды для культивирования клеток, которые не содержат сыворотки ("OS" среды) увеличивает жизнеспособность и плотность клеток, уменьшает время удвоения клеток и обеспечивает продукцию белка этими клетками с высокими титрами. Авторы изобретения также выявили, что OS среды, которые содержат низкие или следовые количества белковых гидролизатов или химически определены (например, не содержат белковых гидролизатов), в частности обеспечивают жизнеспособность и плотность восстановленных клеток, время удвоения клеток и продукцию белка с высоким титром.

В одном из аспектов изобретение относится к среде для культивирования клеток, которая не содержит сыворотки и содержит по меньшей мере $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина. В одном из вариантов осуществления орнитин присутствует в среде в концентрации в диапазоне от $0,09 \pm 0,014$ мМ до $0,9 \pm 0,14$ мМ, такой как $0,09 \pm 0,014$ мМ, $0,3 \pm 0,05$ мМ, $0,6 \pm 0,09$ мМ или $0,9 \pm 0,14$ мМ орнитина. В определенных вариантах осуществления среда также содержит по меньшей мере $0,20 \pm 0,03$ мМ путресцина. В определенных вариантах осуществления дополнительный путресцин содержится в концентрации в диапазоне от $0,20 \pm 0,03$ мМ

до $0,714 \pm 0,11$ мМ, такой как $0,20 \pm 0,03$ мМ, $0,35 \pm 0,06$ или $0,714 \pm 0,11$ мМ путресцина. В определенных вариантах осуществления среда содержит $\leq 7,5$ г/л гидролизата. В определенных вариантах осуществления среда не содержит никакого гидролизата.

В одном из вариантов осуществления среда содержит основную среду, которая химически определена, такую как самостоятельно разработанный состав или коммерчески доступная основная среда. В одном из вариантов осуществления полная среда является химически определенной, не содержащей сыворотки и не содержащей гидролизата.

В определенных вариантах осуществления среда, которая находится в ее пригодной концентрации (например, $1 \times$), содержит по меньшей мере 40 ± 6 мМ или по меньшей мере $70 \pm 10,5$ мМ смеси аминокислот или солей аминокислот. В одном из вариантов осуществления среда содержит по меньшей мере 40 мМ смеси аминокислот. В этом или другом варианте осуществления среда содержит по меньшей мере 70 мМ смеси аминокислот. В одном из вариантов осуществления смесь аминокислот (с заметным исключением глутамина, который можно добавлять обратно в среду в качестве добавки в момент использования) содержит аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин.

В определенных вариантах осуществления среда содержит одну или несколько жирных кислот. В одном конкретном варианте осуществления среда содержит смесь жирных кислот (или производные жирных кислот) и альфа-токоферол. Жирные кислоты или производные жирных кислот выбраны из группы, состоящей из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, липоевой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, каприловой кислоты, лауриновой кислоты, гексановой кислоты, лигноцереновой кислоты, миристиновой кислоты, и октановой кислоты.

В определенных вариантах осуществления среда содержит смесь нуклеозидов. В одном из вариантов осуществления среда содержит аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

В определенных вариантах осуществления среда содержит смесь солей. Соли включают двухвалентные катионы, такие как кальций и магний. В одном из вариантов осуществления среда содержит хлорид кальция и сульфат магния. Другие соли могут включать соли фосфата.

В конкретном варианте осуществления среда (1) содержит $\leq 7,5$ г/л гидролизата, (2) не содержит сыворотки, (3) содержит $0,09 \pm 0,014$ мМ, $0,3 \pm 0,05$ мМ, $0,6 \pm 0,09$ мМ или $0,9 \pm 0,14$ мМ орнитина, (4) необязательно дополнительно содержит $0,20 \pm 0,03$ мМ, $0,35 \pm 0,06$ или $0,714 \pm 0,11$ мМ путресцина, (5) содержит по меньшей мере приблизительно 40 мМ или по меньшей мере приблизительно 70 мМ смеси аминокислот, включая аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин, (6) содержит токоферол и смесь жирных кислот, (7) содержит смесь нуклеозидов, включая аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин и (8) содержит соли кальция, магния и фосфата.

В другом аспекте изобретение относится к способу культивирования клеток в среде для культивирования клеток, такой как любой вариант осуществления среды, описанный в указанном выше аспекте. В одном из вариантов осуществления в способе используют этапы размножения или поддержания клетки или клеток в среде, которая (1) содержит $\leq 7,5$ г/л гидролизата или не содержит гидролизата, (2) не содержит сыворотки, (3) содержит орнитин в концентрации по меньшей мере $0,09 \pm 0,014$ мМ, (4) и необязательно содержит путресцин, например, по меньшей мере $0,20 \pm 0,03$ мМ.

В определенных вариантах осуществления клетка или клетки представляют собой клетки млекопитающих, клетки птиц, клетки насекомых, клетки дрожжей или клетки бактерий. В одном из вариантов осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающих, пригодные для получения рекомбинантных белков, такие как клетки CHO или производные CHO-K1. В определенных вариантах осуществления клетки экспрессируют представляющий интерес белок, такой как биотерапевтический белок. Биотерапевтический белок может представлять собой антигенсвязывающий белок, который может содержать Fc-домен. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой слитый белок рецептор-Fc, такой как молекула scFv или молекула-ловушка. Молекулы-ловушки включают белки ловушки VEGF и ловушки IL-1. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой антитело, такое как гуманизованное моноклональное антитело, биспецифическое антитело или фрагмент антитела.

Принимая во внимание положительное действие на рост клеток добавления в не содержащие сыворотки среды орнитина или комбинации орнитина и путресцина, время удвоения клеток, культивируемых этим способом, составляет не более 30 ч. В одном из вариантов осуществления время удвоения клеток составляет не более 24 ч. В одном из вариантов осуществления при сравнении роста клеток в средах, которые содержат менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина (или менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина), время удвоения при росте клеток по этому способу составляет по меньшей мере одну треть от времени удвоения сравниваемой контрольной культуры.

Подобным образом, добавление орнитина, отдельно или комбинации орнитина и путресцина, в не содержащие сыворотки среды позволяет культивируемым клеткам достигать более высокой плотности количества жизнеспособных клеток, чем без добавления орнитина или комбинации орнитина и путресцина. В одном из вариантов осуществления не содержащей сыворотки и не содержащей гидролизата OS среды культура клеток способна достигать плотности количества жизнеспособных клеток, которая по меньшей мере на 15% выше, чем у сходной культуры клеток в сходной среде для культивирования клеток, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина (или менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина). В другом варианте осуществления не содержащей сыворотки и не содержащей гидролизата OS среды культура клеток способна достигать плотности количества жизнеспособных клеток, которая по меньшей мере в 3 раза выше, чем у сходной культуры клеток в сходной среде для культивирования клеток, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина (или менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина).

В другом варианте осуществления способ включает этап добавления в среду для культивирования клеток одной или нескольких добавок в момент использования. В определенных вариантах осуществления добавка в момент использования представляет собой любое одно или несколько из NaHCO_3 , глутамин, инсулин, глюкозы, CuSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , NiSO_4 , Na_4 ЭДТА и цитрата Na_3 . В одном из вариантов осуществления в способе используют этап добавления каждого из приведенных ниже химических веществ, добавляемых в момент использования в среду для культивирования клеток: NaHCO_3 , глутамин, инсулин, глюкоза, CuSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , NiSO_4 , Na_4 ЭДТА и цитрат Na_3 . В определенных вариантах осуществления добавки в момент использования можно добавлять в среду изначально.

В конкретном варианте осуществления, в одном из аспектов предоставлен способ культивирования клеток в не содержащей сыворотки среде, которая содержит (1) орнитин в любой концентрации из $0,09 \pm 0,014$ мМ, $0,3 \pm 0,05$ мМ, $0,6 \pm 0,09$ мМ или $0,9 \pm 0,14$ мМ в среде для культивирования клеток; (2) необязательно дополнительно путресцин в любой концентрации из $0,20 \pm 0,03$ мМ, $0,35 \pm 0,06$ или $0,714 \pm 0,11$ мМ; (3) по меньшей мере приблизительно 40 мМ или по меньшей мере приблизительно 70 мМ смеси аминокислот, содержащей аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин; (4) токоферол и смесь жирных кислот; (6) смесь нуклеозидов, содержащую аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин, и (9) соли кальция, магния и фосфата, где среднее время удвоения клеток, культивируемых этим способом, составляет не более 24 ч или по меньшей мере одну треть время удвоения сравниваемой контрольной культуры; и культивируемые клетки способны к достижению плотности количества жизнеспособных клеток, которая по меньшей мере на 15% выше или по меньшей мере в 3 раза выше, чем у сходной культуры клеток в сходной среде для культивирования клеток, которая содержит менее $0,09 \pm 0,015$ мМ орнитина (или менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина). В другом варианте осуществления культура клеток способна достигать плотности количества жизнеспособных клеток, которая по меньшей мере в 3 раза выше, чем у сходной культуры клеток в сходной среде для культивирования клеток, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина (или менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина). В одном из вариантов осуществления среда содержит $\leq 7,5$ г/л гидролизата; а в другом варианте осуществления не содержит гидролизатов.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения представляющего интерес белка с использованием этапов (1) введения в клетку последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющей интерес белок; (2) отбора клеток, несущих эту последовательность нуклеиновой кислоты; (3) культивирования отобранных клеток в одном из вариантов осуществления не содержащей сыворотки среда для культивирования клеток, описанной в первом аспекте или по любому варианту осуществления способа, описанного во втором аспекте; и (4) экспрессия представляющего интерес белка в клетках, где представляющий интерес белок секретируется в среду. В определенных вариантах осуществления клетки, используемые для получения белка, представляют собой клетки млекопитающих, способные к продукции биотерапевтического средства, такие как клетки CHO, 293 и ВНК или любое их производное. В одном из вариантов осуществления клетки представляют собой клетки CHO, такие как клетки CHO-K1.

В определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой антигенсвязывающий белок. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой белок, содержащий Fc-домен. В некоторых случаях, эти два представляющих интерес белка могут перекрываться, например, так как в случае слитого белка рецептор-Fc, антитела и белка ScFv. Таким образом, в определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой антитело, такое как антитело человека или гуманизированное антитело, фрагмент антитела, такой как Fab или F(ab')_2 , биспецифическое антитело, молекула-ловушка, такая как ловушка VEGF или ловушка IL-1, молекула ScFv, слитый белок растворимого TCR-Fc или т.п.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок способен продуцироваться при среднем семидневном титре, который по меньшей мере на 7% выше, по меньшей мере на 14% выше, по меньшей мере на 80% выше, по меньшей мере в два раза выше или по меньшей мере в три раза выше,

чем средний семидневный титр, получаемый у сходных клеток в не содержащей сыворотки среде для культивирования клеток, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина (или менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцин) ("не OS" среды).

В конкретном варианте осуществления представляющий интерес белок продуцируют посредством (1) введения в клетку СНО последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес белок, такой как антитело или другой антигенсвязывающий белок; (2) отбора клеток, несущих эту последовательность нуклеиновой кислоты; (3) культивирования отобранных клеток в не содержащей сыворотки среде для культивирования клеток, которая содержит (а) орнитин в любой концентрации из $0,09 \pm 0,014$, $0,3 \pm 0,05$ мМ, $0,6 \pm 0,09$ мМ или $0,9 \pm 0,14$ мМ; (b) необязательно дополнительно путресцин в любой концентрации из $0,20 \pm 0,03$ мМ, $0,35 \pm 0,06$ или $0,714 \pm 0,11$ мМ; (c) по меньшей мере 40 мМ или по меньшей мере 70 мМ смеси аминокислот, содержащей: аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин; (d) токоферол и смесь жирных кислот; (e) смесь нуклеозидов, содержащую аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин, и (f) соли кальция, магния и фосфата; и (d) экспрессии представляющего интерес белка в клетках СНО, где представляющий интерес белок секретируется в среду. В определенных вариантах осуществления не содержащая сыворотки среда для культивирования клеток может содержать $\leq 7,5$ г/л гидролизатов или в других вариантах осуществления вообще не содержать гидролизатов.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Заявители сделали неожиданное открытие, что добавление орнитина или комбинации орнитина и путресцина ("OS среда") улучшает плотность жизнеспособных клеток, время удвоения клеток и продукцию белка клетками в культуре клеток относительно не содержащей сыворотки среды, которая содержит очень мало или не содержит орнитина или очень мало или не содержит комбинации орнитина и путресцина ("не OS среда").

Перед описанием культур клеток и способов по настоящему изобретению, следует понять, что это изобретение не ограничено описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, так как такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем изобретении, далее описаны определенные конкретные способы и материалы. Единицы, префиксы и символы могут быть указаны в их принятых в СИ формах. Числовые диапазоны, указываемые в настоящем документе, являются открытыми, что означает, что они включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иначе, формы единственного числа следует понимать, как означающие "по меньшей мере один из". Заглавия разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей, и их не следует рассматривать, как ограничивающие описанный объект изобретения. Способы и указания, описываемые в настоящем документе, как правило, осуществляются общепринятыми известными в данной области способами и как описано в различных общих и более специализированных ссылках, которые цитированы и описаны на всем протяжении настоящего описания, если не указано иначе. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), и Julio E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998) и Dieffenbach and Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995). Все публикации, указанные на всем протяжении этого описания, полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Определения

Как используют в настоящем документе "пептид", "полипептид" и "белок" на всем протяжении описания используют взаимозаменяемо, и они означают молекулу, содержащую два или более аминокислотных остатка, связанные друг с другом пептидной связью. Пептиды, полипептиды и белки также могут включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и АДФ-рибозилирование. Пептиды, полипептиды и белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая основанные на белках лекарственные средства. В частности, пептиды, полипептиды и белки включают антитела и химерные или слитые белки. Пептиды, полипептиды и белки получают посредством рекомбинантных линий клеток животных с использованием способов культивирования клеток.

Как используют в настоящем документе, термин "гетерологичная полинуклеотидная последова-

тельность" относится к полимерам нуклеиновых кислот, кодирующих представляющие интерес белки, такие как химерные белки (такие как молекулы-ловушки), антитела или части антител (например, VH, VL, CDR3), которые получают в качестве биофармацевтического лекарственного вещества. Гетерологичную полинуклеотидную последовательность (например, такую как последовательность, кодирующую химерный белок или последовательность с оптимизированными кодонами, не содержащая интронов последовательность и т.д.) можно получать способами генетической инженерии и вводить в клетку, где она может находиться в качестве эписомы или интегрироваться в геном клетки. Гетерологичная полинуклеотидная последовательность может представлять собой природную последовательность, которую вводят в эктопическую область в геноме продуцирующей клетки. Гетерологичная полипептидная последовательность может представлять собой природную последовательность другого организма, такую как последовательность, кодирующая ортолог человека.

"Антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередуемыми с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает указание на гликозилированные и негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает молекулы антител, получаемые, экспрессируемые, производимые или выделяемые рекомбинантными способами, такие как антитела, выделяемые из клеток-хозяев, трансфицированных для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться более чем с одним различными эпитопами.

Биспецифические антитела в основном описаны в публикации патентной заявки США № 2010/0331527, которая включена в настоящее изобретение в качестве ссылки.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или "фрагмент антитела") относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность к специфическому связыванию антигена. Примеры связывающих фрагментов, включаемых в термин "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), который состоит из домена VH, (vi) выделенная CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с формированием одной белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с формированием одновалентных молекул. В термин "антитела" также включены другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела (см. например, Holliger et al. (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть частью более крупной молекулы иммуноадгезии, формируемой посредством ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или части антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование области сердцевины стрептавидина с получением тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки с получением двухвалентной и биотинилированной молекулы scFv (Kipriyanov et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Части антител, такие как фрагменты Fab и F(ab')₂, можно получать из целых антител общепринятыми способами, такими как расщепление целых антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии можно получать с использованием стандартных технологий рекомбинантной ДНК, широко известных в данной области (см. Sambrook et al., 1989).

Термин "антитело человека" предназначен для включения антител с вариабельными и константными областями, происходящими из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линией человека (например, мутации, вносимые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматических мутаций *in vivo*), например, в CDR и в частности CDR3. Однако, как используют в настоящем документе, термин "антитело человека" не предназначен для включения антител, в которых на каркасные последовательности человека привиты последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь.

Как используют в настоящем документе, термин "рекомбинантное антитело человека" предназначен для включения всех антител человека, которые получают, экспрессируют, производят или выделяют

рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицируемого в клетки-хозяева, антитела, выделяемые из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных антител человека, антитела, выделяемые у животных (например, мышей), которые являются трансгенными по генам иммуноглобулинов человека (см. например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела получаемые, экспрессируемые, производимые или выделяемые любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинант антитела человека содержит переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда используют животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, последовательности аминокислот областей VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и родственны им, в природе могут не присутствовать в репертуаре зародышевой линии антител человека *in vivo*.

"Слитые с Fc белки" содержат часть или целиком два или более белков, один из которых представляет собой часть Fc молекулы иммуноглобулина, которые иначе в природе вместе не встречаются. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полученных из антител полипептидов (включая домен Fc), описано, например, в Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10,19,1 - 10,19,11, 1992. "Слитые белки рецептора и Fc" содержат один или несколько внеклеточных доменов рецептора, связанные с молекулой Fc, которая в определенных вариантах осуществления содержит шарнирную область с последующими доменами иммуноглобулина CH2 и CH3. В определенных вариантах осуществления слитый с Fc белок содержит две или более цепей различных рецепторов, которые связываются с одним или несколькими лигандами. Например, слитый с Fc белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 (например, рилонцепт, который содержит связывающую лиганд IL-1RAcP область, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004), или ловушка VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159).

Среды

Настоящее изобретение относится к не содержащей сыворотки среде, которая пригодна для культивирования клеток и продукции биофармацевтического лекарственного вещества. "Не содержащая сыворотки" используют для среды для культивирования клеток, которая не содержит сывороток животных, таких как эмбриональная телячья сыворотка. Не содержащие сыворотки среды могут содержать $\leq 7,5$ г/л гидролизатов, таких как соевый гидролизат. Настоящее изобретение также относится к химическим средам определенного состава, которые не только не содержат сывороток, но также не содержат гидролизата. "Не содержащие гидролизата" используют для сред для культивирования клеток, которые не содержат экзогенных белковых гидролизатов, таких как гидролизаты животных или растительных белков, например, такие как пептоны, триптоны и т.п.

