

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045820**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.28**

(51) Int. Cl. **C07K 14/71** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202192893**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.04.22**

---

(54) **СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

---

(31) **62/837,263**

(32) **2019.04.23**

(33) **US**

(43) **2022.02.03**

(86) **PCT/US2020/029370**

(87) **WO 2020/219582 2020.10.29**

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

(72) Изобретатель:  
**Сюз Вэй, Чэнь Джон, Скотт Каролин,  
Лони Теодор, Голден Натаниэл (US)**

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

(56) **WO-A1-2017024062**

**EP-A1-3431588**

**TODD M. BAVARESE ET AL.:**

"Conversion of 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine and 5'-Deoxy-5'-methylthioinosine to Methionine in Cultured Human Leukemic Cells1", **CANCER RESEARCH** Williams General Hospital [Biochemical Pharmacology, 1 October 1983 (1983-10-01), pages 4699-4702, XP055707018, Retrieved from the Internet: URL:<https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/43/10/4699.full.pdf>, page 4699, column 2, paragraph 4 - page 4670, column 2, paragraph 1

---

(57) В изобретении предлагаются среды для культивирования клеток, а также способы применения сред для культивирования клеток и продуцирования белка из клеток.

---

**B1**

**045820**

**045820**

**B1**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение в основном относится к среде для культивирования эукариотических клеток и продуцированию из нее природных и рекомбинантных продуктов.

### **Уровень техники**

Технология производства клеточных культур широко применяется для изготовления биофармацевтических препаратов. По мере увеличения спроса на биофармацевтические препараты, также значительно выросла потребность в увеличении уровня роста клеток, жизнеспособности и продукции белка. Сейчас много усилий уделяется способам и стратегиям выращивания, подкормки и поддержания клеточных культур.

Новые способы культивирования клеток, которые обеспечивают равномерное постепенное повышение уровня продукции рекомбинантных белков, являются ценными, учитывая проблемы и затраты, связанные с крупномасштабными процессами культивирования клеток, а также растущую потребность в больших количествах и более низких затратах на биологические продукты. Поэтому необходима оптимизация процессов культивирования клеток, экспрессии рекомбинантного полипептида, титра и жизнеспособности клеток, что может способствовать получению более высокого выхода продукции, тем самым снижая затраты, связанные с производством белковых терапевтических средств.

### **Сущность изобретения**

Интенсификация разработки, рост производства и продаж биофармацевтических продуктов на белковой основе привели к увеличению спроса на способы продуцирования, которые могут оптимизировать продуцирование биофармацевтических продуктов.

Описанные в данном документе варианты осуществления удовлетворяют вышеупомянутые требования путем предоставления способов и сред для производства таких биофармацевтических продуктов.

В данном документе, по меньшей мере частично, описана среда для культивирования эукариотических клеток.

В одном типовом варианте осуществления описанная среда для культивирования эукариотических клеток может включать базальную среду. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать 5-метилтиоаденозин. В другом аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина. В еще одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать от около 10 до около 200 нМ 5-метилтиоаденозина. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать никотинамид. В другом аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать по меньшей мере около 50 нМ никотинамида. В еще одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать около 2000 нМ 5-никотинамида. В одном аспекте этого варианта осуществления титр белка, выращенного в среде для культивирования клеток, по меньшей мере на около 2% больше, чем в другой среде для культивирования клеток, не содержащей по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина. В другом аспекте этого варианта осуществления титр белка, выращенного в среде для культивирования клеток, по меньшей мере на около 2% больше, чем в другой среде для культивирования клеток, не содержащей по меньшей мере около 50 нМ никотинамида. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать одну или большее количество кислот, выбранных из молочной кислоты, фенолмолочной кислоты, индолилуксусной кислоты, янтарной кислоты, альфа-гидроксиизовалериановой кислоты, альфа-гидроксиизокапроновой кислоты, 2-(4-гидроксифенил)молочной кислоты или 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислоты, солей этих кислот, сложных эфиров этих кислот и их комбинаций. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать сахара, аминокислоты, витамины, соли, следовые ионы металлов, пурины и/или пиримидины. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать соли или сложные эфиры 5-метилтиоаденозина. В другом аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать соли или сложные эфиры никотинамида. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может иметь рН от около 6,5 до около 8. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток не содержит белка животного происхождения. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть бессывороточной средой. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть средой определенного химического состава.

В одном типовом варианте осуществления среда для культивирования эукариотических клеток может включать питательную среду. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать 5-метилтиоаденозин. В другом аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина. В еще одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать от около 10 до около 200 нМ 5-метилтиоаденозина. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать никотинамид. В другом аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать по

меньшей мере около 50 нМ никотинамида. В еще одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать от около 50 до около 2000 нМ 5-никотинамида. В альтернативном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать 5-метилтиоаденозин и никотинамид. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать одну или большее количество кислот, выбранных из молочной кислоты, фенилмолочной кислоты, индолилуксусной кислоты, янтарной кислоты, альфа-гидроксиизовалериановой кислоты, альфа-гидроксиизокапроновой кислоты, 2-(4-гидрокси-фенил)молочной кислоты или 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислоты, солей этих кислот, сложных эфиров этих кислот и их комбинаций. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать сахара, аминокислоты, витамины, соли, следовые ионы металлов, пурины и/или пиримидины. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать соли или сложные эфиры 5-метилтиоаденозина. В другом аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать соли или сложные эфиры никотинамида. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может иметь рН от около 6,5 до около 8. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток не содержит белка животного происхождения. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть бессывороточной средой. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть средой определенного химического состава. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может необязательно содержать никотинамид. В одном аспекте этого варианта осуществления титр белка, выращенного в среде для культивирования клеток, по меньшей мере на около 2% больше, чем в другой среде для культивирования клеток, не содержащей по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина. В другом аспекте этого варианта осуществления титр белка, выращенного в среде для культивирования клеток, по меньшей мере на около 2% больше, чем в другой среде для культивирования клеток, не содержащей по меньшей мере около 50 нМ никотинамида.

В настоящем описании, по меньшей мере частично, представлен способ продуцирования белка.

В одном типовом варианте осуществления способ продуцирования белка может включать культивирование эукариотических клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, в среде для продуцирования культуры клеток и подкормку эукариотических клеток с применением обогащенной среды, содержащей 5-метилтиоаденозин, в течение определенного периода времени. В одном аспекте этого варианта осуществления обогащенная среда может содержать по меньшей мере около 1 нМ 5-метилтиоаденозина. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может содержать одну или большее количество кислот, выбранных из молочной кислоты, фенилмолочной кислоты, индолилуксусной кислоты, янтарной кислоты, альфа-гидроксиизовалериановой кислоты, альфа-гидроксиизокапроновой кислоты, 2-(4-гидрокси-фенил)молочной кислоты или 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислоты, солей этих кислот, сложных эфиров этих кислот и их комбинаций. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может содержать сахара, аминокислоты, витамины, соли, следовые ионы металлов, пурины и/или пиримидины. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может содержать соли или сложные эфиры 5-метилтиоаденозина. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может иметь рН от около 6,5 до около 8. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры не содержит белка животного происхождения. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может быть бессывороточной средой. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может быть средой определенного химического состава. В одном аспекте этого варианта осуществления эукариотические клетки могут быть выбраны из клеточных линий почки новорожденного хомячка, клеточных линий яичников китайского хомячка, клеточных линий миеломы семейства мышинных, клеточных линий миеломы мыши, клеточных линий эмбриональных почки человека, клеточных линий, полученных из сетчатки глаза человека, и/или клеточных линий амниоцитов. В одном аспекте этого варианта осуществления белок может быть выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента или производного, слитого белка и физиологически активного белка, не являющегося антителом. В одном аспекте этого варианта осуществления указанный способ может обеспечить титр белка, который является по меньшей мере на около 2% больше, чем титр белка в среде для продуцирования клеточной культуры, не содержащей по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина. В одном аспекте этого варианта осуществления обогащенная среда может необязательно содержать никотинамид. В одном аспекте этого варианта осуществления способ продуцирования белка может быть способом периодического культивирования с подпиткой.

