

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390598** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.09.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/65* (2006.01)  
*C12N 15/67* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2017.05.11

---

(54) **ПРЯМОЙ ОТБОР КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ВЫСОКИЕ УРОВНИ  
ГЕТЕРОМЕРНЫХ БЕЛКОВ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗНЫХ  
ВЕКТОРОВ ВНУТРИГЕННОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ**

---

(31) 62/334,966

(32) 2016.05.11

(33) US

(62) 201892588; 2017.05.11

(71) Заявитель:

АМГЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Кетчем Рэндэл Р., Макгрю  
Джеффри Т., Фомина Ядлин Дина А.,  
Мунро Трент П., Агравал Неераж  
Жагдиш, Дарис Кристин М. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

---

(57) Данное изобретение относится к общей области рекомбинантной экспрессии полипептидов в культуре клеток животных. Более конкретно, изобретение относится к улучшенной селекции клеток, трансфицированных рекомбинантно сконструированными векторами, предназначенными для экспрессии полипептидов, в частности гетеромультимерных полипептидов.

**A1**

**202390598**

**202390598**

**A1**

**ПРЯМОЙ ОТБОР КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ВЫСОКИЕ УРОВНИ  
ГЕТЕРОМЕРНЫХ БЕЛКОВ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗНЫХ ВЕКТОРОВ ВНУТРИГЕННОЙ  
КОМПЛЕМЕНТАЦИИ**

**ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/334,966, поданной 11 мая 2016 года, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

Данная заявка содержит Список Последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Копия Списка Последовательностей в машиночитаемой форме, которая была создана 8 мая 2017 года имеет название A-2011-WO-RCT\_SEQ\_ST25.txt и имеет размер 79,1 килобайта.

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Данное изобретение относится к общей области рекомбинантной экспрессии полипептидов в культуре клеток млекопитающих. Более конкретно, изобретение относится к улучшенному отбору в клетках рекомбинантно разработанных векторов, предназначенных для экспрессии гетеромерных полипептидов.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Экспрессия гетеромерных рекомбинантных белков обычно требует подобной экспрессии компонентных цепей, чтобы избежать ненужного синтеза цепей, которые не могут быть включены в зрелые белки. Кроме того, большинство способов получения гетеромерных рекомбинантных белков требуют скрининга многих клонов с целью выявления редких высокоэкспрессирующих клонов, которые экспрессируют высокие уровни каждой цепи зрелого гетеромерного белка. Раздельная маркерная система пригодная для селекции (в которой селективный маркер разделяется на две части и каждый фрагмент связан с экспрессией одной цепи гетеромерного белка может быть использована для идентификации тех клеток, которые экспрессируют оба пригодных для селекции маркерных фрагмента, и следовательно, обе цепи гетеромерных белков.

Глутаминсинтетаза (GS) катализирует биосинтез глутамина путем конденсации аммиака с глутаматом. Фермент GS млекопитающих представляет собой декамер, состоящий из двух соединенных пентамерных колец, с десятью активными сайтами, расположенными на местах соединений субъединиц. Каждый активный сайт образован остатками из N-концевого домена (домен  $\beta$ -grasp, состоящий из остатков 25-112) одной субъединицы и остатками C-концевого домена (каталитический домен, состоящий из остатков 113-373) соседней субъединицы. Генетические исследования *S. cerevisiae* и *E. coli* показали, что некоторые мутации GS проявляют внутригенную комплементарность, при которой некоторые мутации, которые расположены на 5'-конце гена GS, могут подавлять

те, которые находятся на 3'-конце (Mitchell, A. P. *Genetics* 111, 243-258 (1985); MacNeil, T., et al. *Journal of Bacteriology* 150, 1302-1313 (1982)). Соответственно, идентификация системы селекции, основанной на метаболическом ферменте, такой как та, в которой происходит внутригенная комплементация у глутаминсинтетазы, оказалась бы полезной для экспрессии молекул с более чем двумя уникальными полипептидными цепями (например, моноклональных антител и других рекомбинантных белков).

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном варианте реализации изобретения предлагается вектор, содержащий:  
 первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, и  
 вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, причем второй полипептид представляет собой исходную мутантную субъединицу маркера пригодного для селекции,

причем транскрипция первой нуклеиновой кислоты функционально связана с транскрипцией второй нуклеиновой кислоты, дополнительно содержащий: d

третью нуклеиновую кислоту, кодирующую третий полипептид, причем третий полипептид способен связываться с первым полипептидом с образованием гетеромерного комплекса и

четвертую нуклеиновую кислоту, которая кодирует четвертый полипептид, причем четвертый полипептид представляет собой комплементарную мутантную субъединицу маркера пригодного для селекции,

причем транскрипция третьей нуклеиновой кислоты функционально связана с транскрипцией четвертой нуклеиновой кислоты,

причем исходная мутантная субъединица и комплементарная мутантная субъединица маркера пригодного для селекции взаимодействуют, чтобы обеспечить пригодную для селекции активность, и, кроме того, вектор способен трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток.

В другом варианте реализации изобретения предлагается вектор, содержащий:

первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, и  
 вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, причем второй полипептид представляет собой исходный фрагмент маркера пригодного для селекции,

причем транскрипция первой нуклеиновой кислоты функционально связана с транскрипцией второй нуклеиновой кислоты, дополнительно содержащий:

третью нуклеиновую кислоту, кодирующую третий полипептид, причем третий полипептид способен связываться с первым полипептидом с образованием гетеромерного комплекса и

четвертую нуклеиновую кислоту, которая кодирует четвертый полипептид, причем четвертый полипептид представляет собой комплементарный фрагмент маркера пригодного для селекции,

причем транскрипция третьей нуклеиновой кислоты функционально связана с транскрипцией четвертой нуклеиновой кислоты,

причем исходная мутантная субъединица и комплементарная мутантная субъединица маркера пригодного для селекции взаимодействуют, чтобы обеспечить пригодную для селекции активность, и, кроме того, вектор способен трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток.

В дополнительном варианте реализации изобретения гетеромерный комплекс представляет собой иммуноглобулин. В одном варианте реализации изобретения первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина, в альтернативном варианте реализации изобретения первая нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина. В вышеупомянутых вариантах реализации изобретения пригодный для селекции маркер представляет собой метаболический фермент, выбранный из группы, состоящей из глутаминсинтетазы, треониндегидратазы, аденилосукцинатсинтетазы и глутаматдегидрогеназы.

Изобретение может включать внутренний сайт связывания рибосомы (IRES); в одном варианте реализации изобретения IRES находится на участке, выбранном из группы, состоящей из: участка между первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой; участка между третьей нуклеиновой кислотой и четвертой нуклеиновой кислотой и участков как между первой и второй, так и между третьей и четвертой нуклеиновыми кислотами. В дополнительном варианте реализации изобретения внутренний сайт связывания рибосомы содержит SEQ ID NO:23.

Для любого из описанных в данном документе варианта реализации изобретения, когда исходная мутантная субъединица маркера пригодного для селекции представляет собой N-концевой мутант глутаминсинтетазы (mutGS-NT), комплементарная мутантная субъединица маркера пригодного для селекции представляет собой C-концевой мутант глутаминсинтетазы (mutGS-CT). В одном из таких аспектов изобретения mutGS-NT содержит две или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из W60A N61A D63A D63R S66A и D76A, а mutGS-CT содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A и R324A. В одном варианте реализации изобретения mutGS-NT выбрана из группы, состоящей из W60A N61A D63A (mutGS-NT 1, SEQ ID NO:6), W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3, SEQ ID NO:25) и W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19); и mutGS-CT выбрана из группы, состоящей из E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT 1, SEQ ID NO:21) и N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22).

В других вариантах реализации изобретения N-концевые и C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы создаются путем расщепления белка в одной или нескольких аминокислотных положениях белка глутаминсинтетазы. В одном из таких аспектов изобретения N-концевой фрагмент и/или C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы расщепляются в аминокислотной позиции глутаминсинтетазы, выбранной из группы, состоящей из: E110, Y104, S125, N126, E264, T111, N105, N126, Q127 и N265

Изобретение также относится к выделенной клетке-хозяину, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована вектором, как описано выше. Клетка-хозяин может быть выбрана из группы, состоящей из CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, клеточной линии миеломы и клеток WI38. В одном аспекте изобретения предлагается способ получения гетеромерного комплекса, включающий стадию культивирования такой клетки-хозяина в условиях, когда гетеромерный комплекс экспрессируется клеткой-хозяином. В одном варианте реализации изобретения гетеромерный комплекс представляет собой антитело. Заявляемые способы согласно изобретению могут также включать выделение гетеромерного комплекса.

В одном варианте реализации изобретения предлагается система экспрессии, содержащая:

первый вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, которая функционально связана со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, причем второй полипептид представляет собой исходную мутантную субъединицу маркера пригодного для селекции, и

второй вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую третий полипептид, которая функционально связана с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей четвертый полипептид, причем четвертый полипептид является комплементарной мутантной субъединицей маркера пригодного для селекции, которая способна связываться с исходной мутантной субъединицей маркера пригодного для селекции для обеспечения пригодной для селекции активности,

кроме этого третий полипептид способен связываться с первым полипептидом с образованием гетеромерного комплекса;

кроме этого система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор указанных клеток.