Удаление сыворотки и уменьшение количества или удаление гидролизатов из среды для культивирования клеток при снижении варибельности от партии к партии и улучшении последующих этапов обработки к сожалению ослабляет рост, жизнеспособность клеток и экспрессию ими белка. Таким образом, химически определенные не содержащие сыворотки и содержащие мало или не содержащие гидролизатов среды для улучшения роста клеток и продукции белка нуждаются в дополнительных ингредиентах. Среды для культивирования клеток по изобретению можно обогащать дополнительными ингредиентами, такими как полиамины или увеличенными концентрациями таких компонентов, как аминокислоты, соли, сахара, витамины, гормоны, факторы роста, буферы, антибиотики, липиды, микроэлементы и т.п., в зависимости от требований культивируемых клеток или желаемых параметров культуры клеток. Например, среда для культивирования клеток по настоящему документу для улучшения роста клеток, жизнеспособности клеток и продукции рекомбинантного белка обогащена орнитинном, путресцином или обоими ("OS среды").

В определенных вариантах осуществления OS среда содержит орнитин в концентрации (выражаемой в микромолях на литр) по меньшей мере приблизительно 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 568, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 700, 750, 800, 850 или 900 мкМ.

В определенных вариантах осуществления среды содержит орнитин в концентрации приблизительно 85, 90, 95, 100, 105, 110, 113 или 115 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит 100 ± 15 мкМ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $15 \pm 2,25$ мг/л орнитина · HCl.

В определенных вариантах осуществления среды содержит орнитин в концентрации приблизительно 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340 или 345 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит 300 ± 45 мкМ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $50 \pm 7,5$ мг/л орнитина $\cdot \text{HCl}$.

В определенных вариантах осуществления среды содержит орнитин в концентрации приблизительно 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685 или 690 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит 600 ± 90 мкМ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит 100 ± 15 мг/л орнитина $\cdot \text{HCl}$.

В определенных вариантах осуществления среды содержит орнитин в концентрации 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, 1000, 1005, 1010, 1015, 1020, 1025, 1030 или 1035 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит 900 ± 135 мкМ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $150 \pm 22,5$ мг/л орнитина $\cdot \text{HCl}$.

В обогащенные орнитином среды необязательно можно добавлять путресцин. Путресцин в очень низких концентрациях включали в качестве компонента в определенные составы сред для культивирования клеток; см. например, WO 2005/028626, в котором описаны 0,02-0,08 мг/л путресцина; патент США № 5426699 (0,08 мг/л); патент США № RE30,985 (0,16 мг/л); патент США № 5811299 (0,27 мг/л); патент США № 5122469 (0,5635 мг/л); патент США № 5063157 (1 мг/л); WO 2008/154014 (≈ 100 мкМ - ≈ 1000 мкМ); патентную заявку США № 2007/0212770 (0,5-30 мг/л полиамина; 2 мг/л путресцина; 2 мг/л путресцина + 2 мг/л орнитина; 2 мг/л путресцина + 10 мг/л орнитина).

В определенных вариантах осуществления среды содержат комбинацию орнитина и путресцина, где путресцин может находиться в комбинации по меньшей мере приблизительно 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 260, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405 или 410 мкМ.

В определенных вариантах осуществления среды содержат путресцин в концентрации приблизительно 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225 или 230 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит 200 ± 30 мкМ путресцина в дополнение к $\geq 90 \pm 14$ мкМ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $30 \pm 4,5$ мг/л путресцина $\cdot 2\text{HCl}$ в дополнение к $\geq 15 \pm 2,25$ мг/л орнитина $\cdot \text{HCl}$.

В определенных вариантах осуществления среды содержат путресцин в концентрации приблизительно 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400 или 405 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит $350 \pm 52,5$ мкМ путресцина в дополнение к $\geq 90 \pm 14$ мкМ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $57 \pm 8,55$ мг/л путресцина $\cdot 2\text{HCl}$ в дополнение к $\geq 15 \pm 2,25$ мг/л орнитина $\cdot \text{HCl}$.

В определенных вариантах осуществления среды содержат путресцин в концентрации приблизительно 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800 или 805 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит 714 ± 105 мкМ путресцина в дополнение к $\geq 90 \pm 14$ мкМ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $115 \pm 17,25$ мг/л путресцина $\cdot 2\text{HCl}$ в дополнение к $\geq 15 \pm 2,25$ мг/л орнитина $\cdot \text{HCl}$.

В определенных вариантах осуществления среды содержат попарную комбинацию любых концентраций путресцина и орнитина, перечисленных выше. В определенных вариантах осуществления среды содержат любую попарную комбинацию приблизительно 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800 или 805 мкМ путресцина и приблизительно 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685 или 690 мкМ орнитина. Например, в одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 700 мкМ путресцина и любую одну из 510, 511, 512 мкМ и последующие орнитина; или 701 мкМ путресцина и любую одну из 510, 511, 512 мкМ и последующие орнитин и т.д. Также, например, среды в одном из вариантов осуществления содержат приблизительно 600 мкМ орнитина и любую одну из 700, 701, 702 мкМ и последующие путресцина; или 601 мкМ орнитина и любую одну из 700, 701, 702 мкМ и последующие путресцина и т.д. В определенных вариантах осуществления среды содержат 702 ± 106 мкМ путресцина + 593 ± 89 мкМ орнитина. В одном конкретном варианте осуществления среды содержат приблизительно 714 мкМ путресцина и 593 мкМ орнитина. В одном из вариантов осуществления среды содержат 115 ± 17 мг/л путресцина $\cdot 2\text{HCl}$ и 100 ± 15 мг/л орнитина $\cdot \text{HCl}$. В одном конкретном варианте осуществления среды содержат 115 мг/л путресцина $\cdot 2\text{HCl}$ и 100 мг/л орнитина $\cdot \text{HCl}$.

В одном из вариантов осуществления и в дополнение к добавлению орнитина или путресцина среды содержат смесь нуклеозидов в суммарной концентрации по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ, по меньшей мере 70 мкМ, по меньшей мере 80 мкМ, по меньшей мере 90 мкМ, по меньшей мере 100 мкМ, по меньшей мере 110 мкМ, по меньшей мере 115 мкМ, по меньшей мере 120 мкМ, по меньшей мере 125 мкМ, по меньшей мере 130 мкМ, по меньшей мере 135 мкМ, по меньшей мере 140 мкМ, по меньшей мере 145 мкМ, по меньшей мере 150 мкМ, по меньшей мере 155 мкМ, по меньшей мере 160 мкМ, по меньшей мере 165 мкМ или по меньшей мере 170 мкМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 174 ± 26 мкМ нуклеозидов. В одном из вариантов осуществления среды содержат пуриновые производные в суммарной концентрации по меньшей мере 40 мкМ, по меньшей мере 45 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 55 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ, по меньшей мере 65 мкМ, по меньшей мере 70 мкМ, по меньшей мере 75 мкМ, по меньшей мере 80 мкМ, по меньшей мере 85 мкМ, по меньшей мере 90 мкМ, по меньшей мере 95 мкМ, по меньшей мере 100 мкМ или по меньшей мере 105 мкМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 106 ± 5 мкМ пуриновых производных. Пуриновые производные включают нуклеозиды гипоксантин и аденозин и гуанозин. В одном из вариантов осуществления среды содержат пиримидиновые производные в суммарной концентрации по меньшей мере 30 мкМ, по меньшей мере 35 мкМ, по меньшей мере 40 мкМ, по меньшей мере 45 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 55 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ или по меньшей мере 65 мкМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 68 ± 5 мкМ пиримидиновых производных. Пиримидиновые производные включают нуклеозиды тимидин, уридин и цитидин. В одном конкретном варианте осуществления среды содержат аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