В одном типовом варианте осуществления способ продуцирования белка может включать культивирование эукариотических клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, в среде для продуцирования культуры клеток и подкормку эукариотических клеток с применением обогащенной среды, содержащей никотинамид, в течение определенного периода времени. В одном аспекте этого варианта осуществления обогащенная среда может содержать по меньшей мере около 5 нМ никотинамида.

В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может содержать одну или большее количество кислот, выбранных из молочной кислоты, фенилмолочной кислоты, индолилуксусной кислоты, янтарной кислоты, альфа-гидроксиизовалериановой кислоты, альфа-гидроксиизокапроновой кислоты, 2-(4-гидроксифенил)молочной кислоты или 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислоты, солей этих кислот, сложных эфиров этих кислот и их комбинаций. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может содержать сахара, аминокислоты, витамины, соли, следовые ионы металлов, пурины и/или пиримидины. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для продукции клеточной культуры может содержать соли или сложные эфиры никотинамида. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может иметь рН от около 6,5 до около 8. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры не содержит белка животного происхождения. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может быть бессывороточной средой. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для продуцирования клеточной культуры может быть средой определенного химического состава. В одном аспекте этого варианта осуществления эукариотические клетки могут быть выбраны из клеточных линий почки новорожденного хомячка, клеточных линий яичников китайского хомячка, клеточных линий миеломы семейства мышинных, клеточных линий миеломы мыши, клеточных линий эмбриональных почки человека, клеточных линий, полученных из сетчатки глаза человека, и/или клеточных линий амниоцитов. В одном аспекте этого варианта осуществления белок может быть выбран из группы, состоящей из антигена или его фрагмента или производного, слитого белка и физиологически активного белка, не являющегося антителом. В одном аспекте этого варианта осуществления указанный способ может обеспечить титр белка, который является по меньшей мере на около 2% больше, чем титр белка в среде для продуцирования клеточной культуры, не содержащей по меньшей мере около 50 нМ никотинамида. В одном аспекте этого варианта осуществления обогащенная среда может необязательно содержать 5-метилтиоаденозин. В одном аспекте этого варианта осуществления способ продуцирования белка может быть способом периодического культивирования с подпиткой.

В настоящем описании, по меньшей мере частично, представлен способ повышения уровня продукции белка.

В одном типовом варианте осуществления указанный способ повышения уровня продукции белка может включать культивирование эукариотических клеток в среде для культивирования клеток, добавление в среду для культивирования клеток 5-метилтиоаденозина, а также экспрессию белка. В одном из аспектов этого варианта осуществления концентрация 5-метилтиоаденозина может составлять по меньшей мере около 10 нМ. В одном из аспектов этого варианта осуществления концентрация 5-метилтиоаденозина может составлять от около 10 до около 200 нМ. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать одну или большее количество кислот, выбранных из молочной кислоты, фенилмолочной кислоты, индолилуксусной кислоты, янтарной кислоты, альфа-гидроксиизовалериановой кислоты, альфа-гидроксиизокапроновой кислоты, 2-(4-гидроксифенил)молочной кислоты или 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислоты, солей этих кислот, сложных эфиров этих кислот и их комбинаций. В одном аспекте этого варианта осуществления для культивирования клеток может содержать сахара, аминокислоты, витамины, соли, следовые ионы металлов, пурины и/или пиримидины. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать соли или сложные эфиры 5-метилтиоаденозина. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может иметь рН от около 6,5 до около 8. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток не содержит белка животного происхождения. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть бессывороточной средой. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть средой определенного химического состава. В одном аспекте этого варианта осуществления эукариотические клетки могут быть выбраны из клеточных линий почки новорожденного хомячка, клеточных линий яичников китайского хомячка, клеточных линий миеломы семейства мышинных, клеточных линий миеломы мыши, клеточных линий эмбриональных почки человека, клеточных линий, полученных из сетчатки глаза человека, и/или клеточных линий амниоцитов. В одном аспекте этого варианта осуществления белок может быть выбран из группы, состоящей из антигена или его фрагмента или производного, слитого белка и физиологически активного белка, не являющегося антителом. В одном аспекте этого варианта осуществления добавление 5-метилтиоаденозина повышает титр рекомбинантного белка по меньшей мере на около 2%. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть необязательно дополнена никотинамидом.

В одном типовом варианте осуществления указанный способ повышения уровня продукции белка может включать культивирование эукариотических клеток в среде для культивирования клеток, добавление в среду для культивирования клеток никотинамида, а также экспрессию белка. В одном из аспектов этого варианта осуществления концентрация никотинамида может составлять по меньшей мере около 50 нМ. В одном из аспектов этого варианта осуществления концентрация 5-метилтиоаденозина может составлять от около 50 до около 2000 нМ. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда

для культивирования клеток может содержать одну или большее количество кислот, выбранных из молочной кислоты, фенилмолочной кислоты, индолилуксусной кислоты, янтарной кислоты, альфа-гидроксиизовалериановой кислоты, альфа-гидроксиизокапроновой кислоты, 2-(4-гидроксифенил)-молочной кислоты или 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислоты, солей этих кислот, сложных эфиров этих кислот и их комбинаций. В одном аспекте этого варианта осуществления для культивирования клеток может содержать сахара, аминокислоты, витамины, соли, следовые ионы металлов, пурины и/или пиримидины. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может содержать соли или сложные эфиры никотинамида. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может иметь pH от около 6,5 до около 8. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток не содержит белка животного происхождения. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть бессывороточной средой. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть средой определенного химического состава. В одном аспекте этого варианта осуществления эукариотические клетки могут быть выбраны из клеточных линий почки новорожденного хомячка, клеточных линий яичников китайского хомячка, клеточных линий миеломы семейства мышинных, клеточных линий миеломы мыши, клеточных линий эмбриональных почки человека, клеточных линий, полученных из сетчатки глаза человека, и/или клеточных линий амниоцитов. В одном аспекте этого варианта осуществления белок может быть выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента или производного, слитого белка и физиологически активного белка, не являющегося антителом. В одном аспекте этого варианта осуществления добавление никотинамида повышает титр рекомбинантного белка по меньшей мере на около 2%. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть необязательно дополнена 5-метиладенозином.

В настоящем описании, по меньшей мере частично, представлен способ продуцирования белка.

В одном типовом варианте осуществления способ продуцирования белка может включать введение в клетку (клетки) нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок, и культивирование клетки (клеток) в среде для культивирования клеток. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть обогащена по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина. В другом аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть обогащена по меньшей мере около 50 нМ никотинамида. В еще одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть обогащена по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина и по меньшей мере около 50 нМ никотинамида. В одном аспекте этого варианта осуществления способ продуцирования белка может дополнительно включать поддержание среды для культивирования клеток для экспрессии более высокого титра белка в клетке (клетках). В одном аспекте этого варианта осуществления способ продуцирования белка может дополнительно включать сбор белка. В одном аспекте этого варианта осуществления клетки могут быть выбраны из клеточных линий почки новорожденного хомячка, клеточных линий яичников китайского хомячка, клеточных линий миеломы семейства мышинных, клеточных линий миеломы мыши, клеточных линий эмбриональных почки человека, клеточных линий, полученных из сетчатки глаза человека, и/или клеточных линий амниоцитов. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может дополнительно содержать одну или большее количество кислот, выбранных из молочной кислоты, фенилмолочной кислоты, индолилуксусной кислоты, янтарной кислоты, альфа-гидроксиизовалериановой кислоты, альфа-гидроксиизокапроновой кислоты, 2-(4-гидроксифенил)молочной кислоты или 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислоты, солей этих кислот, сложных эфиров этих кислот и их комбинаций. В одном аспекте этого варианта осуществления для культивирования клеток может дополнительно содержать сахара, аминокислоты, витамины, соли, следовые ионы металлов, пурины и/или пиримидины. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может иметь pH от около 6,5 до около 8. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток не содержит белка животного происхождения. В одном из аспектов этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть бессывороточной средой. В одном аспекте этого варианта осуществления среда для культивирования клеток может быть средой определенного химического состава. В одном аспекте этого варианта осуществления белок может быть выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента или производного, слитого белка и физиологически активного белка, не являющегося антителом. В одном аспекте этого варианта осуществления указанный способ может демонстрировать на 2% более высокий титр белка в клетке (клетках) по сравнению с клеткой (клетками), выращенной в среде для культивирования клеток, которая не содержит по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина. В одном аспекте этого варианта осуществления указанный способ продуцирования белка может дополнительно включать поддержание среды для культивирования клеток для получения на 2% более высокого титра белка в клетке (клетках) по сравнению с клеткой (клетками), выращенной в среде для культивирования клеток, которая не содержит по меньшей мере около 50 нМ никотинамида.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 демонстрирует результат многомерного анализа (MVA) исследования компонентов, присут-

ствующих в гидролизате сои.