В другом варианте реализации изобретения предлагается система экспрессии, содержащая:

первый вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, которая функционально связана со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, причем второй полипептид представляет собой исходный фрагмент маркера пригодного для селекции, и

второй вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую третий полипептид, которая функционально связана с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей четвертый полипептид, причем четвертый полипептид является комплементарным фрагментом маркера пригодного для селекции, который способен связываться с исходным мутантным фрагментом маркера пригодного для селекции для обеспечения пригодной для селекции активности, причем третий полипептид способен связываться с первым полипептидом с образованием гетеромерного комплекса;

кроме этого система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор указанных клеток.

В дополнительном варианте реализации изобретения гетеромерный комплекс представляет собой иммуноглобулин. В одном варианте реализации изобретения первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина, в альтернативном варианте реализации изобретения первая нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина. В вышеупомянутых вариантах реализации изобретения пригодный для селекции маркер представляет собой метаболический фермент, выбранный из группы, состоящей из глутаминсинтетазы, треониндегидратазы, аденилосукцинатсинтетазы и глутаматдегидрогеназы.

Система экспрессии, описанная выше согласно данному изобретению может включать внутренний сайт связывания рибосомы (IRES); в одном варианте реализации изобретения IRES находится на участке, выбранном из группы, состоящей из: участка между первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой; участка между третьей нуклеиновой кислотой и четвертой нуклеиновой кислотой и участков как между первой и второй, так и между третьей и четвертой нуклеиновыми кислотами. В дополнительном варианте реализации изобретения внутренний сайт связывания рибосомы содержит SEQ ID NO: 23.

В описанной в данном документе системе экспрессии, когда исходная мутантная субъединица маркера пригодного для селекции представляет собой N-концевой мутант глутаминсинтетазы (mutGS-NT), комплементарная мутантная субъединица маркера пригодного для селекции представляет собой C-концевой мутант глутаминсинтетазы (mutGS-CT). В одном из таких аспектов изобретения mutGS-NT содержит две или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из W60A N61A D63A D63R S66A и D76A, а mutGS-CT содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A и R324A. В одном варианте реализации изобретения mutGS-NT выбрана из группы, состоящей из W60A N61A D63A (mutGS-NT 1, SEQ ID NO:6), W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3, SEQ ID NO:25) и W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19); и mutGS-CT выбрана из группы, состоящей из E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1, SEQ ID NO:21) и N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22).

В других вариантах реализации изобретения N-концевые и C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы создаются путем расщепления белка в одной или нескольких аминокислотных положениях белка глутаминсинтетазы. В одном из таких аспектов изобретения N-концевой фрагмент и/или C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы расщепляются в аминокислотной позиции глутаминсинтетазы, выбранной из группы, состоящей из: E110, Y104, S125, N126, E264, T111, N105, N126, Q127 и N265

Изобретение также относится к выделенной клетке-хозяину, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована вектором, как описано выше.

Клетка-хозяин может быть выбрана из группы, состоящей из CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, клеточной линии миеломы и клеток WI38. В одном аспекте изобретения предлагается способ получения гетеромерного комплекса, включающий стадию культивирования такой клетки-хозяина в условиях, когда гетеромерный комплекс экспрессируется клеткой-хозяином. В одном варианте реализации изобретения гетеромерный комплекс представляет собой антитело. Заявляемые способы согласно изобретению могут также включать выделение гетеромерного комплекса.

В одном варианте реализации изобретения изобретение предлагает систему экспрессии, содержащую первый вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела, функционально связанную со второй нуклеиновой кислотой, которая кодирует глутаминсинтетазу с мутацией на N-конце (mutGS-NT) и второй вектор, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, функционально связанную с четвертой нуклеиновой кислотой, которая кодирует глутаминсинтетазу с мутацией на C-конце (mutGS-CT), причем каждая мутантная субъединица глутаминсинтетазы не имеет пригодной для селекции активности, если экспрессируется отдельно, а совместная экспрессия mutGS-NT с mutGS-CT обеспечивает активность глутаминсинтетазы, при этом система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток.

В одном варианте реализации изобретения изобретение предлагает систему экспрессии, содержащую первый вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела, функционально связанную со второй нуклеиновой кислотой, которая кодирует N-концевой фрагмент глутаминсинтетазы, и второй вектор, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, функционально связанную с четвертой нуклеиновой кислотой, которая кодирует C-концевой фрагмент глутаминсинтетазы, причем каждая мутантная субъединица глутаминсинтетазы не имеет пригодной для селекции активности, если экспрессируются по отдельности, а совместная экспрессия N-концевых и C-концевых фрагментов глутаминсинтетазы обеспечивают активность глутаминсинтетазы, при этом система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток.

В другом варианте реализации изобретения изобретение предлагает систему экспрессии, содержащую первый вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, функционально связанную со второй нуклеиновой кислотой, которая кодирует глутаминсинтетазу с мутацией на N-конце (mutGS-NT) и второй вектор, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела, функционально связанную с четвертой нуклеиновой кислотой, которая кодирует глутаминсинтетазу с мутацией на C-конце (mutGS-CT), причем каждая мутантная субъединица глутаминсинтетазы не имеет пригодной для селекции активности, если экспрессируется отдельно, а совместная экспрессия mutGS-NT с mutGS-CT обеспечивает активность глутаминсинтетазы, при этом система экспрессии способна трансфицироваться

в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток.

В другом варианте реализации изобретения изобретение предлагает систему экспрессии, содержащую первый вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, функционально связанную со второй нуклеиновой кислотой, которая кодирует N-концевой фрагмент глутаминсинтетазы, и второй вектор, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела, функционально связанную с четвертой нуклеиновой кислотой, которая кодирует C-концевой фрагмент глутаминсинтетазы, причем каждый фрагмент глутаминсинтетазы не имеет пригодной для селекции активности, если экспрессируются по отдельности, а совместная экспрессия N-концевых и C-концевых фрагментов глутаминсинтетазы обеспечивают активность глутаминсинтетазы, при этом система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток.

Для любых вышеуказанных вариантов реализации изобретения в одном аспекте изобретения mutGS-NT содержит две или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из W60A N61A D63A D63R S66A и D76A, а mutGS-CT содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A и R324A. В одном варианте реализации изобретения mutGS-NT выбрана из группы, состоящей из W60A N61A D63A (mutGS-NT1, SEQ ID NO:6), W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3, SEQ ID NO:25) и W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19); и mutGS-CT выбрана из группы, состоящей из E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1, SEQ ID NO:21) и N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22).

В других вариантах реализации изобретения N-концевые и C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы создаются путем расщепления белка в одной или нескольких аминокислотных положениях белка глутаминсинтетазы. В одном из таких аспектов изобретения N-концевой фрагмент и/или C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы расщепляются в аминокислотной позиции глутаминсинтетазы, выбранной из группы, состоящей из: E110, Y104, S125, N126, E264, T111, N105, N126, Q127 и N265

Аналогично, изобретение также относится к выделенной клетке-хозяину, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована вектором, как описано выше. Клетка-хозяин может быть выбрана из группы, состоящей из CHO, VERO, ВНК, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, клеточной линии миеломы и клеток WI38. В одном аспекте изобретения предлагается способ получения гетеромерного комплекса, включающий стадию культивирования такой клетки-хозяина в условиях, когда гетеромерный комплекс экспрессируется клеткой-хозяином. В одном варианте реализации изобретения гетеромерный комплекс представляет собой антитело. Заявляемые способы согласно изобретению могут также включать выделение гетеромерного комплекса.

Дополнительные аспекты изобретения включают систему экспрессии, содержащую первый вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий первую нуклеиновую



кислоту, кодирующую желаемый полипептид, функционально связанную со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей исходную мутантную субъединицу маркера пригодного для селекции, и второй вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий третью нуклеиновую кислоту, функционально связанную с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей комплементарную мутантную субъединицу маркера пригодного для селекции, причем первая и комплементарная мутантные субъединицы маркера пригодного для селекции ассоциируют с получением пригодной для селекции активности и при этом система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток, и кроме того первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь антитела, а третья нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь антитела. В одном варианте реализации изобретения пригодным для селекции маркером является глутаминсинтетаза.

Другие аспекты изобретения включают систему экспрессии, содержащую первый вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый полипептид, функционально связанную со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей исходный фрагмент маркера пригодного для селекции, и второй вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий третью нуклеиновую кислоту, функционально связанную с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей комплементарный фрагмент маркера пригодного для селекции, причем первый и комплементарный фрагменты маркера пригодного для селекции ассоциируют с получением пригодной для селекции активности и при этом система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток, и кроме того первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь антитела, а третья нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь антитела. В одном варианте реализации изобретения пригодным для селекции маркером пригодным для селекции маркером является глутаминсинтетаза.