В дополнение к добавлению орнитина или путресцина в одном из вариантов осуществления среды также содержат аминокислоты в суммарной концентрации по меньшей мере 40 мМ, где в расчет общ сумма не включено количество глутамин. В одном из вариантов осуществления глутамин в среды не добавлен, но его можно добавить в среды в качестве "добавки в момент использования" при культивировании клеток, например, при продукции белка. Таким образом, в определенных вариантах осуществления, таких как в способе культивирования клеток или способе получения представляющего интерес белка, среды можно обогащать глутамином в качестве добавки в момент использования. В одном из таких вариантов осуществления глутамин добавляют в количестве менее чем приблизительно 40 мМ, менее чем приблизительно 35 мМ, менее чем приблизительно 30 мМ, менее чем приблизительно 25 мМ, менее чем приблизительно 20 мМ, менее чем приблизительно 15 мМ, менее чем приблизительно 10 мМ, менее чем приблизительно 8 мМ, менее чем приблизительно 7 мМ, менее чем приблизительно 6 мМ, менее чем приблизительно 5 мМ, менее чем приблизительно 4 мМ, менее чем приблизительно 3 мМ или менее чем приблизительно 2,5 мМ. В одном из вариантов осуществления количество глутамин в средах, которые обогащали глутамином, составляет приблизительно $2 \pm 0,5$ мМ.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат аминокислоты с неполярными боковыми группами в концентрации по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 24 мМ, по меньшей мере 25 мМ, по меньшей мере 26 мМ, по меньшей мере 27 мМ, по меньшей мере 28 мМ, по меньшей мере 29 мМ или по меньшей мере 30 мМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 30 мМ аминокислот с неполярными боковыми группами. В одном из вариантов осуществления на моль общего количества аминокислот, содержащегося в средах, по меньшей мере 32%, по меньшей мере 33%, по меньшей мере 34%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 36%, по меньшей мере 37%, по меньшей мере 38%, по меньшей мере 39%, по меньшей мере 40%, или по меньшей мере 41% представляют собой аминокислоты с неполярными боковыми группами. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно $42 \pm 1\%$ представляют собой аминокислоты с неполярными боковыми группами. Аминокислоты с неполярными боковыми группами включают аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат аминокислоты с незаряженными полярными боковыми группами в концентрации приблизительно от 10 до 34 мМ, приблизительно от 11 до 33 мМ, приблизительно от 12 до 32 мМ, приблизительно от 13 до 31 мМ, приблизительно от 14 до 30 мМ, приблизительно от 15 до 29 мМ, приблизительно от 16 до 28 мМ, приблизительно от 17 до 27 мМ, приблизительно от 18 до 26 мМ, приблизительно от 19 до 25 мМ, приблизительно от 20 до 24 мМ, приблизительно от 21 до 23 мМ или приблизительно 22 мМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит приблизительно 22 мМ аминокислот с незаряженными полярными боковыми группами. В другом варианте осуществления среда содержит приблизительно 12 мМ аминокислот с незаряженными полярными боковыми группами. В одном из вариантов осуществления на моль общего количества аминокислот, содержащегося в средах приблизительно от 14 до 46%, приблизительно от 15 до 45%, приблизительно от 16 до 44%, приблизительно от 17 до 43%, приблизительно от 18 до 42%, приблизительно от 19 до 41%, приблизительно от 20 до 40%, приблизительно от 21 до 39%, приблизительно от 22 до 38%, приблизительно от 23 до 37%, при-

близительно от 24 до 36%, приблизительно от 25 до 35%, приблизительно от 26 до 34%, приблизительно от 27 до 33%, приблизительно от 28 до 32%, приблизительно от 29 до 31% или приблизительно 30% представляют собой аминокислоты с незаряженными полярными боковыми группами. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 30±3% представляют собой аминокислоты с незаряженными полярными боковыми группами. Аминокислоты с незаряженными полярными боковыми группами включают глицин, серии, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат аминокислоты с отрицательным зарядом при pH 6 (например, кислые аминокислоты) в концентрации приблизительно от 4 до 14 мМ, приблизительно от 5 до 13 мМ, приблизительно от 6 до 12 мМ, приблизительно от 7 до 11 мМ, приблизительно от 8 до 10 мМ, приблизительно 9 мМ или приблизительно 4 мМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 9 мМ кислых аминокислот. В одном из вариантов осуществления среды содержат 9±1 мМ кислых аминокислот. В одном из вариантов осуществления на моль общего количества аминокислот, содержащихся в средах приблизительно от 8 до 18%, приблизительно от 9 до 17%, приблизительно от 10 до 16%, приблизительно от 11 до 15%, приблизительно от 12 до 14% или приблизительно 13% представляют собой кислые аминокислоты. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 12,6±1% представляют собой кислые аминокислоты. Кислые аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат аминокислоты с положительным зарядом при pH 6 (например, основные аминокислоты) в концентрации по меньшей мере 3,5 мМ, по меньшей мере 4 мМ, по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 7 мМ, по меньшей мере 8 мМ, по меньшей мере 9 мМ, по меньшей мере 10 мМ или по меньшей мере 11 мМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 11 мМ основных аминокислот. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 11,42±1 мМ основных аминокислот. В одном из вариантов осуществления на моль общего количества аминокислот, содержащихся в средах по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14% или по меньшей мере 15% представляют собой основные аминокислоты. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 16% представляют собой основные аминокислоты. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 15,8±2,4% представляют собой основные аминокислоты. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 21±3,2% представляют собой основные аминокислоты. Основные аминокислоты включают лизин, аргинин и гистидин.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат приблизительно 30 мМ неполярных аминокислот, приблизительно 22 мМ незаряженных полярных аминокислот, приблизительно 9 мМ кислых аминокислот и приблизительно 11 мМ основных аминокислот. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 42% представляют собой неполярные аминокислоты, приблизительно 30% представляют собой незаряженные полярные аминокислоты, приблизительно 13% представляют собой кислые аминокислоты и приблизительно 16% представляют собой основные аминокислоты.

В дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина в одном из вариантов осуществления среды содержат микромолярные количества жирных кислот (или производных жирных кислот) и токоферол. В одном из вариантов осуществления жирные кислоты включают любую одну или несколько из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, липоевой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, каприловой кислоты, лауриновой кислоты, гексановой кислоты, лигноцириновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты. В одном из вариантов осуществления среды содержат токоферол, линолевую кислоту и липоевую кислоту.

В одном из вариантов осуществления среды также содержат смесь витаминов, которая включает другие питательные вещества и незаменимые питательные вещества, в суммарной концентрации по меньшей мере приблизительно 700 мкМ или по меньшей мере приблизительно 2 мМ. В одном из вариантов осуществления смесь витаминов содержит один или несколько из D-биотина, хлорида холина, фолиевой кислоты, миоинозитола, амида никотиновой кислоты, пиридоксина HCl, D-пантотеновой кислоты (hemiCa), рибофлавина, тиамина HCl, витамина B12 и т.п. В одном из вариантов осуществления смесь витаминов включает все из D-биотина, хлорида холина, фолиевой кислоты, миоинозитола, амида никотиновой кислоты, пиридоксина HCl, D-пантотеновой кислоты (hemiCa), рибофлавина, тиамина HCl и витамина B12.

Различные варианты осуществления сред по изобретению включают любую из комбинаций описанных выше вариантов осуществления, включая химически определенные, не содержащие гидролизатов, не содержащие сывороток среды, содержащие орнитин или путресцин в указанных количествах и, в числе прочего, (a) аминокислоты; (b) необязательно нуклеозиды; (c) соли двухвалентных катионов; (d) жирные

кислоты и токоферол и (е) витамины. В определенных вариантах осуществления во все OS среды можно добавлять небольшие количества гидролизатов.

Заявители полагают, что в практическом осуществлении настоящего изобретения можно использовать любые одну или несколько из множества основных сред или их сочетаний, в которые добавляют орнитин или комбинацию орнитина и путресцина. Основные среды общеизвестны в данной области и в числе прочего включают MEME (минимальную поддерживающую среду) Игла (Eagle, Science, 1955, 112(3168):501-504), F12 Хэма (Ham, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1965, 53:288-293), среду F-12 К, среду Дульбекко, модифицированную Дульбекко среду Игла (Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA., 1952 August; 38(8): 747-752), среды DMEM/Хэма F12 1:1, T8 Тройэла, среды A2 Холмса и Вольфа, Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 10:389-401), среды Вэймота (Davidson and Waymouth, Biochem. J., 1945, 39(2): 188-199), среды Е Вильямса (William's et al., Exp. Cell Res., 1971, 69:105 et seq.), RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc., 1967, 199:519-524), среды MCDB 104/110 (Bettger et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1981, 78(9):5588-5592), среды Вентре HL-1, среды с альбумином-глобулином (Org et al., Appl. Microbiol., 1973, 25(1):49-54), среду RPMI-1640, среду RPMI-1641, модифицированную Исков среду Дульбекко, среду Маккоя 5 А, среду Лейбовица L-15 и не содержащие сыворотки среды, такие как EX-CELL™ 300 Series (JRH Biosciences, Lelexa, Kansas), среды с протамином-цинком-инсулином (Weiss et al., 1974, US 4072565), среды с биотином-фолатом (Cartaya, 1978, US Re30,985), среды с трансферрином-жирными кислотами (Baker, 1982, US 4560655), среды с трансферрином-EGF (Hasegawa, 1982, US 4615977; Chessebeuf, 1984, US 4786599) и другие комбинации сред (см. Inlow, US 6048728; Drapeau, US 7294484; Mather, US 5122469; Furukawa, US 5976833; Chen, US 6180401; Chen, US 5856179; Etcheverry, US 5705364; Etcheverry, US 7666416; Ryll, US 6528286; Singh, US 6924124; Luan, US 7429491 и т.п.).

В конкретном варианте осуществления среда является химически определенной и в дополнение к орнитину или комбинации орнитина и путресцина содержит: CaCl₂ 2H₂O; буфер HEPES, KCl; MgSO₄; NaCl; Na₂HPO₄ или другие фосфатные соли; пируват; L-аланин; L-аргинин HCl; L-аспарагин H₂O; L-аспарагиновую кислоту; L-цистеин HCl H₂O; L-глутаминовую кислоту; глицин; L-гистидин HCl H₂O; L-изолейцин; L-лейцин; L-лизин HCl; L-метионин; L-орнитин HCl; L-фенилаланин; L-пролин; L-серин; L-треонин; L-триптофан; L-тирозин 2Na 2H₂O; L-валин; D-биотин; хлорид холина; фолиевую кислоту; миоинозитол; амид никотиновой кислоты; пиридоксин HCl; D-пантотеновую кислоту; рибофлавин; тиамин HCl; витамин B12; p-аминобензойную кислоту; этаноламин HCl; плороник F68; DL-α-токоферола фосфат; линолевую кислоту; Na₂SeO₃; липоевую кислоту и глюкозу и необязательно аденозин; гуанозин; цитидин; уридин; тимидин и гипоксантин 2Na.