Фиг. 2 демонстрирует данные корреляции, полученные при изучении влияния концентрации 5-метилтиоаденозина в обогащенной среде, применяемой для подпитки среды для культивирования клеток, на титр белка (г/л), согласно одному типовому варианту осуществления.

Фиг. 3 демонстрирует линию регрессии, относящуюся к переменным (N=70), используемым для оценки влияния концентрации 5-метилтиоаденозина в среде для культивирования клеток на титр белка (г/л) согласно одному типовому варианту осуществления.

Фиг. 4 демонстрирует данные корреляции, полученные при изучении влияния концентрации никотинамида в обогащенной среде, применяемой для подпитки среды для культивирования клеток, на титр белка (г/л), согласно одному типовому варианту осуществления.

Фиг. 5 демонстрирует линию регрессии, относящуюся к переменным (N=70), используемым для оценки влияния концентрации никотинамида в среде для культивирования клеток на титр белка (г/л) согласно одному типовому варианту осуществления.

#### **Подробное описание**

Биофармацевтические препараты оказались очень эффективными в диагностических и терапевтических целях (Dawn M. Ecker, Susan Dana Jones & Howard L. Levine, *The therapeutic monoclonal antibody market*, 7 MABS, 9-14 (2014); Brian A. Baldo, *Chimeric Fusion binding molecules Used for Therapy: Indications, Mechanisms, and Safety*, 38 Drug Safety, 455-479 (2015)). Некоторые среды для культивирования клеток, применяемые для культивирования клеток для изготовления биофармацевтических продуктов, хорошо описаны в литературе, и при этом ряд сред является коммерчески доступным. Типовые компоненты сред для культивирования клеток включают аминокислоты, органические и неорганические соли, витамины, следовые количества металлов, сахара, липиды и нуклеиновые кислоты, типы и количества которых могут варьироваться в зависимости от конкретных требований данного типа клетки или ткани.

Одной из целей продуцирования белка может быть оптимизация культуры клеток для получения максимального количества белка и наиболее эффективных средств продуктивности. Любая оптимизация, включая постепенную оптимизацию, может иметь огромные экономические выгоды. В фармацевтической промышленности оптимизация продуцирования белка для биопрепаратов, применяемых в терапии для лечения заболеваний, является преимуществом, поскольку любая оптимизация может иметь значительное влияние, когда биологический препарат производится в больших масштабах. Таким образом, остается потребность в максимальном повышении уровня продукции белка из культур клеток, экспрессирующих биологические белки, для применения в медицине.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании, ниже описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в настоящий документ посредством ссылки.

Формы единственного числа следует понимать как означающие "по меньшей мере один"; и термины "около" и "приблизительно" следует понимать как допускающие стандартные вариации, как будет понятно специалистам в данной области техники; а если указаны диапазоны, то включены конечные точки.

В некоторых типовых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ продуцирования белка.

Применяемый в данном документе термин "белок" включает любой аминокислотный полимер с ковалентно связанными амидными связями. Белки содержат одну или большее количество аминокислотных полимерных цепей, общеизвестных в данной области как "полипептиды".

Термин "полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, соответствующих встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов, связанных посредством пептидных связей, соответствующих встречающихся в природе структурных вариантов, и их синтетических не встречающихся в природе аналогов. "Синтетические пептиды или полипептиды" относятся к не встречающимся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с помощью автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные методы твердофазного пептидного синтеза. Белок может содержать один или большее количество полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, применяемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других связывающих молекул на основе Fc-фрагмента и химерного рецептора, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческого антител и биспецифических антител. В другом иллюстративном аспекте белок может включать фрагменты антитела, нанотела, химеры рекомбинантного антитела, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Рекомбинантные белки могут быть получены с помощью систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как си-

стема бакуловирусов насекомых, системы дрожжей (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, CHO-клетки и производные CHO-клеток, такие как CHO-K1-клетки). Для ознакомления с недавним обзором биотерапевтических белков и их получения см. публикацию Darius Ghaderi et al., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS, 147-176 (2012). В некоторых вариантах осуществления белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Данные модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминную кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, FLAG-метку, мальтозосвязывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), мус-эпитоп, флуоресцентные метки и другие красители и т.п. Белки могут быть классифицированы на основании композиций и растворимости и, таким образом, могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и фибриллярные белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукропротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок, или белок, или рекомбинантный белок, или рекомбинантный белок могут быть антителом, биспецифическим антителом, мультиспецифическим антителом, фрагментом антитела, моноклональным антителом, Fc-слитой связывающей молекулой, F(ab')<sub>2</sub> фрагментом, Fc фрагментом или их комбинацией.

Применяемый в данном документе термин "антитело", включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V<sub>H</sub>) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или V<sub>L</sub>) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C<sub>L1</sub>). V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления FR антитела против big-ET-1 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Применяемый в данном документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела.

Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной геномной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител) или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Применяемый в данном документе термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, посредством любых способов, доступных или известных в данной области. Моноклональные антитела, пригодные для использования в настоящем изобретении, могут быть получены с использованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, включая использование технологий гибридомной, рекомбинантной и фаговой индикации или их комбинации.

В данном контексте термин "слитый белок" или "Fc слитый белок" включает часть или все из двух или большего количества белков, один из которых может быть частью Fc молекулы иммуноглобулина, которые не слиты в своем естественном состоянии. Получение слитого белка может включать определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая домен Fc), как описано, например, в публикациях A. Ashkenazi et al., Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoconjugate., 88 PROCEEDINGS OF THE

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 10535-10539 (1991); Randal A. Byrn et al., Biological properties of a CD4 immunoadhesin, 344 NATURE 667-670 (1990); Diane Hollenbaugh & Alejandro Aruffo, Construction of Immunoglobulin Fusion binding molecules, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (2002). "Слитые белки, содержащие рецептор и Fc-фрагмент" включают в себя один или большее количество внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления может содержать шарнирную область, за которым следует домен C<sub>H</sub>2 C<sub>H</sub>3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления -Fc-слитый белок может содержать два или большее количество различных рецепторных цепей, которые связываются с одним или большим количеством лигандов. Например, Fc-слитый белок может представлять собой ловушку, как, например, ловушка IL-1 (например, рилоноцепт, который содержит область связывания лиганда RAcP IL-1, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме), или ловушку VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора Flk1 VEGF, слитого с Fc hIgG1; например, см. патенты США № 7087411 и 7279159, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

В контексте данного документа термин "фрагмент антитела" включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или вариабельная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию вариабельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а ScFv-белки представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых вариабельные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. В некоторых типовых вариантах осуществления фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых типовых вариантах осуществления фрагмент связывается с антигеном с сопоставимой аффинностью с таковым исходного антитела, и/или конкурирует с исходным антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела можно получить любым способом. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем с помощью фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Альтернативно или дополнительно, фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно или дополнительно, фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно содержать многомoleкулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот и более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок, или белок, или рекомбинантный белок, или рекомбинантный белок, может быть вариантом антитела или вариантом связывающей молекулы.