В одном из таких аспектов изобретения глутаминсинтетаза содержит две комплементарные мутации; таким образом, mutGS-NT содержит две или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из W60A N61A D63A D63R S66A и D76A, и mutGS-CT содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A и R324A. В одном варианте реализации изобретения mutGS-NT выбран из группы, состоящей из W60A N61A D63A (mutGS-NT1, SEQ ID NO: 6), W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2, SEQ ID NO: 10), W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3; SEQ ID NO:25) и W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19); и mutGS-CT выбран из группы, состоящей из E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21) и N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22).

В других таких вариантах реализации изобретения N-концевые и C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы создаются путем расщепления белка в одной или нескольких аминокислотных положениях белка глутаминсинтетазы. В одном из таких аспектов изобретения N-концевой фрагмент и/или C-концевые фрагменты

глутаминсинтетазы расщепляются в аминокислотной позиции глутаминсинтетазы, выбранной из группы, состоящей из: E110, Y104, S125, N126, E264, T111, N105, N126, Q127 и N265

Изобретение также относится к выделенной клетке-хозяину, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована вектором, как описано выше. Клетка-хозяин может быть выбрана из группы, состоящей из CHO, VERO, ВНК, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, клеточной линии миеломы и клеток WI38. В одном аспекте изобретения предлагается способ получения гетеромерного комплекса, включающий стадию культивирования такой клетки-хозяина в условиях, когда гетеромерный комплекс экспрессируется клеткой-хозяином. В одном варианте реализации изобретения гетеромерный комплекс представляет собой антитело. Заявляемые способы согласно изобретению могут также включать выделение гетеромерного комплекса.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фигуре 1 изображено схематическое представление конструкций нуклеиновых кислот, используемых в Примерах 1-5, каждая из которых содержит субъединицу маркера пригодного для селекции и экспрессирует различные полипептиды, которые могут ассоциироваться с образованием гетеромерного комплекса в клетке. Аббревиатуры представляют собой следующее: muGS, мутантная глутаминсинтетаза; Amp<sup>r</sup>, устойчивость к ампициллину. На Фигуре 1(A) изображен вектор А (LC:mutGS-CT), а на Фигуре 1(B) изображен вектор В (НС:mutGS-NT).

На Фигуре 2 изображен график, показывающий результаты эксперимента 1 по обеспечению выживаемости. Конструкции А и В для каждой версии (1-5) трансфицировали в нокаутные клетки CHO-K1 GS и тестировались на их способность обеспечивать жизнедеятельность клеток в средах, в которых отсутствует глутамин. В качестве контроля использовали плазмиду, экспрессирующую полноразмерный фермент GS.

На Фигуре 3 изображен график, показывающий, что ни один из фрагментов А или В, взятый отдельно, не способен обеспечить жизнеспособность клеточной линии КО, подтверждая, что оба фрагмента необходимы для восстановления активности фермента GS.

На Фигуре 4 изображено схематическое представление векторов экспрессии, используемых в Примере 6, каждый из которых содержит легкую цепь или тяжелую цепь антитела, IRES и фрагмент глутаминсинтетазы.

На Фигуре 5 изображен график, показывающий использование векторов фрагментов GS после генов LC и НС. Комбинация векторов 2А-LC и 2В-НС смогли обеспечить жизнеспособность клеток, нокаутных относительно GS.

На Фигуре 6 изображен график, показывающий продуктивность клеток отобранных пулов конструкции 2 в анализе производительности при культивировании с подпиткой в течении 10 дней и сравнение его с контрольным пулом, который был отобран с использованием вектора, экспрессирующего полноразмерный фермент глутаминсинтетазу.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Эффективное продуцирование рекомбинантных гетеромерных комплексов в

клетках улучшается, если каждый компонент комплекса экспрессируется в пропорциональных и больших количествах. Данное изобретение улучшает отбор трансфицированных клеток путем предоставления способов и композиций для отбора рекомбинантно модифицированных клеток, которые экспрессируют более одного гетерологичного полипептида в пропорциональных количествах, таким образом, что полипептиды могут эффективно связываться с образованием гетеромерного комплекса с более высокими уровнями экспрессии, чем в случае гетеромерных комплексов, полученных традиционными способами. Данное изобретение также обеспечивает преимущество в том, что оно уменьшает время, необходимое для отбора клеток, экспрессирующих высокие уровни желаемого рекомбинантного гетеромерного полипептидного комплекса, другой аспект улучшения отбора трансфицированных клеток предлагается в данном изобретении.

Хотя терминология, используемая в данной заявке, является стандартной в данной области техники, определения некоторых терминов приводятся в данном документе для обеспечения ясности и определенности в смысле формулы изобретения. Единицы, префиксы и символы могут быть обозначены в принятой форме СИ (Международная система единиц). Числовые диапазоны, приведенные в данном документе, включают числа, определяющие диапазон, и включают и подтверждают каждое целое число в пределах указанного диапазона. Способы и технические средства, описанные в данном документе, обычно выполняются в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании, если не указано иное. См., например, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) и Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Раскрытые способы применимы для адгезивных культур или суспензионных культур, выращенных в реакторах с мешалкой (в том числе традиционных полунепрерывных и периодических культур клеток с подпиткой, которые могут, но не обязательно, содержать центробежный фильтр), перфузионных системах (включая культуры, выращиваемые с применением изменяющегося тангенциального потока («ATF»), акустические перфузионные системы, системы перфузии с фильтрующим элементом глубинного типа и другие системы), биореакторы с полыми волокнами (HFB, которые в некоторых случаях могут быть использованы в перфузионных процессах), а также различные другие способы культивирования клеток (см., например, Tao *et al.*, (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 82:751-65; Kuystermans & Al-Rubeai, (2011) “Bioreactor Systems for Producing Antibody from Mammalian Cells”, в Antibody Expression and Production. Cell Engineering 7:25-52, Al-Rubeai (ed) Springer; Catapano *et al.*, (2009) “Bioreactor Design and Scale-Up”, в Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice. Eibl *et al.* (eds) Springer-Verlag, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

Используемые в данном документе термины, обозначающие существительные в

одиночном числе означают одно или более, если специально не указано иное. Кроме того, если иное не указано в контексте, термины в одиночном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. Как правило, номенклатуры, используемые в связи с и технологиями культуры клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, описанные в данном документе, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области техники.

В данном раскрытии предложены способы модуляции свойств клеточных культур, экспрессирующих «представляющий интерес белок», «представляющий интерес белок» включает природные белки, рекомбинантные белки и сконструированные белки (например, белки, которые не встречаются в природе и которые были разработаны и/или созданы людьми). Представляющий интерес белок может, но не обязательно, представлять собой белок, который известно или предположительно является терапевтически значимым. Конкретные примеры представляющего интерес белка включают антигенсвязывающие белки (как описано и определено в данном документе), пептид-ассоциированные антитела (т.е. молекула, содержащая пептид(ы), слитый либо непосредственно, либо косвенно с другими молекулами, такими как Fc-домен антитела, где фрагмент пептида специфически связывается с желаемой мишенью, пептид(ы) может быть слит либо с Fc-областью, либо вставлен в Fc-петлю, либо в модифицированную молекулу Fc, например, как описано в публикации заявки на патент США № US2006/0140934, включенной в данный документ в полном объеме посредством ссылки), слитые белки (например, Fc-слитые белки, где фрагмент Fc слит с белком или пептидом, включая пептид-ассоциированное антитело), цитокины, факторы роста, гормоны и другие встречающиеся в природе секретируемые белки, а также мутантные формы встречающихся в природе белков.

Термин «гетеромерный комплекс» означает молекулярный комплекс, образованный ассоциацией, по меньшей мере, двух разных молекул. Ассоциация может представлять собой нековалентное взаимодействие или ковалентное соединение, например дисульфидные связи. Две разные молекулы обычно представляют собой два разных полипептида, однако изобретение рассматривает гетеромерные комплексы между полипептидами и нуклеиновыми кислотами и между различными нуклеиновыми кислотами. В одном варианте реализации изобретения гетеромерный комплекс обеспечивает функциональную активность, такую как способность связываться с субстратом (например, иммуноглобулин, способный связываться с соответствующим антигеном), ферментативную активность или тому подобное. В одном варианте реализации изобретения гетеромерный комплекс согласно изобретению секретируется в культуральную среду клетки-хозяина, в которой он продуцируется.

Используемые в контексте данного документа термины «ассоциирование» или «взаимодействие» предназначены для описания взаимосвязи между, по меньшей мере, двумя молекулами, причем одна молекула связывается с другими и/или влияет на активность других. Взаимодействие может включать прямое или косвенное связывание

двух полипептидов (или полипептида и нуклеиновой кислоты), или функциональную активацию или ингибирование активности молекулы другой молекулой.