В одном из вариантов осуществления исходная осмолярность сред по изобретению составляет 200-500, 250-400, 275-350 или приблизительно 300 мОсм. В течение роста клеток в средах по изобретению и, в частности, после любой подачи питательных веществ по протоколу периодической подпитки, осмолярность культуры может увеличиваться приблизительно до 350, 400, 450 или до 500 мОсм.

В определенных вариантах осуществления, где осмолярность среды определенного состава составляет менее чем приблизительно 300, осмолярность доводят приблизительно до 300, добавляя одну или несколько солей свыше указанного количества. В одном из вариантов осуществления осмолярность увеличивают до желаемого уровня, добавляя один или несколько осмолитов, выбранных из хлорида натрия, хлорида калия, соли магния, соли кальция, кислой соли амина, соли жирной кислоты, бикарбоната натрия, карбоната натрия, карбоната калия, хелатора, который представляет собой соль, сахар (например, галактозу, глюкозу, сахарозу, фруктозу, фукозу и т.д.) и их сочетания. В одном из вариантов осуществления осмолит добавляют в дополнение к его концентрации в компоненте, уже присутствующем в среде определенного состава (например, сахар добавляют в дополнение к концентрации, указанной для компонента сахара).

Любой и каждый из вариантов осуществления сред, описанных выше, а также любых других не содержащих сыворотки сред, содержащих по меньшей мере приблизительно 90 мкМ орнитина (или содержащих комбинацию по меньшей мере приблизительно 100 мкМ орнитина и по меньшей мере приблизительно 200 мкМ путресцина) далее в настоящем изобретении обозначают как обогащенные орнитином ("OS") среды. И наоборот, среды, не содержащие орнитина (или не содержащие комбинации орнитина/путресцина), или среды, содержащие менее 100 мкМ орнитина (или среды, содержащие менее 100 мкМ орнитина и менее 200 мкМ путресцина), далее в настоящем документе обозначают как не обогащенные орнитином ("не OS") среды.

Культура клеток

Настоящее изобретение относится к культуре клеток, содержащей линию клеток, экспрессирующую представляющий интерес белок в OS среде, как описано выше. В одном из вариантов осуществления культура клеток содержит инсулин, который можно добавлять в среды в качестве ингредиента в момент использования или можно включать в составы сред. В одном из вариантов осуществления линия клеток содержит клетки, способные к продукции биотерапевтического белка. Примеры линий клеток, которые как правило используют для продукции белковых биотерапевтических средств, включают в числе прочего первичные клетки, клетки BSC, клетки HeLa, клетки HepG2, клетки LLC-MK, клетки

CV-1, клетки COS, клетки VERO, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки CRFK, клетки RAF, клетки RK, клетки TCMK-1, клетки LLCPK, клетки PK15, клетки LLC-RK, клетки MDOK, клетки ВНК, клетки ВНК-21, клетки CHO, клетки CHO-K1, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки ВНК, клетки 3Т3, клетки 293, клетки RK, клетки Pt.C6 и клетки куриных эмбрионов. В одном из вариантов осуществления линия клеток представляет собой линию клеток CHO или одну или несколько из нескольких конкретных вариантов клеток CHO, оптимизированных для продукции белка в большом масштабе, например, CHO-K1.

"Культура клеток" или "культура" означает рост и размножение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования для клеток млекопитающих известны в данной области. См. например, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих можно культивировать в суспензии или прикрепленными к твердому субстрату. Для культур клеток млекопитающих доступны биореакторы с псевдооживленным слоем, биореакторы с пористыми волокнами, биореакторы с роллерными флаконами, встряхиваемыми колбами или смесительными баками с микроносителями или без и функционирующие в периодическом режиме, в периодическом режиме с подпиткой, непрерывном, полунепрерывном режиме или режиме с орошением. В течение культивирования в культуру непрерывно или с интервалами можно добавлять среды для культивирования клеток или концентрированные питательные среды. Например, культуру можно подпитывать раз в сутки, через сутки, каждые трое суток или можно подпитывать, когда концентрация конкретного компонента среда, который подвергают контролю, падает ниже желаемого диапазона.

Животные клетки, такие как клетки CHO, можно культивировать в культурах малого масштаба, например, в 125 мл контейнерах, содержащих приблизительно 25 мл среды, 250 мл контейнерах, содержащих приблизительно от 50 до 100 мл среды, 500 мл контейнерах, содержащих приблизительно от 100 до 200 мл среды. Альтернативно, культуры могут быть крупномасштабными, такими как, например, 1000 мл контейнеры, содержащие приблизительно от 300 до 1000 мл среды, 3000 мл контейнеры, содержащие приблизительно от 500 мл до 3000 мл среды, 8000 мл контейнеры, содержащие приблизительно от 2000 до 8000 мл среды и 15000 мл контейнеры, содержащие от 4000 до 15000 мл среды. Культуры для производства могут содержать 10000 л среды или более. Крупномасштабные культуры клеток, такие как для клинического производства белковых терапевтических средства, как правило, поддерживают в течение нескольких суток или даже недель, при этом клетки продуцируют желаемый белок(ки). В течение этого времени культуру можно обогащать концентрированной питательной средой, содержащей такие компоненты, как питательные вещества и аминокислоты, которые расходуются в течение культивирования. Концентрированная питательная среда может быть основана на любых составах сред для культивирования клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать большинство компонентов среды для культивирования клеток, например, приблизительно в количестве 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 12×, 14×, 16×, 20×, 30×, 50×, 100×, 200×, 400×, 600×, 800× или даже приблизительно 1000× от их нормального пригодного количества. Концентрированные питательные среды часто используют в процессах культивирования с периодической подпиткой.

В определенных вариантах осуществления среды для культивирования клеток в течение роста клеток или продукции белка обогащают "добавками в момент использования", также известными как добавки, ингредиенты, добавляемые в момент использования, или химические вещества, добавляемые в момент использования. Добавки в момент использования включают один или несколько из факторов роста или других белков, буферов, источников энергии, солей, аминокислот, металлов и хелаторов. Другие белки включают трансферрин и альбумин. Факторы роста, которые включают цитокины и хемокины, в основном известны в данной области и известно, что они стимулируют рост клеток или, в некоторых случаях, дифференцировку клеток. Как правило, фактор роста представляет собой белок (например, инсулин), небольшой пептид или стероидный гормон, такой как эстроген, ДНЭА, тестостерон и т.п. В некоторых случаях, фактор роста может представлять собой искусственное химическое вещество, которое стимулирует клеточную пролиферацию или продукцию белка, такое как, например, тетрагидрофолат (THF), метотрексат и т.п. Неограничивающие примеры белковых и пептидных факторов роста включают ангиопоэтины, морфогенетические белки кости (BMP), выделенный из головного мозга нейротрофический фактор (BDNF), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), выделенный из линий глиальных клеток нейротрофический фактор (GDNF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), ростовой фактор дифференцировки 9 (GDF9), фактор роста гепатоцитов (HGF), выделенный из гепатомы фактор роста (HDGF), инсулин, инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор стимуляции миграции, миостатин (GDF-8), фактор роста нервов (NGF) и другие нейротрофины, выделенный из тромбоцитов фактор роста (PDGF), тромбопоэтин (TPO), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), агонисты путь передачи сигнала wnt, плацентарный фактор роста (PlGF), эмбриональный телячий соматотрофин (FBS), интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 и т.п. В одном из вариантов осуществления среду для культивирования клеток обогащают до-

бавляемым в момент использования фактором роста инсулином. В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина в средах, например, количество инсулина в средах для культивирования клеток после добавления, составляет приблизительно от 0,1 до 10 мкМ. Также в составы сред по определенным вариантам осуществления можно включать одну или несколько добавок в момент использования.

Буферы общеизвестны в данной области. Изобретение не ограничено каким-либо конкретным буфером или буферами, и любой специалист в данной области может выбрать соответствующий буфер или буферную систему для использования с конкретной линией клеток, продуцирующей конкретный белок. В одном из вариантов осуществления буфер, добавляемый в момент использования, представляет собой NaHCO_3 . В другом варианте осуществления буфер, добавляемый в момент использования, содержит NaHCO_3 . В другом варианте осуществления буфер представляет собой HEPES.

Источники энергии для применения в качестве добавки в момент использования в культуре клеток также хорошо известны в данной области. Без ограничения в одном из вариантов осуществления источник энергии, добавляемый в момент использования, представляет собой глюкозу. Учитывая конкретные и определенные требования конкретной линии клеток и продуцируемого белка, в одном из вариантов осуществления глюкозу в среды можно добавлять в концентрации приблизительно от 1 до 20 мМ. В определенных случаях глюкозу можно добавлять на высоких уровнях вплоть до 10 г/л.