"Вариант" или "вариант связывающей молекулы" в контексте данного описания может включать связывающую молекулу, которая отличается от связывающей целевой молекулы на основании по меньшей мере одной модификации аминокислоты или посттрансляционной модификации. Вариант может относиться к самой связывающей молекуле, к композиции, содержащей связывающую молекулу, или к аминокислотной последовательности, которая ее кодирует. Предпочтительно вариант связывающей молекулы имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходной связывающей молекулой, например, от около одной до около семидесяти аминокислотных модификаций, и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных модификаций по сравнению с родительским белком. Вариант последовательности связывающей молекулы в данном изобретении предпочтительно будет обладать по меньшей мере около 80% гомологии с последовательностью родительской связывающей молекулы, более предпочтительно по меньшей мере около 90% гомологии и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 92% гомологии.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок, или белок, или рекомбинантный белок, или рекомбинантный белок, может быть белком со специфической посттрансляционной модификацией.

В контексте данного документа общий термин "посттрансляционные модификации" или "PTM" относится к ковалентным модификациям, которым подвергаются полипептиды либо в ходе (ко-трансляционная модификация), либо после (посттрансляционная модификация) их рибосомного синтеза. PTM обычно вводятся специфическими ферментами или ферментными путями. Многие из них возникают в месте специфической характерной белковой последовательности (например, сигнатурной последовательности) внутри белкового каркаса. Было зарегистрировано несколько сотен PTM, и данные модификации неизменно влияют на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. "Proteins" (2014), second edition, published by Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансля-

ционные модификации включают, помимо прочего, отщепление, N-концевые удлинения, разложение белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование лизиновых остатков биотином), амидирование C-конца, гликозилирование, йодирование, ковалентное прикрепление простетических групп, ацетилирование (добавление ацетиловой группы, обычно у N-конца белка), алкилирование (добавление алкильной группы (например, метильной, этильной, пропильной) обычно у лизинового или аргининового остатков), метилирование, аденилирование, ADP-рибозилирование, ковалентное сшивание внутри, или между, полипептидных цепей, сульфонирование, пренилирование, зависимые от витамина С модификации (гидроксилирование пролина и лизина и амидирование карбокси-конца), зависящая от витамина К модификация, причем витамин К представляет собой кофактор в карбоксилировании остатков глутамовой кислоты, обеспечивающем образование  $\gamma$ -карбоксиглутамата (glu-остатка), глутамилирование (ковалентная связь остатков глутамовой кислоты), глицилирование (ковалентная связь глициновых остатков), гликозилирование (добавление гликозильной группы либо к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, обеспечивающее гликопротеин), изопренилирование (добавление изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липоилирование (прикрепление липоатной функциональной группы), фосфопантетеинилирование (добавление 4'-фосфопантетеинильного фрагмента из кофермента А, как в жирной кислоте, поликетидае, нерибосомном пептиде и биосинтезе лейцина), фосфорилирование (добавление фосфатной группы, обычно к серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфатирование (добавление сульфатной группы, обычно к тирозиновому остатку). Посттрансляционные модификации, которые изменяют химическую природу аминокислоты включают, помимо прочего, цитруллинирование (например, преобразование аргинина в цитруллин посредством дезиминирования), и дезамидирование (например, преобразование глутамина в глутамовую кислоту или аспарагин в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, которые включают структурные изменения, включают без ограничения образование дисульфидных мостиков (ковалентной связи двух цистеиновых аминокислот) и протеолитическое расщепление (отщепление белка у пептидной связи). Определенные посттрансляционные модификации включают добавление других белков или пептидов, например, ISG-илирование (ковалентная связь с белком ISG15 (ген, стимулируемый интерфероном)), SUMO-илирование (ковалентная связь с белком SUMO (малый убиквитин-подобный модификатор)) и убиквитинирование (ковалентная связь с белком убиквитин). Для более подробного нормативного словаря PTM, рекомендованного UniProt, см. <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist>.

В некоторых типовых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается среда для культивирования эукариотических клеток, содержащая базальную среду или питательную среду, а также 5-метилтиоаденозин и/или никотинамид.

В контексте данного документа термин "среда для культивирования клеток" относится к клеткам, выращенным в искусственной (например, *in vitro*) среде. Однако следует понимать, что термин "культура клеток" является общим термином и может применяться для описания культивирования не только отдельных прокариотических (например, бактериальных) или эукариотических клеток (например, клеток животных, растений и грибов), но также и тканей, органов, систем органов или целых организмов, для которых термины "культура ткани", "культура органа", "культура системы органов" или "органотипическая культура" могут иногда применяться взаимозаменяемо с термином "культура клеток". Пригодные условия культивирования эукариотических клеток в данной области техники можно найти, например, в публикации *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Среда для культивирования клеток может быть оптимизирована для конкретного применения в культуре клеток, включая, например, среду для роста культуры клеток, которая может быть составлена для стимулирования роста клеток, или среду для продуцирования культуры клеток, которая может быть составлена для стимулирования продукции рекомбинантного белка.

Термины "питательное вещество", "ингредиент" и "компонент" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения компонентов, которые составляют среду для культивирования клеток.

В контексте данного документа термин "базальная среда" может относиться к любой среде, которая может поддерживать рост клеток. Базальная среда может содержать ряд ингредиентов, включая аминокислоты, витамины, органические и неорганические соли, источники углеводов, причем каждый ингредиент присутствует в количестве, которое поддерживает культивирование клетки *in vitro*. Среда может содержать вспомогательные вещества, такие как буферные вещества, такие как бикарбонат натрия, стабилизаторы окисления, стабилизаторы для противодействия механическому стрессу или ингибиторы протеаз. Примеры базальных сред включают, помимо прочего, среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), DME/F12, минимальную необходимую среду (MEM), базальную среду Игла (BME), среду 199, RPMI 1640, F-10, F-12,  $\alpha$ -минимальную основную среду ( $\alpha$ -MEM), минимальную необходимую среду Глазго (G-MEM), PF CHO (SAFC Biosciences), среду Дульбекко в модификации Искова или их комбинации, а также другие, известные из литературы или коммерчески доступные среды.

В контексте данного документа термин "питательная среда" включает среду, содержащую одно или большее количество питательных веществ, которые можно добавлять в культуру, начиная с некоторого времени после инокуляции. Питательная среда также может быть комбинированной подпиткой, содер-

жащей базовую среду и по меньшей мере один тип гидролизата, например гидролизат на основе сои, гидролизат на основе дрожжей или комбинацию двух типов гидролизатов. Кроме того, питательная среда также может включать только базовую среду, такую как концентрированная базовая среда, или может включать только гидролизаты или концентрированные гидролизаты.

В контексте данного документа термин "эукариотические клетки" может включать отдельные клетки, ткани, органы, клетки насекомых, клетки птиц, клетки млекопитающих, первичные клетки, непрерывные клеточные линии, стволовые клетки и/или клетки, полученные с помощью генной инженерии, такие как рекомбинантные клетки, экспрессирующие гетерологичный полипептид или белок. Некоторые клетки млекопитающих, пригодные для культивирования в среде для культивирования клеток, могут быть человеческого происхождения или не человеческого происхождения, могут включать первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, эпителиальные клетки шейки матки, эпителиальные клетки бронхов, эпителиальные клетки трахеи, эпителиальные клетки почек и эпителиальные клетки сетчатки), широко применяемые клеточные линии и их штаммы (например, эмбриональные клетки почки 293, клетки ВНК, клетки эпителия шейки матки HeLa и клетки сетчатки PER-C6, клетки MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки CHO, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Hep-2, клетки KB, клетки LSI80, клетки LS174T, клетки NCI-H-548, клетки RPMI2650, клетки SW-13, клетки T24, WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-1, клетки LLC-MK2, клетки Clone M-3, клетки 1-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки LLC-PK1, клетки PK (15), клетки GHi, клетки GH3, клетки L2, клетки LLC-RC 256, клетки MHiCi, клетки XC, клетки MDOK, клетки VSW и клетки TH-1, клетки B1, клетки BSC-1, клетки RAf, клетки RK, клетки PK-15 или их производные), клетки фибробластов из любой ткани или органа (включая, помимо прочего, сердце, печень, почки, толстую кишку, кишечник, пищевод, желудок, нервную ткань (головной, спинной мозг), легкое, сосудистую ткань (артерия, вена, капилляр), лимфоидную ткань (лимфатическая железа, аденоид, миндалины, костный мозг и кровь), селезенка, а также линии фибробластов и фибробластоподобных клеток (например, клетки CHO, клетки TRG-2, клетки IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки цитруллинемии, клетки Dempsey, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, клетки HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки Midi, клетки CHO, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки Vero, клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T3, клетки F9, клетки SV-T2, клетки M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C3H/10T1/2, клетки HSDMiC3, клетки KLN205, клетки McCoу, L клетки мыши, клетки штамма 2071 (мышь L), клетки штамма L-M (мышь L), клетки L-MTK (мышь L), клоны NCTC 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1, клетки Swiss/3T3, клетки индийского мунтжака, клетки SIRC, клетки Cn и клетки Jensen, клетки Sp2/0, NS0, NS1 или их производные).