В конкретном варианте реализации изобретения гетеромерный комплекс представляет собой молекулу иммуноглобулина. Иммуноглобулин в системах позвоночных представляет собой антитело, состоящее из двух одинаковых легких цепей и двух одинаковых тяжелых цепей. Четыре цепочки соединены вместе с помощью дисульфидных связей, таким образом, что каждая легкая цепь соединена с тяжелой цепью, а тяжелые цепи соединены между собой на своих хвостах, в целом образуя Y-образный гетеромерный комплекс. Известны многочисленные способы, посредством которых можно манипулировать ДНК, кодирующими молекулы иммуноглобулина, для получения ДНК, способных кодировать рекомбинантные белки, такие как антитела с повышенной аффинностью или другие полипептиды на основе антител (см., например, Larrick et al. (1989), *Biotechnology* 7:934-938; Reichmann et al. (1988), *Nature* 332:323-327; Roberts et al. (1987), *Nature* 328:731-734; Verhoeven et al. (1988), *Science* 239:1534-1536; Chaudhary et al. (1989), *Nature* 339:394-397).

Рекомбинантные клетки, продуцирующие человеческие антитела (например, полученные с использованием библиотек антител и/или трансгенных животных и, необязательно, дополнительно модифицированные *in vitro*), а также гуманизированные антитела также могут быть использованы в изобретении. См., например, Cabilly et al., Патент США № 4,816,567; Cabilly et al., Европейский патент № 0,125,023 B1; Boss et al., Патент США № 4816397; Boss et al., Европейский патент № 0,120,694 B1; Neuberger et al., WO 86/01533; Neuberger et al., Европейский патент № 0,194,276 B1; Winter, Патент США № 5,225,539; Winter, Европейский патент № 0,239,400 B1; Queen et al., Европейский патент № 0,451,216 B1; и Padlan et al., Европейский патент № 0,519,596 A1. Например, изобретение может быть использовано для индуцирования экспрессии человеческих и/или гуманизированных антител, которые иммуноспецифически распознают специфические клеточные мишени, например рецептор EGF человека, антиген *her-2/neu*, антиген CEA, простатспецифический мембранный антиген (PSMA), CD5, CD11a, CD18, NGF, CD20, CD45, Еp-cam, другие поверхностные молекулы раковых клеток, TNF-альфа, TGF-b 1, VEGF, другие цитокины, альфа-4 бета 7 интегрин, IgE, вирусные белки (например, цитомегаловируса) и т. д., перечислив таким образом лишь некоторые.

Примеры гетеромерных комплексов, помимо иммуноглобулинов, включают, но не ограничиваются этим, любой гетеродимерный или гетеро-олигомерный белок, например BMP2/BMP7, остеогенный белок, интерлейкин-1-конвертирующий фермент (ICE), различные рецепторы интерлейкина (например, рецептор IL-18, рецептор IL-13, рецептор IL-4 и рецептор IL-7), рецепторы ядра, такие как ретиноидные рецепторы, рецепторы Т-клеток, интегрины, такие как молекулы адгезии клеток, интегрины, рецептор фактора некроза опухолей и растворимые и связанные с мембраной формы белков главного комплекса гистосовместимости класса I и класса II (MHC). Для гетеромерных комплексов, которые являются рецепторами, изобретение охватывает как растворимые, так и связанные

с мембраной формы полипептидов. Описания дополнительных гетеромерных белков, которые могут быть получены в соответствии с изобретением, можно найти, например, в Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, Vol. II (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge Mass., 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, Eds. Oxford University Press Inc., New York, 1993) и The Cytokine Handbook (A W Thompson, ed.; Academic Press, San Diego Calif.; 1991).

Используемый в контексте данного документа термин «слитый белок» относится к белку или домену белка (например, растворимому внеклеточному домену), слитому с гетерологичным белком или пептидом. Примеры таких слитых белков включают белки, экспрессируемые в виде слитых с частью молекулы иммуноглобулина, белки, экспрессируемые в виде белков, слитых с фрагментом застежки, и новые полифункциональные белки, такие как слитые белки цитокинов и факторы роста (то есть GM-CSF и IL-3, MGF и IL-3). В WO 93/08207 и WO 96/40918 описано получение различных растворимых олигомерных форм молекулы, обозначенной как CD40L, включая слитый белок иммуноглобулина и слитый белок с застежкой, соответственно; способы, обсуждаемые в нем, применимы к другим белкам. Любая из описанных в данном документе молекул может быть экспрессирована в качестве слитого белка, включая, но не ограничиваясь этим, внеклеточный домен молекулы клеточного рецептора, фермент, гормон, цитокин, часть молекулы иммуноглобулина, домен застежки и эпитоп.

Термин «антигенсвязывающий белок» используется в самом широком смысле и означает белок, содержащий участок, который связывается с антигеном или мишенью и, необязательно, каркас или основу, которые позволяют антигенсвязывающей части принимать конформацию, которая способствует связыванию антигенсвязывающего белка с антигеном. Примеры антигенсвязывающих белков включают антитело человека, гуманизированное антитело; химерное антитело; рекомбинантное антитело; одноцепочечное антитело; диатело; триатело; тетратело; фрагмент Fab; фрагмент F(ab')<sub>2</sub>; антитело IgD; антитело IgE; антитело IgM; антитело IgG1; антитело IgG2; антитело IgG3; или антитело IgG4, и их фрагменты. Антигенсвязывающий белок может содержать, например, альтернативный белковый каркас или искусственный каркас с привитыми CDR или производными CDR. Такие каркасы включают, но не ограничиваются этим, полученные из антител каркасы, содержащие мутации, введенные, например, для стабилизации трехмерной структуры антигенсвязывающего белка, а также полностью синтетические каркасы, содержащие, например, биосовместимый полимер. См., например, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1): 121-129 (2003); Roque et al., *Biotechnol. Prog.* 20:639-654 (2004). Кроме того, могут быть использованы миметики пептидных антител («ПАМ»), а также каркасы на основе миметиков антител с использованием компонентов фибронектина в качестве каркаса.

Антигенсвязывающий белок может иметь, например, структуру встречающегося в природе иммуноглобулина. «Имуноглобулин» представляет собой тетрамерную молекулу. Во встречающемся в природе иммуноглобулине каждый тетрамер состоит из

двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит переменный участок от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственный за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи представляет константную область, в основном ответственную за эффекторную функцию. Легкие цепи человека классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно.

Встречающиеся в природе цепи иммуноглобулина имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность или CDR. От N-конца до C-конца как легкие, так и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Обозначение аминокислот для каждого домена может быть определено в соответствии с определениями Kabat et al. в *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed., US Dept, of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, (1991). По желанию, CDR также можно переопределить в соответствии с альтернативной схемой номенклатуры, такой как Chothia (см. Chothia & Eesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., (1989) *Nature* 342:878-883 или Honegger & Pluckthun, (2001) *J. Mol. Biol.* 309:657- 670).

В контексте данного раскрытия антигенсвязывающий белок, как указывается, «специфически связывается» или «избирательно связывается» с его целевым антигеном, когда константа диссоциации ( $K_D$ ) составляет  $\leq 10^{-8}$  М. Антитело специфически связывается с антигеном с «высокой аффинностью» в случае, когда  $K_D$  составляет  $\leq 5 \times 10^{-9}$  М и «очень высокой аффинностью» в случае, когда  $K_D$  составляет  $\leq 5 \times 10^{-10}$  М.

Термин «антитело» включает ссылку на гликозилированные и негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса или на их антигенсвязывающую область, которая конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное. Дополнительно, термин «антитело» относится к интактному иммуноглобулину или к его антигенсвязывающей части, который конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное. Антигенсвязывающие участки могут быть получены способами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител и могут образовывать элемент представляющего интерес белка. Антигенсвязывающие части включают, среди прочего, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, доменные антитела (dAb), фрагменты, включая области, определяющие комплементарность (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела, диатела, триатела, тетратела и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, которая является достаточной для специфического связывания антигена с полипептидом.

Термин «антитело» относится к молекуле, в которой структура и/или функция основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или цельной

молекулы иммуноглобулина и/или получены из доменов вариабельной тяжелой цепи (VH) и/или вариабельной легкой цепи (VL) антитела или его фрагмента. Таким образом, конструкция антитела способна связываться с ее специфической мишенью или антигеном. Кроме того, связывающий домен конструкции антитела в соответствии с изобретением содержит минимальные структурные требования к антителу, которые обеспечивают связывание мишени. Это минимальное требование может быть, например, определено наличием по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH), предпочтительно, всех шести CDR. Альтернативным подходом для определения минимальных требований к структуре антитела является определение эпитопа антитела в структуре конкретной мишени, соответственно, белкового домена целевого белка, составляющего эпитопную область (эпитопный кластер), или путем ссылки на специфическое антитело, конкурирующее с эпитопом определенного антитела. Антитела, на которых основаны конструкции в соответствии с изобретением, включают, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела.

Fab-фрагмент представляет собой моновалентный фрагмент, имеющий  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$  домены; фрагмент  $F(ab')_2$  представляет собой бивалентный фрагмент, имеющий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент имеет домены  $V_H$  и  $C_{H1}$ ; Fv-фрагмент имеет  $V_L$  и  $V_H$ -домены одного плеча антитела; фрагмент dAb имеет домен  $V_H$ , домен  $V_L$  или антигенсвязывающий фрагмент домена  $V_H$  или  $V_L$ ; изолированную область, определяющую комплементарность (CDR); и одноцепочечный Fv (scFv) (патенты США № 6,846,634, 6,696,245, заявки на патент США № 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546).