Также в области культуры клеток и продукции белка хорошо известны хелаторы. Двумя стандартными хелаторами, используемыми в данной области, являются дигидрат ЭДТА натрия и цитрат, хотя в практическом осуществлении настоящего изобретения можно использовать другие хелаторы. В одном из вариантов осуществления хелатор, добавляемый в момент использования, представляет собой дигидрат ЭДТА натрия. В другом варианте осуществления хелатор, добавляемый в момент использования, представляет собой цитрат, такой как $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.

В одном из вариантов осуществления культуру клеток можно обогащать одной или несколькими аминокислотами, добавляемыми в момент использования, например, такими как глутамин. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток обогащена глутамином, добавляемым в момент использования в конечной концентрации приблизительно от 1 до 13 мМ.

Другие добавки в момент использования включают одну или несколько из различных солей металлов, такие как соли железа, никеля, цинка и меди. В одном из вариантов осуществления среды для культивирования клеток обогащают любым одним или несколькими из сульфата меди, сульфата цинка, хлорида железа и сульфата никеля.

В одном из вариантов осуществления среды для культивирования клеток обогащают любой одной или несколькими или всеми из указанных ниже добавок в момент использования: приблизительно 29,8 мМ NaHCO_3 , приблизительно 2 мМ глутамин, приблизительно 0,86 мкМ инсулин, приблизительно 11,1 мМ глюкоза, приблизительно 6,54 мкМ сульфат цинка, приблизительно 0,168 мкМ сульфат меди, приблизительно 75 мкМ хлорид железа, приблизительно 0,639 мкМ сульфат никеля, приблизительно 85 мкМ ЭДТА и приблизительно 50 мкМ цитрат.

В одном из вариантов осуществления среды обогащают с интервалами в течение культивирования клеток в соответствии с процессом с периодической подпиткой. Культивирование с периодической подпиткой общеизвестно в данной области и применяется для оптимизированной продукции белка (см. Y.M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* 2010 Sep-Oct;26(5):1400-10).

Относительно роста клеток в культуре без орнитина или путресцина жизнеспособность клеток, плотность жизнеспособных клеток и удвоение клеток улучшены. Относительно жизнеспособности клеток, клетки, растущие в OS средах демонстрирует жизнеспособность, которая по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере в 3 раза выше, чем жизнеспособность сходных или идентичных клеток, растущих не в OS средах.

В определенных вариантах осуществления скорость удвоения жизнеспособных клеток млекопитающих в OS средах по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, по меньшей мере на 13%, по меньшей мере на 14%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 16%, по меньшей мере на 17%, по меньшей мере на 18%, по меньшей мере на 19%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 21%, по меньшей мере на 22%, по меньшей мере на 23%, по меньшей мере на 24%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 26%, по меньшей мере на 27%, по меньшей мере на 28%, по меньшей мере на 29%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере в 3 раза выше, чем скорость удвоения клеток млекопитающих, культивируемых не в OS средах. В определенных вариантах осуществления скорость удвоения жизнеспособных клеток млекопитающих в OS средах приблизительно на 10%, 11%, 12%, 13%, 14%,

15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% или 30% выше, чем скорость удвоения клеток млекопитающих не в OS средах.

В определенных вариантах осуществления время удвоения активно проходящих цикл клеток млекопитающих в OS средах составляет менее 30 ч, менее 29 ч, менее 28 ч, менее 27 ч, менее 26 ч, менее 25 ч, менее 24 ч, менее 23 ч, менее 22 ч, менее 21 ч, менее 20 ч, менее 19 ч или менее 18 ч. В определенных вариантах осуществления время удвоения активно растущих клеток млекопитающих в OS средах составляет менее 28 ч. В определенных вариантах осуществления время удвоения клеток млекопитающих в OS средах составляет приблизительно 27 ± 1 ч, приблизительно 26 ± 1 ч, приблизительно 25 ± 1 ч, приблизительно 24 ± 1 ч, приблизительно 23 ± 1 ч, приблизительно 22 ± 1 ч или приблизительно 21 ± 1 ч. В определенных вариантах осуществления время удвоения активно проходящих цикл клеток млекопитающих в OS средах составляет приблизительно 24 ± 1 ч. В определенных вариантах осуществления время удвоения активно делящихся клеток, культивируемых в OS средах по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 16%, по меньшей мере на 17%, по меньшей мере на 18%, по меньшей мере на 19%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 25% меньше, чем время удвоения активно проходящих цикл клеток, культивируемых не в OS средах.

Продукция белка

В дополнение к химически определенным OS средам и способам культивирования клеток в OS средах, настоящее изобретение относится к способам продукции белков, таких как терапевтически эффективное антитело или другое биофармацевтическое лекарственное вещество, в клетках, культивируемых в OS средах.

В определенных вариантах осуществления скорость продукции белка клетками млекопитающих, культивируемыми в OS средах, по меньшей мере на 5%, 10%, 15% или 20% выше, чем скорость продукции белка идентичными клетками млекопитающих, культивируемыми не в OS средах. В определенных вариантах осуществления скорость продукции белка в клетках, культивируемых в OS средах, составляет по меньшей мере 1 пкг/клетку/сутки ("PCD"), по меньшей мере 2 PCD, по меньшей мере 3 PCD, по меньшей мере 4 PCD, по меньшей мере 5 PCD, по меньшей мере 6 PCD, по меньшей мере 7 PCD, по меньшей мере 8 PCD, по меньшей мере 9 PCD, по меньшей мере 10 PCD, по меньшей мере 15 PCD, по меньшей мере 20 PCD, по меньшей мере 25 PCD, по меньшей мере 30 PCD, по меньшей мере 35 PCD, по меньшей мере 40 PCD, по меньшей мере 45 PCD, по меньшей мере 50 PCD, по меньшей мере 75 PCD или по меньшей мере 100 PCD.

В определенных вариантах осуществления выход или титр продукции белка, которые можно выражать в граммах белкового продукта на литр среды для культивирования, из клеток, культивируемых в OS средах, составляет по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 1 г/л, по меньшей мере 1,2 г/л, по меньшей мере 1,4 г/л, по меньшей мере 1,6 г/л, по меньшей мере 1,8 г/л, по меньшей мере 2 г/л, по меньшей мере 2,5 г/л, по меньшей мере 3 г/л, по меньшей мере 3,5 г/л, по меньшей мере 4 г/л, по меньшей мере 4,5 г/л, по меньшей мере 5 г/л, по меньшей мере 5,5 г/л, по меньшей мере 6 г/л, по меньшей мере 6,5 г/л, по меньшей мере 7 г/л, по меньшей мере 7,5 г/л, по меньшей мере 8 г/л, по меньшей мере 8,5 г/л, по меньшей мере 9 г/л, по меньшей мере 9,5 г/л, по меньшей мере 10 г/л или по меньшей мере 20 г/л.

В определенных вариантах осуществления белковый продукт (представляющий интерес белок) представляет собой антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, полиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, фрагмент Fab или фрагмент $F(ab')_2$, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой антитело IgG4.

В определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит молекулу Fc и другой домен (например, слитый с Fc белок). В определенных вариантах осуществления слитый с Fc белок представляет собой слитый белок рецептор-Fc, который содержит один или несколько из одного или нескольких внеклеточных доменов рецептора, связанных с молекулой Fc. В определенных вариантах осуществления молекула Fc содержит шарнирную область с последующими доменами CH2 и CH3 IgG. В определенных вариантах осуществления слитый белок рецептор-Fc содержит два или более различных рецепторных цепи, которые связываются с одним лигандом или несколькими лигандами. Например, слитый с Fc белок представляет собой ловушку, например, такую как ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит связывающую лиганд IL-1RAcP область, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки) ловушка VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159).

Настоящее изобретение для продукции белка не ограничено конкретным типом клеток. Примеры типов клеток, подходящих для продукции белка, включают клетки млекопитающих, клетки насекомых,

клетки птиц, клетки бактерий и клетки дрожжей. Клетки могут представлять собой стволовые клетки или рекомбинантные клетки, трансформированные вектором для рекомбинантной экспрессии генов, или клетки, трансфицированные вирусом для продукции вирусных продуктов. Клетки могут содержать рекомбинантную гетерологичную полинуклеотидную конструкцию, кодирующую представляющий интерес белок. Эта конструкция может представлять собой эписому, или она может представлять собой элемент, который физически интегрирован в геном клетки. Также клетки могут продуцировать представляющий интерес белок без кодирования этого белка гетерологичной полипептидной конструкцией. Другими словами, клетка может кодировать представляющий интерес белок в природе, например, В-клетка, продуцирующая антитело. Клетки также могут являться первичными клетками, такими как клетки куриного эмбриона или первичными линиями клеток. Примеры пригодных клеток включают клетки BSC, клетки LLC-MK, клетки CV-1, клетки COS, клетки VERO, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки CRFK, клетки RAF, клетки RK, клетки TCMK-1, клетки LLCPK, клетки PK15, клетки LLC-RK, клетки MDOK, клетки BHK-21, курица embryo клетки, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки BHK, клетки 293, клетки RK, клетки Per.C6 и клетки CHO. В различных вариантах осуществления линия клеток представляет собой производное клеток CHO, такое как мутантные линии CHO-K1, CHO DUX B-11, CHO DG-44, Veggie-CHO, GS-CHO, S-CHO или CHO Lec.