В контексте данного документа термин "никотинамид" может также обозначаться как ниацинамид, амид никотиновой кислоты, амид пиридин-3-карбоновой кислоты, витамин B3, витамин PP, 3-пиридинкарбоксамид, номер CAS 98-92-0 или  $C_6H_6N_2O$ .

В контексте данного документа термин "5-метилтиоаденозин" может также обозначаться как 5-дезоксиде-5'-метилтиоаденозин, номер CAS 2457-80-9,  $C_{11}H_{15}N_5O_3S$ , MTA, MeSAdo, NSC 335422, витамин L2, соли 5-метилтиоаденозина или сложные эфиры 5-метилтиоаденозина. Неограничивающие примеры солей, совместимых с 5-метилтиоаденозином, например, включают кислотнo-аддитивные соли. Кислотнo-аддитивные соли могут быть кислотнo-аддитивными солями неорганических и органических кислот, например гидрохлоридами, сульфатами, нитратами, карбонатами, фосфатами, формиатами, оксалатами, цитратами, солями аскорбиновой кислоты, метансульфононoй кислоты, 1,4-бутансульфонатом, 1,5-пентансульфонатом, а также p-толуолсульфонатными солями.

В некоторых типовых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ продуцирования белка, включающий культивирование эукариотических клеток, имеющих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, в среде для продуцирования культуры клеток.

Среда для культивирования клеток или среда для продуцирования культуры клеток может быть дополнена средой, обогащенной компонентами, такими как питательные вещества и аминокислоты, которые потребляются в ходе фазы продуцирования культуры клеток.

В контексте данного документа термин "среда для продуцирования культуры клеток" может включать среду для культивирования клеток, предназначенную для применения в ходе фазы продуцирования культуры клеток.

В некоторых типовых вариантах осуществления среда для продуцирования культуры клеток или среда для культивирования клеток может быть бессывороточной средой.

В контексте данного документа термин "бессывороточная среда" включает среду для культивирования клеток, которая не содержит сыворотку животных, такую как фетальная бычья сыворотка. Бессывороточная среда может содержать или не содержать гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и факторы прикрепления. Примеры известной бессывороточной среды включают CHO-S-SFM II (Gibco) и 293 SFM II (Gibco).

В некоторых типовых вариантах осуществления среда для продуцирования культуры клеток или среда для культивирования клеток может быть средой без белка животного происхождения.

В контексте данного документа термин "среда без белка животного происхождения" может относиться к среде, которая не содержит белков и белковых компонентов от высших многоклеточных нерастительных эукариот (т.е. позвоночных), которые обладают вторичной, третичной и четвертичной структурой, характерной для белков, встречающихся в природе. Такая среда не содержит белков, таких как альбумин, трансферрин, инсулин и другие факторы роста. Однако белки животного происхождения и белковые компоненты отличаются от белков неживотного происхождения, небольших полипептидов и олигопептидов, получаемых из растений (обычно длиной около 10-30 аминокислот), таких как соевые бобы, и низших эукариот, таких как дрожжи. При приведении в контакт или инокуляции клеток с белковой средой животного происхождения среда будет содержать животные белки, выделяемые или секретируемые этими клетками, включая любые рекомбинантные белки, экспрессируемые генетически модифицированными клетками, если такие клетки культивируются. Таким образом, термин "среда, не содержащая животных белков", а также биологические материалы и препараты, полученные с ее помощью, не следует истолковывать как требующий отсутствия белков, выделяемых или секретируемых клетками, размножающимися в среде, а скорее этот термин относится к отсутствию прямого добавления в среду животных белков и белковых компонентов, полученных из животных источников и т.п., продуцированных рекомбинантно.

В некоторых типовых вариантах осуществления среда для продуцирования культуры клеток или среда для культивирования клеток может быть средой определенного химического состава.

В контексте данного документа термин "среда определенного химического состава" может включать среду, состоящую из чистых ингредиентов в измеренных концентрациях. Среда определенного химического состава может содержать простой сахар в качестве источника углерода и энергии, источник неорганического азота, различные минеральные соли и, при необходимости, факторы роста (очищенные аминокислоты, витамины, пурины и пиримидины). Различные среды для тканевых культур, включая определенные культуральные среды, являются коммерчески доступными, например, можно применять любую из следующих сред для культивирования клеток или их комбинацию: среда RPMI-1640, среда 199, среда RPMI-1641, среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальная необходимая среда Игла, среда F-12K, среда Хэма F12, среда Дульбекко в модификации Искова, среда Мак-Коя 5A, среда Лейбовица L-15 и бессывороточные среды, такие как EX-CELL™ 300 Series (JRH Biosciences, Lenexa, Канзас) и др.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ продуцирования белка может быть способом периодического культивирования с подпиткой.

В контексте данного документа термин "способ периодического культивирования с подпиткой" относится к способу, с помощью которого в периодическую культуру клеток с подпиткой может поставляться дополнительные питательные вещества. Например, указанный способ может включать добавление дополнительных сред в соответствии с определенным графиком подпитки в течение заданного периода времени. В контексте данного документа термин "периодическая культура клеток с подпиткой" относится к культуре клеток, в которой клетки и культуральная среда изначально подаются в сосуд для культивирования, а дополнительные питательные вещества для культуры подаются в культуру непрерывно или дискретными порциями во время выращивания, с или без периодического сбора клеток и/или продуктов перед прекращением культивирования.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается какими-либо из вышеупомянутых эукариотических клеток, белком, базальной средой, питательной средой, средой для культивирования клеток, средой для продуцирования культуры клеток, способом размножения клеток, способом экспрессии белка, способом сбора белка, способом введения в клетку нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок, и периодом времени для добавления или дополнения компонентов в среде, и что любая пригодная среда может быть выбрана с помощью любых подходящих способов.

Подразумевается, что применяемые в данном документе термины "включают", "включает" и "включающий" являются неограничивающими и понимаются как имеющие значение "содержат", "содержит" и "содержащий" соответственно.

В некоторых типовых вариантах осуществления данного изобретения предлагается среда для культивирования клеток эукариот.

В некоторых типовых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ продуцирования белка.

В некоторых типовых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ культивирования эукариотических клеток для увеличения продукции белка.

В некоторых типовых вариантах осуществления среды для культивирования клеток может содержать 5-метилтиоаденозин в концентрации по меньшей мере около 0,05 нМ, по меньшей мере около 1 нМ, по меньшей мере около 2 нМ, по меньшей мере около 3 нМ, по меньшей мере около 4 нМ, по меньшей мере около 5 нМ, по меньшей мере около 6 нМ, по меньшей мере около 7 нМ, по меньшей мере около 8 нМ, по меньшей мере около 9 нМ, по меньшей мере около







около 16 нМ 5-метилтиоаденозина, по меньшей мере около 17 нМ 5-метилтиоаденозина, по меньшей мере около 18 нМ 5-метилтиоаденозина, по меньшей мере около 19 нМ 5-метилтиоаденозина или по меньшей мере около 20 нМ 5-метилтиоаденозина..