Одноцепочечное антитело (scFv) представляет собой антитело, в котором области  $V_L$  и  $V_H$  соединены с помощью линкера (например, синтетической последовательности аминокислотных остатков) с образованием непрерывной белковой цепи, в которой линкер достаточно длинный, чтобы позволить белковой цепи свернуться таким образом, чтобы образовать моновалентный сайт связывания антигена (см., например, Bird et al., *Science* 242:423-26 (1988) и Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83). Диатела представляют собой двухвалентные антитела, содержащие две полипептидные цепи, где каждая полипептидная цепь содержит  $V_H$  и  $V_L$ -домены, соединенные линкером, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, что позволяет каждому домену спариваться с комплементарным доменом на другой полипептидной цепи (см., например, Holliger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48; и Poljak et al., (1994) *Structure* 2:1121-23). Если две полипептидные цепи диатела идентичны, то диатело, полученное в результате их спаривания, будет иметь два идентичных антигенсвязывающих сайта. Полипептидные цепи, имеющие различные последовательности, могут быть использованы для образования диатела с двумя



различными сайтами связывания антигена. Аналогично, триатела и тетратела представляют собой антитела, содержащие три и четыре полипептидных цепи, соответственно, и образуют соответственно три и четыре сайта связывания антигена, которые могут быть одинаковыми или разными.

Кроме того, термин «антитело» включает моновалентные, двухвалентные и поливалентные/многовалентные конструкции и, таким образом, биспецифические конструкции, специфически связывающиеся только с двумя антигенными структурами, а также полиспецифические/мультиспецифические конструкции, которые специфически связываются с более чем двумя антигенными структурами, например, тремя, четырьмя или более, с помощью отдельных связывающих доменов. Кроме того, термин «антитело» включает молекулы, состоящие только из одной полипептидной цепи, а также молекулы, состоящие из более чем одной полипептидной цепи, причем цепи могут быть либо идентичными (гомодимеры, гомотримеры, или гомоолигомеры), либо различными (гетеродимер, гетеротример или гетероолигомер). Примеры вышеуказанных антител и их вариантов или их производных описаны, в частности, в Harlow and Lane, *Antibodies a laboratory manual*, CSHL Press (1988) и Using *Antibodies: a laboratory manual*, CSHL Press (1999), Kontermann and Dribel, *Antibody Engineering*, Springer, 2nd ed. 2010 и Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009.

Используемый в контексте данного документа термин «биспецифический» относится к антителу, которое является «по меньшей мере биспецифическим», то есть оно содержит, по меньшей мере, первый связывающий домен и второй связывающий домен, где первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (в данном случае: поверхностный антиген клетки-мишени), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью. Соответственно, конструкции биспецифических антител имеют специфичность по меньшей мере к двум разным антигенам или мишеням. Биспецифические антитела могут также включать мультиспецифические конструкции антител, такие как триспецифические конструкции антител, последние из которых имеют три связывающих домена, или конструкции, имеющие специфичность более чем к трем мишеням (например, четырем, пяти ...).

Одна или несколько CDR могут быть включены в молекулу либо ковалентно, либо нековалентно, чтобы сделать молекулу антигенсвязывающим белком. Антигенсвязывающий белок может содержать CDR как часть более длинной полипептидной цепи, может ковалентно связывать CDR с другой полипептидной цепью или может содержать CDR нековалентно. CDR позволяют антигенсвязывающему белку специфически связываться с конкретным представляющим интерес антигеном.

Антигенсвязывающий белок может иметь один или несколько сайтов связывания. Если имеется более одного сайта связывания, сайты связывания могут быть идентичны друг с другом или могут быть разными. Например, встречающийся в природе человеческий иммуноглобулин обычно имеет два идентичных сайта связывания, тогда как «биспецифическое» или «бифункциональное» антитело имеет два разных сайта

связывания.

Для ясности и, как описано в данном документе, следует отметить, что антигенсвязывающий белок может, но не обязательно, иметь человеческое происхождение (например, человеческое антитело) и в некоторых случаях будет содержать белок нечеловеческого происхождения, например, белок крысы или мыши, а в других случаях антигенсвязывающий белок может содержать гибрид человеческих и нечеловеческих белков (например, гуманизированное антитело).

Интересующий белок может включать/подразумевать человеческое антитело. Термин «человеческое антитело» включает все антитела, которые имеют одну или несколько переменных и константных областей, полученных из последовательностей иммуноглобулина человека. В одном варианте реализации изобретения все переменные и константные домены получены из последовательностей иммуноглобулина человека (полностью человеческое антитело). Такие антитела могут быть получены различными способами, в том числе путем иммунизации генетически модифицированной мыши представляющим интерес антигеном для экспрессии антител, полученных из генов тяжелой и/или легкой цепи человека, таких как мышь, полученная из систем Xenomouse®, UltiMab™ или Velocimmune®. Также можно использовать подходы, основанные на применении фагов.

Альтернативно, представляющий интерес белок может содержать гуманизированное антитело. «Гуманизированное антитело» имеет последовательность, которая отличается от последовательности антитела, полученной от видов, не являющихся человеком, одной или несколькими аминокислотными заменами, делециями и/или вставками таким образом, что гуманизированное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее выраженный иммунный ответ при его введении человеку по сравнению с антителом, полученным от вида, не являющегося человеком. В одном варианте реализации изобретения некоторые аминокислоты в каркасе и константных доменах тяжелых и/или легких цепей антител не относящихся к человеку видов мутированы с образованием гуманизированного антитела. В другом варианте реализации изобретения константный домен(ы) из человеческого антитела слиты с переменным доменом(ами) видов, не являющихся человеком. Примеры того, как получить гуманизированные антитела, можно найти в патентах США № 6,054,297, 5,886,152 и 5,877,293.

Область «Fc» в качестве используемого в контексте данного документа термина содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащих домены антитела C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями доменов C<sub>H</sub>3. Протеины, представляющие интерес, содержащие область Fc, включая антигенсвязывающие белки и Fc-слитые белки, представляют другой аспект данного раскрытия.

«Гемитело» представляет собой иммунологически функциональную конструкцию иммуноглобулина, содержащую полную тяжелую цепь, полную легкую цепь и вторую

область Fc тяжелой цепи, соединенную с областью Fc полной тяжелой цепи. Линкер может, но не обязательно, использоваться для присоединения области Fc тяжелой цепи ко второй области Fc тяжелой цепи. В конкретных вариантах реализации изобретения гемитело представляет собой одновалентную форму антигенсвязывающего белка, раскрытую в данном документе. В других вариантах реализации изобретения пары заряженных остатков могут быть использованы для связывания одной области Fc со второй областью Fc. Гемитело может представлять собой белок, представляющий интерес в контексте данного раскрытия.

Термин «клетка-хозяин» означает клетку, которая была генетически модифицирована для экспрессии полипептида, представляющего коммерческий или научный интерес. Генетическая модификация клеточной линии включает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей рекомбинантную молекулу полинуклеотида («представляющий интерес ген») и/или иное изменение (например, путем гомологичной рекомбинации и активации гена или слияния рекомбинантной клетки с не рекомбинантной клеткой), чтобы обеспечить экспрессию клеткой-хозяином желаемого рекомбинантного полипептида. Способы и векторы для генетической модификации клеток и/или клеточных линий для экспрессии представляющего интерес полипептида хорошо известны специалистам в данной области техники; 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. Термин включает потомство родительской клетки, независимо от того, идентично ли потомство морфологически или генетически первоначальной родительской клетке, в том случае, пока присутствует ген, представляющий интерес. Культура клеток может содержать одну или более клеток-хозяев.

Термин «гибридома» означает клетку или потомство клетки, полученной в результате слияния immortalized клетки и клетки, продуцирующей антитела. Полученная гибридома представляет собой immortalized клетку, которая продуцирует антитела. Отдельные клетки, используемые для создания гибридомы, могут быть получены из любого источника, представляющего собой млекопитающего, включая, но не ограничиваясь этим, хомяка, крысу, свинью, кролика, овцу, козу и человека.

Этот термин также охватывает линии клеток триомы, которые получают, когда потомство слияний гетерогридной миеломы, которые являются продуктом слияния между клетками человека и линией клеток миеломы мыши, впоследствии сливаются с плазматической клеткой. Под термином подразумевается любая immortalized гибридная клеточная линия, которая продуцирует антитела, такие как, например, квадромы (см., например, Milstein et al., (1983) *Nature*, 537:3053).

Термины «культура» и «культура клеток» используются взаимозаменяемо и относятся к популяции клеток, которая поддерживается в среде в условиях, подходящих

для выживания и/или роста популяции клеток. Как будет ясно специалистам в данной области техники, эти термины также относятся к комбинации, содержащей популяцию клеток и среду, в которой культура поддерживается.