В одном из вариантов осуществления клетка, которая представляет собой клетку CHO, экспрессирует белок эктопически. В одном из вариантов осуществления белок содержит область тяжелой цепи иммуноглобулина, такую как область CH1, CH2 или CH3. В одном из вариантов осуществления белок содержит область CH2 и CH3 иммуноглобулина человека или грызуна. В одном из вариантов осуществления белок содержит область CH1, CH2 и CH3 иммуноглобулина человека или грызуна. В одном из вариантов осуществления белок содержит шарнирную область и область CH1, CH2 и CH3. В конкретном варианте осуществления белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления белок содержит вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления белок представляет собой антитело, такое как антитело человека, антитело грызуна или химерное антитело человека/грызуна (например, человека/мышы, человека/крысы или человека/хомяка).

Фазу продукции можно проводить в культуре любого масштаба от отдельных колб и колб на шейкере или одноразовых реакторов Wave bags, до однолитровых биореакторов и до крупномасштабных промышленных биореакторов. Крупномасштабный процесс можно проводить в объеме приблизительно от 100 до 20000 л или более. Для контроля продукции белка можно использовать одно или несколько средств, таких как температурный сдвиг или химическая индукция. Фаза роста может происходить при более высокой температуре, чем фаза продукции. Например, фаза роста может происходить при одной температуре приблизительно от 35 до 38°C, а фаза продукции может происходить при другой температуре приблизительно от 29 до 37°C, необязательно приблизительно от 30 до 36°C или приблизительно от 30 до 34°C. Кроме того, вместе, до или после температурного сдвига можно добавлять химические индукторы продукции белка, такие как кофеин, бутират, тамоксифен, эстроген, тетрациклин, доксициклин и бисацетамид гексаметилен (HMBA). Если индукторы добавляют после температурного сдвига, их можно добавлять в пределах от одного часа до пяти суток после температурного сдвига, например, в пределах от одних до двух суток после температурного сдвига. Продуцирующие культуры клеток можно запускать в качестве непрерывной подпитываемой системы культивирования, как в хемостате (см. C. Altamirano et al., *Biotechnol Prog.* 2001 Nov-Dec; 17(6): 1032-41), или в соответствии с процессом с периодической подпиткой (Huang, 2010).

Изобретение пригодно для улучшения продукции белка способами культивирования клеток. Линии клеток, используемые по изобретению, можно генетически конструировать для экспрессии полипептида, представляющего коммерческий или научный интерес. Генетическая инженерия линий клеток включает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток рекомбинантной полинуклеотидной молекулой или иной способ изменения (например, посредством гомологичной рекомбинации и активации генов или слияния рекомбинантной клетки с нерекомбинантной клеткой) для того, чтобы вызвать экспрессию клеткой-хозяином желаемого рекомбинантного полипептида. Способы и векторы для генетической инженерии клеток или линий клеток для экспрессии представляющего интерес полипептида хорошо известны специалистам в данной области; например, различные способы проиллюстрированы в *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988 и ежеквартальные обновления); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R. J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69. Широкий спектр линий клеток, подходящий для выращивания в культуре, доступен в American Type Culture Collection (Manassas, Va.) и у коммерческих поставщиков. Примеры линий клеток, широко используемых в промышленности, включают клетки VERO, BHK, HeLa, CV1 (включая Cos), MDCK, 293, 3T3, клетки миеломных линий (например, NSO, NSI), PC12, клетки WI38 и клетки яичника китайского хомяка (CHO). Клетки CHO широко используют для получения комплексных рекомбинантных белков, таких как цитокины, факторы свертывания крови и антитела (Brasel et al. (1996), *Blood* 88:2004-2012; Kaufman et al. (1988), *J.Biol Chem*

263:6352-6362; McKinnon et al. (1991), J Mol Endocrinol 6:231-239; Wood et al. (1990), J Immunol. 145:3011-3016). Желательными линиями клеток-хозяев СНО являются мутантные линии клеток с дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR) (Urlaub et al. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220), DXBI 1 и DG-44, так как эффективная система селекции и амплификации экспрессии гена на основе DHFR обеспечивает высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка в этих клетках (Kaufman R.J. (1990), Meth Enzymol 185:537-566). Кроме того, с этими клетками легко обращаться в качестве адгезивных или суспензионных культур, и они демонстрируют относительно хорошую генетическую стабильность. Клетки СНО и белки, рекомбинантно экспрессируемые ими, всесторонне охарактеризованы и одобрены для применения в клиническом и коммерческом производстве органами регулирования. В определенных вариантах осуществления линии клеток СНО представляют собой линии клеток, как описано в публикациях патентных заявок США №№ 2010/0304436 A1, 2009/0162901 A1 и 2009/0137416 A1 и патентах США №№ 7455988 B2, 7435553 B2 и 7105348 B2.

Настоящее изобретение не ограничено объемом указанных вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе, которые предназначены для иллюстрации отдельных аспектов или вариантов осуществления изобретения. В объем изобретения входят функционально эквивалентные способы и компоненты.

Специалистам в данной области из приведенного выше описания и сопровождающих фигур в дополнение к описанному в настоящем документе очевидны различные модификации изобретения. Такие модификации находятся в объеме изобретения.

Изобретение частично основано на открытии, что добавление орнитина или комбинации орнитина и путресцина в не содержащие сыворотки среды для культивирования клеток приводит к увеличенному росту клеток, жизнеспособности и продукции полипептидов в рекомбинантно сконструированных линиях клеток животных (или природных клеток), экспрессирующих представляющий интерес белок, таким образом, увеличивая надежность культуры, улучшая выход представляющего интерес полипептида.

Пример 1. Увеличенная плотность культуры жизнеспособных клеток.

В 250 мл встряхиваемую колбу проводили инокуляцию из затравочной культуры линии рекомбинантных продуцирующих антитела клеток, происходящих из СНО K1. Инокулированные клетки выращивали при 36,5°C в течение семи суток и подпитывали глюкозой на сутки три и пять. Клетки выращивали в каждой из двух отдельных химически определенных (не содержащих гидролизата и не содержащих сыворотки) средах. Первая среда содержала приблизительно 75 мМ аминокислот (среда 1), вторая среда содержала приблизительно 40 мМ аминокислот (среда 2), и оба состава содержали не более 2,5 мкМ (0,4 мг/л) путресцина. Другую группу условий среды получали, добавляя в среду 2 соевый гидролизат в концентрации 7,5 г/л. В каждую из трех контрольных сред добавляли приблизительно 593 мкМ орнитина (в виде 100 мг/л L-орнитина ·HCl) или комбинация приблизительно 593 мкМ орнитина (в виде 100 мг/л L-орнитина ·HCl) и приблизительно 714 мкМ путресцина (в виде 115 мг/л путресцина ·2HCl). На сутки 3, 5 и 7 отбирали аликвоты по 3 мл культур и подсчет количества жизнеспособных клеток проводили с использованием исключения трипанового синего на устройстве BioProfile FLEX™ (Nova Biomedical). В начальные сутки все культуры содержали $0,8 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на мл. Для данных сред (среда 1, среда 2 или среда 2+ соя) количества жизнеспособных клеток через период семь суток продемонстрировали, что у клеток СНО, растущих в средах, дополненных орнитином или орнитином и путресцином, повышена плотность жизнеспособных клеток. Эффект в течение семисуточного периода был особенно выражен в не содержащих гидролизатов средах (например, от 2-кратного до 4-кратного или более возрастание плотности жизнеспособных клеток). Не содержащая гидролизата OS среда 2 действовала сравнимо с содержащей сою не OS средой 2, что указывает на то, что преимущество соевого гидролизата для роста клеток можно воспроизвести посредством замены на орнитин. Также наблюдали увеличенную плотность клеток при добавлении орнитина или орнитина и путресцин в среду 2+ соя. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

средняя плотность жизнеспособных клеток в культуре (10^6 клеток на миллилитр) и кратность увеличения по сравнению с исходным уровнем*

Добавка:	Время	Без добавок	Орнитин	Орнитин + путресцин
Среда 1	3 суток	2,4 / 1×	6,1 / 2,5×	5,0 / 2,1×
	5 суток	3,4 / 1×	12,6 / 3,7×	12,4 / 3,6×
	7 суток	3,6 / 1×	7,0 / 1,9×	6,8 / 1,9×
Среда 2	3 суток	1,7 / 1×	5,1 / 3,0×	5,2 / 3,1×
	5 суток	2,0 / 1×	7,6 / 3,8×	8,0 / 4,0×
	7 суток	1,6 / 1×	5,9 / 3,7×	5,8 / 3,6×
Среда 2 + соевый гидролизат	3 суток	5,2 / 1×	5,4 / 1×	4,7 / 0,9×
	5 суток	7,7 / 1×	9,3 / 1,2×	9,3 / 1,2×
	7 суток	н.д.	9,6 / н.д.	9,1 / н.д.

*Исходный уровень представляет собой среды без добавок для данного состава среда на данные сутки.