В одном аспекте титр белка, продуцируемого в среде для культивирования клеток, может быть больше по меньшей мере на около 3%, по меньшей мере на около 4%, по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 6%, по меньшей мере на около 7%, по меньшей мере на около 8%, по меньшей мере на около 9%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 11%, по меньшей мере на около 12%, по меньшей мере на около 13%, по меньшей мере на около 14%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 16%, по меньшей мере на около 17%, по меньшей мере на около 18%, по меньшей мере на около 19%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 21%, по меньшей мере на около 22%, по меньшей мере на около 23%, по меньшей мере на около 24%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 26%, по меньшей мере на около 27%, по меньшей мере на около 28%, по меньшей мере на около 29% или по меньшей мере на около 30%.

В некоторых типовых вариантах осуществления среда для культивирования клеток может включать подпитку эукариотических клеток с применением обогащенной среды, содержащей никотинамид в концентрации, по меньшей мере около 5 нМ, при этом титр белка, продуцируемого в среде для культивирования клеток, может быть по меньшей мере на около 2% больше, чем в другой среде для культивирования клеток, которая не содержит по меньшей мере около 50 нМ никотинамида. В одном аспекте среда для культивирования клеток может содержать по меньшей мере около 5 нМ никотинамида, по меньшей мере около 10 нМ никотинамида, по меньшей мере около 15 нМ никотинамида, по меньшей мере около 20 нМ никотинамида, по меньшей мере около 25 нМ никотинамида, по меньшей мере около 30 нМ никотинамида, по меньшей мере около 35 нМ никотинамида, по меньшей мере около 40 нМ никотинамида, по меньшей мере около 45 нМ никотинамида, по меньшей мере около 50 нМ никотинамида, по меньшей мере около 55 нМ никотинамида, по меньшей мере около 60 нМ никотинамида, по меньшей мере около 65 нМ никотинамида, по меньшей мере около 70 нМ никотинамида, по меньшей мере около 75 нМ никотинамида, по меньшей мере около 80 нМ никотинамида, по меньшей мере около 85 нМ никотинамида, по меньшей мере около 90 нМ никотинамида, по меньшей мере около 95 нМ никотинамида или по меньшей мере около 100 нМ никотинамида.

В одном аспекте титр белка, продуцируемого в среде для культивирования клеток, может быть больше по меньшей мере на около 3%, по меньшей мере на около 4%, по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 6%, по меньшей мере на около 7%, по меньшей мере на около 8%, по меньшей мере на около 9%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 11%, по меньшей мере на около 12%, по меньшей мере на около 13%, по меньшей мере на около 14%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 16%, по меньшей мере на около 17%, по меньшей мере на около 18%, по меньшей мере на около 19%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 21%, по меньшей мере на около 22%, по меньшей мере на около 23%, по меньшей мере на около 24%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 26%, по меньшей мере на около 27%, по меньшей мере на около 28%, по меньшей мере на около 29% или по меньшей мере на около 30%.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок может быть встречающимся в природе белком.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок может быть рекомбинантным белком.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок может быть биотерапевтическим белком.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок может быть рекомбинантным белком, при этом рекомбинантный белок может быть белком-ловушкой, связывающей молекулой на основе Fc-фрагмента и химерного рецептора, химерным белком, антителом, моноклональным антителом, поликлональным антителом, человеческим антителом, биспецифическим антителом, фрагментом антитела, нанотелом, химерой рекомбинантного антитела, цитокином, хемокином или пептидным гормоном.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок может содержать модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок может содержать посттрансляционную модификацию.

Последовательная маркировка этапов способов, предложенных в данном документе, номерами и/или буквами не подразумевает ограничения способа или каких-либо вариантов его осуществления конкретным указанным порядком.

В тексте описания цитируются различные публикации, включая патенты, патентные заявки, опубликованные патентные заявки, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих процитированных ссылок в полном объеме и во всех целях включена в данный документ посредством ссылки.

Данное изобретение станет более понятно со ссылкой на следующие примеры, которые приведены

для более подробного описания изобретения. Они предназначены для иллюстрации и не должны восприниматься как ограничивающие объем изобретения.

### Примеры

Чтобы изучить содержание среды для культивирования клеток и ее влияние на продукцию белка, выбрали культуру клеток, содержащую гидролизат сои, для генерации VEGFR-связывающего белка 1.

#### Пример 1.

Анализ содержания гидролизата сои проводили с использованием девяти различных партий, полученных из трех разных поставок - 1, 2 и 3. Образцы из этих трех разных поставок были отправлены в Metabolon (Дарем, штат Северная Каролина, США). Анализ содержания гидролизата сои проводился компанией Metabolon с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии. Было измерено более трехсот компонентов в гидролизате сои. Приведены только результаты, масштабированные до медианы.

Для изучения влияния биохимических веществ на титр VEGFR-связывающего белка 1 (рецептор фактора роста эндотелия сосудов) применяли модель ортогональных частичных наименьших квадратов (OPLS) для многомерного анализа (MVA). В исследование были включены 70 партий гидролизатов сои.

Зависимость между компонентами и титром оценивали путем изучения корреляции и ковариации. Положительная зависимость предполагает увеличение титра с увеличением биохимического показателя, а отрицательная зависимость предполагает снижение титра с увеличением биохимического показателя. Для окончательной оценки титра главного компонента значения  $R^2X$ ,  $R^2Y$  и  $Q^2$  оказались равными 0,315, 0,672 и 0,493 соответственно. Компоненты, продемонстрировавшие положительную зависимость, приведены в табл. 1, а компоненты, продемонстрировавшие отрицательную зависимость, приведены в табл. 2.

Таблица 1

<b>Положительная зависимость</b>
Никотинамид
Лактат
фениллактиат (PLA)
5-метилтиоаденозин (MTA)
индоллактат
сукцинат
альфа-гидроксиизокапроат
3-(4-гидроксифенил)лактиат (HPLA)
альфа-гидроксиизовалерат
2-гидрокси-3-метилвалерат

Таблица 2

<b>Отрицательная зависимость</b>
никотинат
сахароза
урацил
фенилаланин
валилейцин
мальтоза
дигалактозил глицерин
пантотенат (витамин B5)
ксантин
серин

Результат MVA, нормированный на единицу длины, приведен на фиг. 1. На основании этих данных из Примера 2 никотинамид и 5-метилтиоаденозин были выбраны в качестве положительных маркеров для дальнейшего анализа.

#### Пример 2.

Влияние 5-метилтиоаденозина на продукцию рекомбинантного белка (VEGFR-связывающий белок 1) изучали путем исследования титра белка (г/л) при различных концентрациях 5-метилтиоаденозина, присутствующего в среде для культивирования клеток.

К среде для культивирования клеток добавляли обогащенную среду (гидролизат сои), содержащую 5-метилтиоаденозин. Фиг. 2 демонстрирует корреляцию между концентрацией 5-метилтиоаденозина, присутствующего в соевом гидролизате, добавленном в среду для культивирования клеток, с титром

VEGFR-связывающего белка 1.

Как видно на фиг. 2, линия регрессии, относящаяся к переменным (N=70), экстраполировано указывает на то, что титр линейно изменялся в зависимости от концентрации 5-метилтиоаденозина в соевом гидролизате, добавленном в среду для культивирования клеток, позволяя предположить, что более высокий титр может быть получен при увеличении концентрации 5-метилтиоаденозина в среде для культивирования клеток.

Пример 3.

На основе данных корреляции, полученных при изучении влияния концентраций 5-метилтиоаденозина в обогащенной среде (гидролизат сои), добавленной к среде для культивирования клеток (Пример 2, фиг. 2), оценивали оптимальную концентрацию 5-МТА в культуре клеток. Как видно на фиг. 3, линия регрессии, относящаяся к переменным (N=70), экстраполировано указывает на то, что титр может линейно изменяться в зависимости от концентрации 5-метилтиоаденозина в среде для культивирования клеток, демонстрируя, что при увеличении концентрации 5-метилтиоаденозина в среде для культивирования клеток может быть получен более высокий титр.

Пример 4.

Влияние никотинамида на титр рекомбинантного белка (VEGFR-связывающий белок 1) также изучали путем исследования титра белка (г/л) при различных концентрациях никотинамида, присутствующего в среде для культивирования клеток.