Термины «полипептид» и «белок» (например, используемые в контексте представляющего интерес белка или представляющего интерес полипептида) используются взаимозаменяемо в данном документе для обозначения полимера аминокислотных остатков. Термины также применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой аналог или миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе аминокислотными полимерами. Термины также могут охватывать аминокислотные полимеры, которые были модифицированы, например, путем добавления углеводных остатков с образованием гликопротеинов или фосфорилированы. Полипептиды и белки могут быть получены с помощью встречающейся в природе и нерекомбинантной клетки, или полипептиды и белки могут быть получены с помощью генетически модифицированной или рекомбинантной клетки. Полипептиды и белки могут включать молекулы, имеющие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, имеющие делеции, вставки и/или замены одной или нескольких аминокислот нативной последовательности.

Термины «полипептид» и «белок» охватывают молекулы, содержащие только встречающиеся в природе аминокислоты, а также молекулы, которые содержат не встречающиеся в природе аминокислоты. Примеры не встречающихся в природе аминокислот (которые могут быть замещены любой встречающейся в природе аминокислотой, обнаруженной в любой последовательности, раскрытой в данном документе, если необходимо) включают (без ограничения): 4-гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутамат,  $\epsilon$ -N, N, N-триметиллизин,  $\epsilon$ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин,  $\sigma$ -N-метиларгинин и другие аналогичные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В используемой в данном документе номенклатуре полипептидов левое направление представляет собой направление в сторону amino-конца, а правое направление представляет собой направление в сторону карбокси-конца в соответствии со стандартным использованием и условным обозначением.

Под «культурой клеток» или «культурой» понимается рост и распространение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования клеток млекопитающих известны в данной области техники. См., например, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих можно культивировать в суспензии или на поверхности твердого субстрата. Могут использоваться биореакторы с псевдооживленным слоем, биореакторы с полыми волокнами, вращающиеся флаконы, колбы со встряхиванием или биореакторы с мешалкой, с или без микроносителей. В одном варианте реализации изобретения используются биореакторы объемом 500 л - 2000 л. В одном варианте реализации

изобретения используются биореакторы объемом 1000 л - 2000 л.

Термин «среда для культивирования клеток» (также называемая «культуральная среда», «среда для культивирования клеток», «среда для культивирования тканей») относится к любому питательному раствору, используемому для выращивания клеток, например, клеток животных или млекопитающих, и который обычно обеспечивает по меньшей мере один или более компонентов из следующего: источник энергии (обычно в виде углевода, такого как глюкоза); одну или более из всех незаменимых аминокислот и, как правило, двадцать основных аминокислот плюс цистеин; витамины и/или другие органические соединения, обычно требуемые при низких концентрациях; липиды или свободные жирные кислоты; и микроэлементы, например, неорганические соединения или встречающиеся в природе элементы, которые обычно требуются при очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне.

Питательный раствор необязательно может быть дополнен дополнительными необязательными компонентами для оптимизации роста клеток, такими как гормоны и другие факторы роста, например, инсулин, трансферрин, эпидермальный фактор роста, сыворотка и тому подобное; соли, например, кальций, магний и фосфат, и буферы, например, HEPES; нуклеозиды и основания, например, аденозин, тимидин, гипоксантин; и гидролизаты белков и тканей, например, гидролизованный животный или растительный белок (пептон или смеси пептона, которые могут быть получены из побочных животных продуктов, очищенного желатина или растительного материала); антибиотики, например, гентамицин; клеточные защитные вещества или поверхностно-активные вещества, такие как Pluronic®F68 (также называемый Lutrol® F68 и Kolliphor® P188, неионные триблок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли(пропиленоксида)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (полиэтиленоксида)); полиамины, например, путресцин, спермидин и спермин (см., например, публикацию WIPO № WO 2008/154014) и пируват (см., например, патент США № 8053238) в зависимости от потребностей культивируемых клеток и/или параметров желаемой культуры клеток.

Клеточные культуральные среды включают те, которые обычно применяются и/или известны для использования с любым процессом культивирования клеток, таким как, но не ограничиваясь этим, полунепрерывное, полунепрерывное продленное, с подпиткой и/или проточное или непрерывное культивирование клеток.

«Базовая» (или полунепрерывная) среда для культивирования клеток относится к клеточной культуральной среде, которая обычно используется для инициирования клеточной культуры и является достаточно полной для поддержки клеточной культуры.

Культурная среда для «роста» относится к среде для культивирования клеток, которая обычно используется в культурах клеток в период экспоненциального роста, «фазы роста» и достаточно полная для поддержки клеточной культуры на этой фазе. Культуральная среда для роста клеток также может содержать селективные агенты, которые придают устойчивость или выживаемость пригодным для селекции маркерам,

включенным в линию клеток-хозяев.

Такие селективные агенты включают, но не ограничиваются этим, генетицин (G4118), неомицин, гигромицин В, пурамицин, зеоцин, метионинсульфоксимин, метотрексат, культуральную среду, не содержащую глутамин, среду для культивирования клеток, не содержащую глицин, гипоксантин и тимидин, или только тимидин.

Культуральная клеточная среда для «продуцирования» относится к среде для культивирования клеток, которая обычно используется в клеточных культурах во время перехода, когда экспоненциальный рост заканчивается, а производство белка переходит на фазы «перехода» и/или «получения продукта» и достаточно полная для поддержания требуемой плотности клеток, жизнеспособности и/или титра продукта во время этой фазы.

«Проточная» среда для культивирования клеток относится к среде для культивирования клеток, которая обычно используется в клеточных культурах, которые поддерживаются проточными или непрерывными способами культивирования и достаточно полная для поддержки культуры клеток во время этого процесса. Приготовления проточной культуральной клеточной среды могут быть более обогащенными или более концентрированными, чем приготовления основной культуральной клеточной среды, с целью адаптации способа, используемого для удаления отработанной среды. Проточная клеточная культуральная среда может использоваться как на стадии роста, так и на стадии продуцирования.

Концентрированная клеточная культуральная среда может содержать некоторые или все питательные вещества, необходимые для поддержания клеточной культуры; в частности, концентрированная среда может содержать питательные вещества, которые, как определено, или как известно, потребляются во время фазы продуцирования культуры клеток. Концентрированная среда может быть основана на любом приготовлении среды для культуры клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать некоторые или все компоненты среды для культивирования клеток в количестве, например, около 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X или даже около 1000X от их обычного количества.

Компоненты, используемые для приготовления клеточной культуральной среды, могут быть полностью измельчены с получением порошкообразного приготовления среды; частично измельчены с жидкими добавками, добавленными в среду для культивирования клеток в случае необходимости; или добавлены в полностью жидкой форме к культуре клеток.

Клеточные культуры также могут быть дополнены независимыми концентрированными питательными смесями определенных питательных веществ, которые сложно вводить в состав приготовления или быстро истощаются в клеточных культурах. Такими питательными веществами могут быть аминокислоты, такие как тирозин, цистеин и/или цистин (см., например, публикацию WIPO № 2012/145682). В одном варианте реализации изобретения концентрированный раствор тирозина отдельно подаются в культуру клеток, выращиваемую в клеточной культуральной среде, содержащей

тирозин, таким образом, что концентрация тирозина в культуре клеток не превышает 8 мМ. В другом варианте реализации изобретения концентрированный раствор тирозина и цистина отдельно подаются в культуру клеток, выращиваемую в культуральной клеточной среде без тирозина, цистина или цистеина. Отдельные питательные смеси могут вноситься до или в начале фазы продуцирования. Отдельные питательные смеси могут быть добавлены при культивировании с подпиткой в культуральную клеточную среду в те же или другие дни, что и концентрированная питательная среда. Отдельные питательные компоненты также могут добавляться проточным способом в те же или другие дни, что и проточная среда.

«Не содержащая сыворотку» относится к среде для культивирования клеток, которая не содержит животных сывороток, таких как фетальная бычья сыворотка. Различные среды для культивирования тканей, включая указанные культуральные среды, являются коммерчески доступными, например, может использоваться любая комбинация следующих клеточных культуральных сред: среда RPMI-1640, среда RPMI-1641, среда Игла, модифицированная по Дульбекко (DMEM), минимальная основная среда Игла, среда F-12К, среда Хэма F12, среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков, среда Маккоя 5А, среда Лейбовица L-15 и среда без сыворотки, такая как EX-CELL™ серий 300 (JRH Biosciences, Ленекса, Канзас) и другие. Также доступны не содержащие сыворотку версии таких культуральных сред. Культуральные клеточные среды могут быть дополнены дополнительными или повышенными концентрациями компонентов, таких как аминокислоты, соли, сахара, витамины, гормоны, факторы роста, буферы, антибиотики, липиды, микроэлементы и тому подобное, в зависимости от потребностей клеток, которые должны быть культивированы и/или желаемых параметров культуры клеток.