Авторы также изучили действие различных количеств орнитина ·HCl (например, 50 мг/мл, 100 мг/мл и 150 мг/мл) на плотность жизнеспособных клеток в среде 3, которая содержит приблизительно 75 мМ аминокислот и 0,4 мг/л путресцина HCl ("среда 3"). Для инокуляции 50 мл биореакторов TubeSpin® (TPP) при $0,4 \times 10^6$ клеток/мл в рабочем объеме 15 мл использовали одну культуру из системы посевных ферментеров линии рекомбинантных продуцирующих антитела клеток, происходящих из CHO K1. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C в течение трех суток. На сутки 3 отбирали аликвоты по 3 мл культур и определение количеств жизнеспособных клеток проводили с использованием исключения трипанового синего на устройстве BioProfile FLEX™ (Nova Biomedical). Все три уровня орнитина улучшали плотность клеток в среднем (N=3) немногим более чем в два раза. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

плотность жизнеспособных клеток в культуре (10^6 клеток на миллилитр) и кратность увеличения по сравнению с исходным уровнем*

	Контроль	Орнитин HCl		
Концентрация (мг/мл)	0	50	100	150
Плотность жизнеспособных клеток (10^6 клетки/мл)	1,3	3,2	3,1	3,1
Кратность увеличения по сравнению с контролем	1×	2,5×	2,4×	2,4×

*Исходный уровень представляет собой среду 3 без добавок.

Пример 2. Улучшенное время удвоения культуры клеток.

В условиях различных сред для культивирования клеток определяли время удвоения линии рекомбинантных продуцирующих антитела клеток, происходящих из клеток CHO K1, в логарифмической фазе роста. Культуры из системы посевных ферментеров пересеивали при 36,5°C в 250 мл встряхиваемые колбы в течение периода 14 суток в каждой из трех отдельных сред: в среде 1, среде 2 и среде 2, содержащей соевый гидролизат (среда 2+ соя). На сутки 0 и во время посева в системе посевных ферментеров (каждые 2 или 3 суток) для каждого условия отбирали аликвоты по 1 мл и определение количеств жизнеспособных клеток проводили с использованием исключения трипанового синего на устройстве CDV™ (Nova Biomedical). Среду 1 тестировали без добавок или обогащенную орнитином ·HCl в концентрации 100 мг/л или путресцином ·2HCl в концентрации 115 мг/л и орнитином ·HCl в концентрации 100 мг/л. Среду 2 с низким содержанием путресцина ·2HCl (0,4 мг/л) тестировали без добавок или обогащенную орнитином ·HCl в концентрации 100 мг/л или путресцином ·2HCl в концентрации 115 мг/л и орнитином ·HCl в концентрации 100 мг/л. Результаты приведены в табл. 3 и 4. Для достижения значительного роста было необходимо обогащение среды 1 орнитином с путресцином или без. Обогащение не содержащей гидролизата среды 2 орнитином или орнитином + путресцин уменьшало время удвоения клеток приблизительно на величину от 25 до 30%. Также времена удвоения уменьшались после добавления орнитина или орнитина + путресцин в содержащую гидролизат среду 2 хоть и в меньшей степени.

Таблица 3

время удвоения клеток (часы) и приблизительный процент уменьшения времени удвоения относительно исходного уровня* в среде 1

Добавка	Среда 1	
*Отсутствует	75	
Орнитин	23	69%
Путресцин + орнитин	21	72%

*Исходный уровень представляет собой среду 1 без добавок.

Таблица 4

время удвоения клеток (часы) и приблизительный процент уменьшения времени удвоения относительно исходного уровня* в среде 2

Добавка	Среда 2		Среда 2 + соя	
	время удвоения (часы)	процент уменьшения	время удвоения (часы)	процент уменьшения
*Без добавок	27		22,5	
Орнитин	21	22%	20,5	8,9%
Путресцин + орнитин	19,5	28%	21	6,7%

*Исходный уровень представляет собой среду 2 без добавок.

Пример 3. Увеличенные титры антител.

После установления того, что добавление орнитина или орнитина + путресцин улучшает клеточную пролиферацию и плотность жизнеспособных клеток в культуре авторы дополнительно исследовали влияние этих условий на титры продуцируемых рекомбинантных белков. Авторы исследовали экспрессию и секрецию рекомбинантного IgG происходящей из СНО-К1 линией клеток. В этом эксперименте средний титр антител в культуре определяли на сутки семь в различных форматах сред. Как указано выше, тестировали среду 1 с низким содержанием путресцина (0,4 мг/л путресцина ·2HCl), орнитина (100 мг/л орнитина ·HCl) и с орнитином и путресцином (100 мг/л орнитина ·HCl /115 мг/л путресцина ·2HCl). Также тестировали среду 2 и среду 2+ соя с низким уровнем путресцина (0,4 мг/л путресцина ·2HCl), орнитина (100 мг/л орнитина ·HCl) и с орнитином и путресцином (100 мг/л орнитина ·HCl /115 мг/л путресцина ·2HCl). Во всех случаях добавление орнитина или орнитина и путресцин на уровне выше 0,4 мг/л приводило к значительно более высоким титрам белка, например, по меньшей мере приблизительно в два раза более высоким титрам. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

средние семисуточные титры антител и приблизительная кратность увеличения (x) титров относительно исходного уровня*

Добавка	среда 1		среда 2		среда 2 + соя	
	титр (г/л)	кратность	титр (г/л)	кратность	титр (г/л)	кратность
Без добавок*	0,31 г/л	1×	0,29 г/л	1×	0,54 г/л	1×
Орнитин	0,94 г/л	3,0×	0,65 г/л	2,2×	0,98 г/л	1,8×
Путресцин + орнитин	0,95 г/л	3,1×	0,64 г/л	2,2×	1,07 г/л	2×

* Исходный уровень установлен на титр в средах каждого типа без добавок.

Авторы также исследовали влияние различных количеств орнитина ·HCl (например, 50 мг/мл, 100 мг/мл и 150 мг/мл) в среде 3 на продукцию антител. Для инокуляции 50 мл биореакторов TubeSpin® (TRP) при $0,4 \times 10^6$ клеток/мл в рабочем объеме 15 мл использовали одну культуру из системы посевных ферментеров линии рекомбинантных продуцирующих антитела клеток, происходящих из СНО К1. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C в течение трех суток. Все три уровня добавляемого орнитина улучшали титры антител в среднем (N=3) немногим более 50%. Результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

титры антител (грамм на литр) и кратность увеличения титров по сравнению с исходным уровнем*

	Контроль	Орнитин HCl		
		50	100	150
Концентрация добавки (мг/мл)	0			
Титр антитела (мг/мл)	79	120	127	124
Кратность увеличения относительно контроля	1×	1,5×	1,6×	1,6×

*Исходный уровень представляет собой среду 3 без добавок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ культивирования СНО-К1 клеток, включающий этапы:

(а) размножения или поддержания клеток СНО-К1 в среде для культивирования клеток с получением культуры клеток, где указанная среда для культивирования клеток не содержит сыворотки и содержит гидролизаты и полиамины, причем культура клеток поддерживается при одной температуре приблизительно от 35 до 38°C в течение фазы роста; и

(б) размножения или поддержания культуры клеток в среде для культивирования клеток при другой температуре приблизительно от 29 до 37°C в течение фазы продукции, причем клетки СНО-К1 экспрессируют слитый белок-ловушку VEGF.

2. Способ по п.1 где этап (б) включает культивирование культуры клеток при температуре приблизительно от 30 до 34°C в течение фазы продукции.

3. Способ по п.1 или 2, где среда для культивирования клеток содержит орнитин или комбинацию орнитина и путресцина.

4. Способ по любому из пп.1-3, где среда для культивирования клеток содержит $\geq 0,09 + 0,014$ mM

орнитина.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что среда для культивирования клеток содержит орнитин в концентрации от $0,09+0,014$ мМ до $0,9+0,14$ мМ.

6. Способ по любому из пп.1-5, где среда для культивирования клеток содержит $0,6+0,09$ мМ орнитина и $0,714+0,11$ мМ путресцина.

7. Способ по любому из пп.1-6, где белок-ловушка VEGF продуцируется с титром по меньшей мере 100 мг/л.

8. Способ по любому из пп.1-6, где белок-ловушка VEGF продуцируется с титром по меньшей мере 1 г/л.

9. Способ по любому из пп.1-8, где среда для культивирования содержит количество гидролизата сои менее или равное 7,5 г/л.

10. Способ по любому из пп.1-9, где среда для культивирования клеток содержит:

(a) $>40\pm 6$ мМ смеси аминокислот или их солей;

(b) одну или несколько жирных кислот;

(c) смесь нуклеозидов; или

(c) один или несколько двухвалентных катионов.

11. Способ по п.10, в котором:

(a) смесь аминокислот или их солей включает аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин;

(b) одна или несколько жирных кислот выбраны из группы, состоящей из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, липоевой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, каприловой кислоты, лауриновой кислоты, гексановой кислоты, лигноцериновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты.

(c) смесь нуклеозидов содержит один или несколько аденозинов, гуанозинов, цитидинов, уридинов, тимидинов или гипоксантинов; или

(c) двухвалентный катион представляет собой Ca^{2+} , Mg^{2+} или оба.

12. Способ по любому из пп.1-11, где способ включает культивирование клеток в периодическом режиме с подпиткой, непрерывном, полунепрерывном режиме или режиме с орошением.

13. Способ по любому из пп.1-12, где белок-ловушка VEGF представляет собой афлиберцепт.