Обогащенную среду (гидролизат сои), содержащую никотинамид, добавляли к среде для культивирования клеток в различных концентрациях. Фиг. 4 демонстрирует корреляцию между концентрацией никотинамида, присутствующего в соевом гидролизате, добавленном в среду для культивирования клеток, с титром VEGFR-связывающего белка 1. Как видно на фиг. 4, линия регрессии, относящаяся к переменным (N=70), экстраполировано указывает на то, что титр линейно изменялся в зависимости от концентрации никотинамида в гидролизате сои, позволяя предположить, что при увеличении концентрации никотинамида в среде для культивирования клеток может быть получен более высокий титр.

Пример 5.

На основе данных корреляции, полученных при изучении влияния концентрации никотинамида в обогащенной среде (гидролизат сои), добавленной к среде для культивирования клеток (Пример 4, фиг. 4), оценивали оптимальную концентрацию никотинамида в культуре клеток. Как видно на фиг. 5, линия регрессии, относящаяся к переменным (N=70), экстраполировано указывает на то, что титр может линейно изменяться в зависимости от концентрации никотинамида в среде для культивирования клеток, позволяя предположить, что при увеличении концентрации никотинамида в среде для культивирования клеток может быть получен более высокий титр.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Среда для культивирования эукариотических клеток, экспрессирующих афлиберцепт, содержащая:

базальную среду или питательную среду; а также

5-метилтиоаденозин.

2. Среда для культивирования клеток по п.1, причем концентрация 5-метилтиоаденозина в среде для культивирования клеток составляет по меньшей мере около 10 нМ.

3. Среда для культивирования клеток по п.1, дополнительно содержащая одну или большее количество кислот, выбранных из молочной кислоты, фенилмолочной кислоты, индолилуксусной кислоты, янтарной кислоты, альфа-гидроксиизовалериановой кислоты, альфа-гидроксиизокапроновой кислоты, 2-(4-гидроксифенил)молочной кислоты или 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислоты, солей этих кислот, сложных эфиров этих кислот и их комбинаций.

4. Среда для культивирования клеток по п.2, причем титр афлиберцепта, продуцируемого в среде для культивирования клеток, по меньшей мере на около 2% больше, чем в другой среде для культивирования клеток, которая не содержит по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина.

5. Среда для культивирования клеток по п.1, в которой 5-метилтиоаденозин может находиться в форме своих солей или сложных эфиров.

6. Среда для культивирования клеток по п.1, причем рН среды поддерживается в диапазоне от около 6,5 до около 8.

7. Среда для культивирования клеток по п.1, причем среда не содержит белка животного происхождения.

8. Среда для культивирования клеток по п.1, причем среда представляет собой бессывороточную среду.

9. Среда для культивирования клеток по п.1, причем среда представляет собой среду определенного химического состава.

10. Способ культивирования эукариотических клеток для повышения уровня продукции афлиберцепта, включающий следующие этапы:

культивирование эукариотических клеток в среде для культивирования клеток;  
 дополнение среды для культивирования клеток 5-метилтиоаденозином, при этом концентрация 5-метилтиоаденозина составляет от около 10 до около 200 нМ; а также  
 продуцирование афлиберцепта в эукариотических клетках,  
 причем добавление 5-метилтиоаденозина повышает титр афлиберцепта.

11. Способ по п.10, в котором титр афлиберцепта по меньшей мере на около 2% больше, чем при применении другого способа с использованием среды для культивирования клеток, которая не содержит по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина.

12. Способ по п.10, в котором среда для культивирования клеток дополнительно содержит одну или большее количество кислот, выбранных из молочной кислоты, фенилмолочной кислоты, индолилуксусной кислоты, янтарной кислоты, альфа-гидроксиизовалериановой кислоты, альфа-гидроксиизокапроновой кислоты, 2-(4-гидроксифенил)молочной кислоты или 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислоты, солей этих кислот, сложных эфиров этих кислот и их комбинаций.

13. Способ по п.10, в котором эукариотические клетки включают по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из клеточных линий почки новорожденного хомячка, клеточных линий яичников китайского хомячка, клеточных линий миеломы семейства мышинных, клеточных линий миеломы мыши, линий эмбриональных клеток почки человека, клеточных линий, полученных из сетчатки глаза человека, и/или клеточных линий амниоцитов.

14. Способ по п.10, в котором афлиберцепт секретируется в среду.

15. Способ по п.10, в котором среда для культивирования клеток не содержит белка животного происхождения.

16. Способ по п.10, в котором среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду.

17. Способ по п.10, в котором среда для культивирования клеток представляет собой среду определенного химического состава.

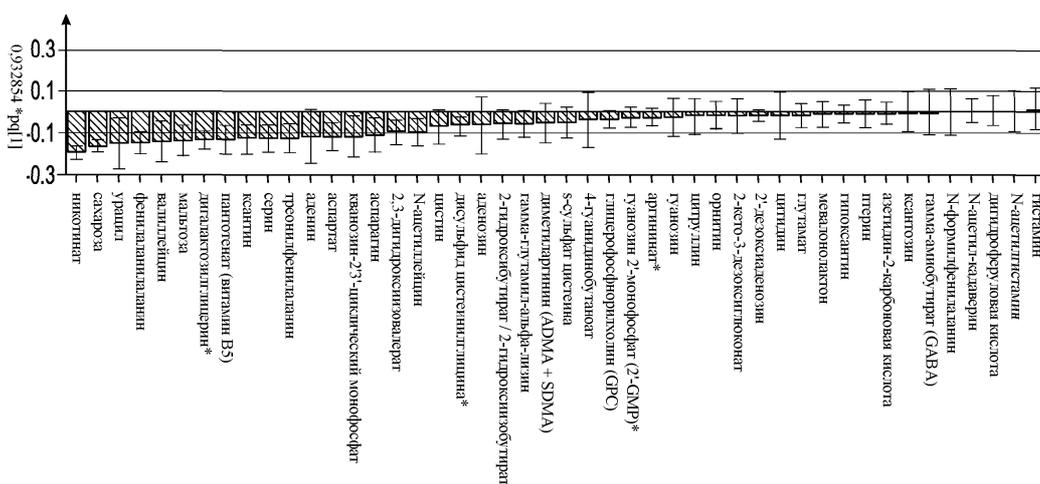
18. Способ продуцирования афлиберцепта, включающий:

введение в клетку нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую афлиберцепт;

культивирование клетки в среде для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере около 10 нМ 5-метилтиоаденозина; а также

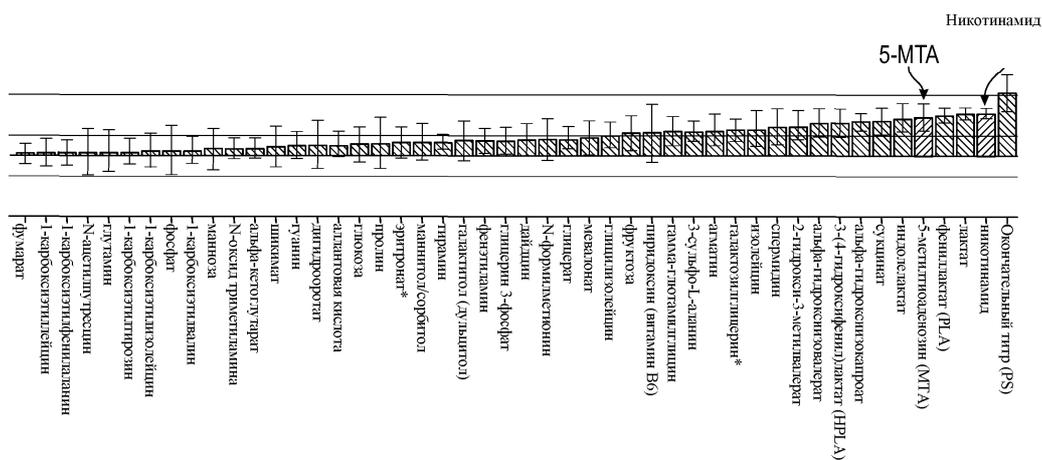
продуцирование афлиберцепта в клетке.