Термин «биореактор» означает любую емкость, пригодную для роста клеточной культуры. Клеточные культуры согласно данному раскрытию могут быть выращены в биореакторе, который может быть выбран на основе применения представляющего интерес белка, который вырабатывается клетками, растущими в биореакторе. Биореактор может иметь любой размер, если он пригоден для культивирования клеток; как правило, размер биореактора соответствует объему культуры клеток, выращиваемой внутри него. Как правило, биореактор будет иметь объем не менее 1 литра и объем может составлять 2, 5, 10, 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12 000 литров или более, или любой промежуточный объем между указанными величинами. Внутренние условия биореактора, включая, но не ограничиваясь этим, рН и температуру, можно контролировать в течение периода культивирования. Специалисты в данной области техники будут знать и смогут выбрать подходящие биореакторы для использования в практике данного изобретения на основе соответствующих соображений.

«Плотность клеток» относится к числу клеток в данном объеме культуральной среды. «Плотность жизнеспособных клеток» относится к числу живых клеток в данном объеме культуральной среды, при определении стандартными аналитическими способами определения жизнеспособности (такими как способ вытеснения трипанового синего).

Термин «жизнеспособность клеток» означает способность клеток в культуре выживать при заданном наборе условий культивирования или экспериментальных изменениях. Термин также относится к той части клеток, которая жива в определенное время по отношению к общему количеству клеток, живых и мертвых, в культуре в это время.

«Объем клеточной массы» (PCV), также называемый «процентный объем клеточной массы» (%PCV), представляет собой отношение объема, занимаемого клетками, к общему объему культуры клеток, выраженное в процентах (см. Stettler, et al., (2006) *Biotechnol Bioeng. Dec 20:95(6): 1228-33*). Объем клеточной массы зависит от плотности клеток и диаметра клеток; увеличение объема клеточной массы может быть связано с увеличением плотности клеток или диаметра клеток, либо и того и другого. Объем клеточной массы является мерой содержания твердого вещества в культуре клеток. Твердые вещества удаляются при сборе и дальнейшей очистке. Большое количество твердых веществ означает больше усилий для отделения твердого материала от желаемого продукта во время сбора и последующих этапов очистки. Кроме того, желаемый продукт может быть заключен в твердых веществах и потерян во время процесса сбора, что приводит к снижению выхода продукта. Поскольку клетки-хозяева различаются по размеру, а клеточные культуры также содержат мертвые и умирающие клетки и другой клеточный дебрис, объем клеточной массы является более точным способом описания содержания твердого вещества в культуре клеток, чем плотность клеток или плотность жизнеспособных клеток. Например, культура объемом 2000 л, имеющая плотность клеток  $50 \times 10^6$  клеток/мл, имела бы значительно различающиеся объемы клеточной массы в зависимости от размера клеток. Кроме того, некоторые клетки, находящиеся в состоянии остановки роста, будут увеличиваться в размерах, поэтому объем клеточной массы до остановки роста и после остановки роста, вероятно, будет различаться из-за увеличения биомассы в результате увеличения размера клетки.

«Остановка роста», которая также может упоминаться как «остановка роста клеток», является точкой, в которой клетки перестают увеличиваться в количестве или когда прохождение клеточного цикла останавливается. Остановку роста можно отслеживать, определяя плотность жизнеспособных клеток в клеточной культуре. Некоторые клетки в состоянии остановки роста, могут увеличиваться в размере, но не в количестве, поэтому объем клеточной массы культуры, находящейся в состоянии остановки роста, может увеличиваться. Остановка роста может быть частично отменена, если клетки не находятся в состоянии ухудшения состояния здоровья, обратив вспять условия, которые приводят к остановке роста.

Термин «титр» означает общее количество представляющего интерес полипептида или белка (который может представлять собой представляющий интерес встречающийся в природе или рекомбинантный белок), продуцируемого культурой клеток в данном объеме среды. Титр может быть выражен в единицах миллиграмм или микрограмм полипептида или белка на миллилитр (или другая мера объема) среды. «Кумулятивный титр» - это титр,



создаваемый клетками при выращивании в культуре, и может определяться, например, путем измерения суточных значений титра и использования этих значений для расчета кумулятивного титра.

Термин «культура с подпиткой» относится к форме суспензионной культуры и означает способ культивирования клеток, в котором дополнительные компоненты добавляются в культуру после начала процесса культивирования один или более раз. Добавляемые компоненты обычно содержат питательные добавки для клеток, которые были истощены во время процесса культивирования. Дополнительно или альтернативно, дополнительные компоненты могут включать добавочные компоненты (например, соединения, ингибирующее прохождение клеточный цикл). Культуру с подпиткой обычно останавливают в какой-то момент, и клетки и/или компоненты в среде отбирают и, необязательно, очищают.

Термины «интегрированная плотность жизнеспособных клеток» или «IVCD» используются взаимозаменяемо и означают среднюю плотность жизнеспособных клеток при культивировании, умноженную на количество времени, в течение которого проходило культивирование.

«Совокупная плотность жизнеспособных клеток» (CVCD) рассчитывается путем умножения средней плотности жизнеспособных клеток (VCD) между двумя точками времени на величину прошедшего времени между этими двумя точками времени.

CVCD - это площадь под кривой, полученной путем построения графика VCD относительно времени.

В изобретении используются пригодные для селекции маркеры, которые могут быть подвергнуты внутригенной комплементации для прямого отбора экспрессионных конструкций, которые кодируют гетеромерные белки, такие как антитела, с использованием двухвекторной системы. «Внутригенная комплементация» относится к комплементации между частями генетического материала (то есть нуклеиновых кислот), каждая из которых имеет отличающийся дефект в пределах одного и того же локуса. Отдельный белок, кодируемый генетическим материалом, является дефектным и нефункциональным, но два отдельных дефектных белка могут ассоциироваться с образованием активного белка. Если отдельные дефектные белки способны ассоциировать и проявлять активность, отдельные дефектные белки считаются «комплементарными». Для пригодных для селекции маркерных белков, которые состоят из нескольких идентичных субъединиц (таких как GS), внутригенная комплементация может возникать, когда мутантные субъединицы являются комплементарными.

«Внутригенная комплементация» также может происходить между фрагментами отдельного белка, кодируемого генетическим материалом, которые ассоциируют с образованием активного белка. Как описано в данном документе, зрелый фермент GS у высших эукариот существует в виде декамерного комплекса, состоящего из двух пентамерных колец. Данное изобретение демонстрирует, что внутригенная комплементация GS может быть успешно использована как часть системы отбора для

получения клеточных линий, экспрессирующих рекомбинантные белки. Системы полезны для экспрессии рекомбинантного антитела на высоких уровнях в клетках СНО, которые генетически модифицированы, чтобы быть дефицитными относительно глутаминсинтетазы.

Отдельный белок, кодируемый генетическим материалом, оказывается дефектным и нефункциональным в результате введения одной или нескольких мутаций в кодирующей нуклеиновой кислоте, причем мутация(и) изменяет структуру белка достаточно, чтобы сделать его нефункциональным. Мутация или мутации могут быть введены любым способом, известным в области молекулярной биологии. Альтернативно, может использоваться фрагмент белка, который поврежден и нефункционален. В таком случае два фрагмента белка могут ассоциироваться с образованием активного белка путем внутригенной комплементации.

Созданы молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид и мутантную субъединицу маркера пригодного для селекции, устроенный таким образом, что экспрессия мутантной субъединицы коррелирует с экспрессией полипептида. Таким образом, когда молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие комплементарные мутантные субъединицы, вводятся в клетки и применяются селективные условия, приблизительно одинаковые и высокие уровни экспрессии каждой из комплементарных мутантных субъединиц обеспечивают максимальную пригодную для селекции активность. Кроме того, функционально связанные полипептиды будут экспрессироваться в почти одинаковых и больших количествах, таким образом оптимизируя отбор клеток, экспрессирующих одинаковые и высокие уровни желаемых полипептидов.

В одном варианте реализации изобретения пригодный для селекции маркер представляет собой глутаминсинтетазу (GS), активный сайт которой расположен на стыке двух субъединиц GS, поэтому совместная экспрессия комплементарных, функционально нарушенных мутантных субъединиц должна приводить к получению некоторого количества интактных функционально активных сайтов. Отдельные субъединицы мутантов не имеют значительной пригодной для селекции активности по отдельности, но обеспечивают пригодную для селекции активность при совместной экспрессии с их комплементарной мутантной субъединицей. Оптимальная активность субъединиц может зависеть от их взаимодействия и таким образом может обеспечиваться взаимодействием доменов. Такие взаимодействующие домены могут быть эндогенными по отношению к субъединице или могут быть гетерологичными по отношению к субъединице. Дополнительные пригодные для селекции маркеры, которые применимы в данном изобретении, включают аргининсукцилатлиазу, аденилосукцилатсинтетазу и глутаматдегидрогеназу, для которых могут быть идентифицированы комплементарные мутанты. Например, внутригенная комплементация у мутантов аргининсукцилатлиазы может быть подтверждена с помощью роста в отсутствие аргинина, тогда как внутригенная комплементация у мутантов аденилосукцилатсинтетазы может быть подтверждена с помощью роста в отсутствие аденозина.