R2 более 0.8.M4 (OPLS), титр OPLS PS,  
 нормализованный к единице длины



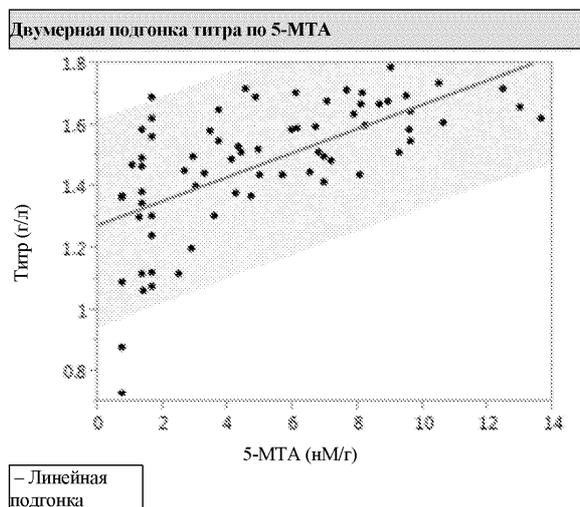
ID переменной (первичный)  
 R2X[1] = 0,159

R2 более 0.8.M4 (OPLS), титр OPLS PS,  
нормализованный к единице длины



ID переменной (первичный)  
R2X[1] = 0,159

Фиг. 1



Линейная подгонка

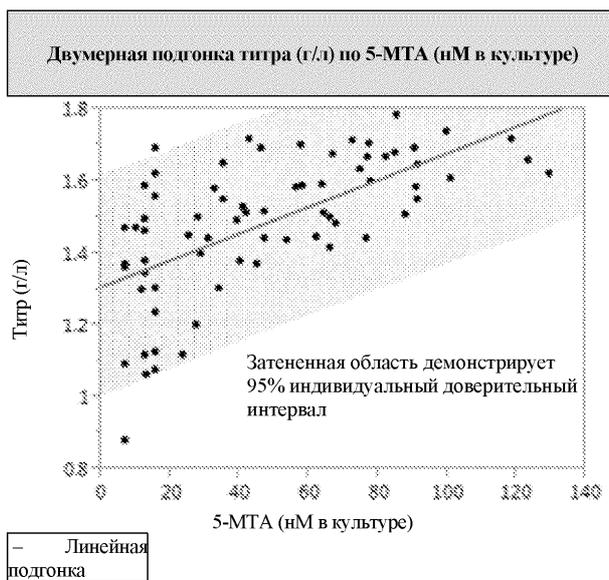
Титр = 1.2771952 - 0.0390959 \* 5-МТА

Обобщенные данные о подгонке	
R-квадрат	0,399725
R-квадрат корр	0,990898
Средняя квадратическая ошибка	0,165711
Среднее значение ответа	1,475188
Наблюдения (или сумма Wgts)	70

Дисперсионный анализ				
Источник	DF	Сумма квадратов	Средний квадрат	Соотношение F
Модель	1	1,2434397	1,24344	45,2815
Ошибка	68	1,8672953	0,02746	Вероятность >F
С. Всего	69	3,1107350		<0,0001°

Оценки параметров				
Параметр	Оценка	Стандартная ошибка	Соотношение t	Вероятность >  t
Свободный член	1,2771952	0,035468	36,01	<0,0001°
5-МТА	0,0390959	0,00581	6,73	<0,0001°

Фиг. 2

**Линейная подгонка**

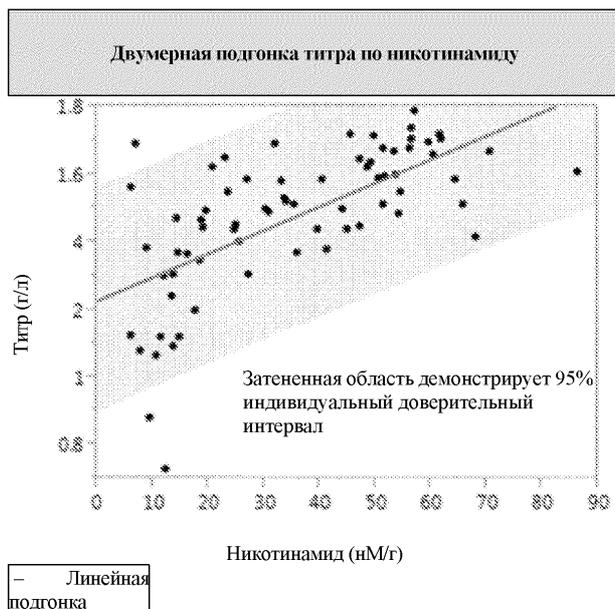
Титр (г/л) = 1,3077581 - 0,0037002 \* 5-МТА (нМ в культуре)

Обобщенные данные о подгонке	
R-квадрат	0,394711
R-квадрат корр	0,38581
Средняя квадратическая ошибка	0,150563
Среднее значение ответа	1,485777
Наблюдения (или сумма Wgts)	70

Дисперсионный анализ				
Источник	DF	Сумма квадратов	Средний квадрат	Соотношение F
Модель	1	1,0052217	1,00522	44,3430
Ошибка	68	1,5415075	0,02267	Вероятность > F
С. Всего	69	2,5467291		

Оценки параметров				
Параметр	Оценка	Стандартная ошибка	Соотношение t	Вероятность >  t
Свободный член	1,3077581	0,032226	40,58	<0,0001°
5-МТА (нМ в культуре)	0,0037002	0,000556	6,66	<0,0001°

Фиг. 3

**Линейная подгонка**

Титр = 1,2274481 - 0,0069464 \* Никотинамид

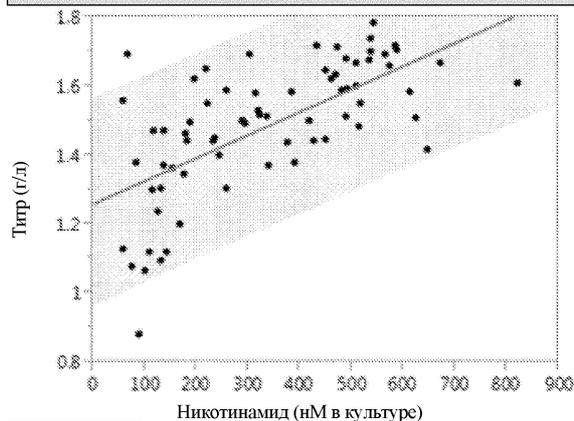
Обобщенные данные о подгонке	
R-квадрат	0,419378
R-квадрат корр	0,41084
Средняя квадратическая ошибка	0,162976
Среднее значение ответа	1,475188
Наблюдения (или сумма Wgts)	70

Дисперсионный анализ				
Источник	DF	Сумма квадратов	Средний квадрат	Соотношение F
Модель	1	1,3045745	1,30457	49,1158
Ошибка	68	1,8061605	0,02656	<b>Вероятность &gt;F</b>
С. Всего	69	3,1107350		<0,0001°

Оценки параметров				
Срок	Оценка	Стандартная ошибка	Соотношение t	Вероятность >  t
Свободный член	1,2274481	0,040361	30,41	<0,0001°
Никотинамид	0,0069464	0,000991	7,01	<0,0001°

Фиг. 4

Двумерная подгонка титра (г/л) по никотинамиду (нМ в культуре)



— Линейная подгонка

**Линейная подгонка**

$$\text{Титр (г/л)} = 1,2607635 - 0,0005641 * \text{Никотинамид (нМ в культуре)}$$

Обобщенные данные о подгонке	
R-квадрат	0,422585
R-квадрат корр	0,414094
Средняя квадратическая ошибка	0,147055
Среднее значение ответа	1,485777
Наблюдения (или сумма Wgts)	70

Дисперсионный анализ				
Источник	DF	Суммарная среднеквадратическая ошибка	Средняя квадратическая	Соотношение F
Модель	1	1,0762104	1,07621	49,7663
Ошибка	68	1,4705187	0,02163	Вероятность > F
С. Всего	69	2,5467291		

Оценки параметров				
Параметр	Оценка	Стандартная ошибка	Соотношение t	Вероятность >  t
Свободный член	1,2607635	0,036419	34,62	<0,0001°
Никотинамид (нМ в культуре)	0,0006641	9,414e-5	7,05	<0,0001°

Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2