В одном неограничивающем варианте реализации изобретение влечет за собой использование двух фрагментов маркера пригодного для селекции, каждый из которых может быть экспрессирован в виде слитого белка в домене взаимодействия. При экспрессии домен взаимодействия способствует ассоциации или димеризации двух фрагментов, тем самым позволяя субъединицам функционировать и обеспечивать пригодную для селекции активность (например, но не ограничиваясь этим, как описано в Pelletier et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci., 95:12141-12146). Подходящие пригодные для селекции маркеры включают GS и другие пригодные для селекции маркеры, описанные выше, а также пригодные для селекции маркеры, такие как те, которые придают устойчивость к конкретным лекарственным средствам, которые обычно являются токсичными, и метаболические ферменты, которые обеспечивают выживаемость клеток или индуцируют гибель клеток в определенных условиях, как раскрыто в данном документе.

«Домен взаимодействия» представляет собой домен, включая, но не ограничиваясь этим, полипептиды, способные облегчать взаимодействие или ассоциацию двух или более гомологичных или гетерологичных полипептидов. В одном варианте реализации изобретения домен взаимодействия представляет собой доменом димеризации. Домен димеризации может представлять собой полипептид, способный индуцировать взаимодействие или ассоциацию двух полипептидов. Существует два типа димеров, те, которые способны формировать гомодимеры (имеющие одинаковую последовательность) или гетеродимеры (имеющие разную последовательность).

В одном иллюстративном, но не ограничивающем варианте реализации изобретения, домен взаимодействия представляет собой полипептид с суперспиралью и лейциновой застежкой. Лейциновая застежка обычно содержит около 35 аминокислот, имея при этом характерный повтор из семи аминокислот с гидрофобными остатками в первом и четвертом остатках повтора (Harbury et al. (1993), Science 262:1401). Таким образом, лейциновая застежка применима к слиянию с полипептидом с целью олигомеризации полипептида, поскольку она является малой молекулой, и с меньшей вероятностью нарушает нормальную функцию полипептидов, нежели более крупный домен взаимодействия. Примеры лейциновых застежек включают, но не ограничиваются этим, домены лейциновой застежки из полипептидов, таких как GCN4, C/EBP, c-Fos, c-Jun, c-Myc и c-Max.

Дополнительные примеры доменов димеризации включают домены спираль-петля-спираль (Murre et al. (1989), Cell 58:537-544). Рецептор ретиноевой кислоты, рецептор тиреоидного гормона, другие ядерные рецепторы гормонов (Kurokawa et al. (1993), Genes Dev. 7:1423-1435) и факторы транскрипции дрожжей GAL4 и HAP1 (Marmonstein et al. (1992), Nature 356:408-414; Zhang et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2851-2855; патент США № 5,624,818), все они имеют области димеризации с этим мотивом.

В еще одном варианте реализации изобретения домен взаимодействия представляет собой домен тетрамеризации, который представляет собой полипептид, способный связываться с тремя другими доменами тетрамеризации с образованием тетрамерного

комплекса. Примеры белков, содержащих домены тетрамеризации, включают, но не ограничиваются этим, репрессор лактозы *E. coli* (аминокислоты 46-360, Chakerian et al. (1991), *J. Biol. Chem.* 266:1371; Alberti et al. (1993), *EMBO J.* 12:3227; и Lewis et al. (1996), *Nature* 271:1247) и домен тетрамеризации p53, сформированный остатками 322-355 (Clare et al. (1994), *Science* 265:386; Harbury et al. (1993), *Science* 262:1401; патент США № 5,573,925).

В альтернативном варианте реализации изобретение влечет за собой использование трех субъединиц маркера пригодного для селекции, каждая из которых экспрессируется в виде слитого белка в домене взаимодействия, тем самым усиливая ассоциацию для обеспечения пригодной для селекции активности. В этом варианте реализации изобретения имеются три компонента гетеромерного комплекса. В экспрессированных кодирующих последовательностях вектора(ов) каждая из них функционально связана с кодирующими последовательностями каждой из соответствующих субъединиц маркера пригодного для селекции, например, биспецифическое антитело, экспрессируемое в виде одной тяжелой цепи и двух отличающихся легких цепей, причем обе легкие цепи могут связываться с тяжелой цепью. Изобретение также охватывает использование пригодных для селекции маркеров, известных или еще подлежащих изучению, которые имеют четыре или даже более субъединицы.

Данное изобретение также будет полезно для получения гетеромультимерных (или гетероолигомерных) белков, которые содержат три или более субъединицы, такие как те, которые описаны выше. Это включает биспецифические антитела и другие гетеромультимерные белки, которые известны в данной области техники. Например, биспецифическое антитело может быть экспрессировано с использованием первого маркера пригодного для селекции, который может подвергаться внутригенной комплементации, как описано в данном документе (например, GS), для экспрессии тяжелой цепи и легкой цепи первого антитела и другого маркера пригодного для селекции, такого как разделенный метаболический фермент или маркер устойчивости, или второго маркера пригодного для селекции, который отличается от первого маркера пригодного для селекции и может подвергаться внутригенной комплементации, экспрессировать тяжелую цепь и легкую цепь второго антитела, которое способно связываться с первым антителом с образованием биспецифического антитела.

Альтернативно, первый пригодный для селекции маркер, который способен к внутригенной комплементации, как описано в данном документе (например, GS), может быть использован для экспрессии двух различных тяжелых цепей биспецифического антитела, где тяжелые цепи способны связываться друг с другом. Затем легкие цепи могут быть экспрессированы с использованием другого маркера пригодного для селекции. В некоторых случаях легкая цепь может быть одинаковой для обоих плеч биспецифического антитела, что указывает на то, что для экспрессии легких цепей можно использовать один пригодный для селекции маркер (метаболический фермент или маркер устойчивости или другую форму маркера пригодного для селекции). Альтернативно, другая легкая цепь

может ассоциироваться с каждой отличающейся тяжелой цепью биспецифического антитела, и в этом случае другой пригодный для селекции маркер, такой как разделенный метаболический фермент или маркер устойчивости, или второй пригодный для селекции маркер, который отличается от первого маркера пригодного для селекции и может подвергаться внутригенной комплементации, используется для экспрессии первой и второй легких цепей.

Как будет показано ниже в примерах, было обнаружено, что способы и композиции согласно изобретению уменьшают время, необходимое для отбора требуемых клеток, экспрессирующих высокие уровни гетеромультимерного белка. Таким образом, в еще одном варианте реализации изобретение охватывает отбор клеток, экспрессирующих высокие уровни рекомбинантного полипептида, в частности гетеромультимерных полипептидов. Кроме того, изобретение имеет особую полезность в улучшении продуцирования гетеромерных комплексов посредством процессов клеточной культуры.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие субъединицы мутантных маркеров, слиты в рамке с нуклеиновой кислотой, кодирующей линкер, который далее слит в рамке с нуклеиновой кислотой, кодирующей домен взаимодействия. Линкеры могут включать любую относительно короткую гибкую последовательность, которая позволяет взаимодействующему домену взаимодействовать и субъединицам функционировать для обеспечения пригодной для селекции активности. Примеры линкеров в большом количестве известны в соответствующей области техники и могут включать GPGGG, GPGGG, где в однобуквенных аминокислотных кодах G представляет собой глицин, а P представляет собой пролин. В одном варианте реализации изобретения линкер представляет собой серию остатков глицина и серина, например, описанную Curtis et al. (1991; Proc Natl Acad Sci 88(13):5809-5813).

В одном варианте реализации изобретения две комплементарные мутантные субъединицы экспрессируются из двух векторов, где первый вектор содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, и где первая нуклеиновая кислота функционально связана со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей мутантную субъединицу маркера пригодного для селекции. Второй вектор содержит третью нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который способен связываться с первым полипептидом, кодируемым первой нуклеиновой кислотой, причем третья нуклеиновая кислота функционально связана с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей комплементарную мутантную субъединицу маркера пригодного для селекции. Таким образом, оба вектора одновременно вводятся в популяцию клеток, и проводится отбор на внутригенную комплементацию.

В другом варианте реализации изобретения два комплементарных фрагмента экспрессируются из двух векторов, где первый вектор содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, и где первая нуклеиновая кислота функционально связана со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей фрагмент маркера пригодного для селекции. Второй вектор содержит третью нуклеиновую кислоту,

кодирующую полипептид, который способен связываться с первым полипептидом, кодируемым первой нуклеиновой кислотой, причем третья нуклеиновая кислота функционально связана с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей комплементарный фрагмент маркера пригодного для селекции. Таким образом, оба вектора одновременно вводятся в популяцию клеток, и проводится отбор на внутригенную комплементацию.

Например, двухвекторная система для экспрессии антитела конструируется путем создания первого вектора, содержащего первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну цепь антитела, причем первая нуклеиновая кислота функционально связана со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей *mutGS-NT*. Вторым вектором содержит третью нуклеиновую кислоту, кодирующую другую цепь антитела, причем третья нуклеиновая кислота функционально связана с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей *mutGS-ST*. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина. Альтернативно, первая нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина.

В другом варианте реализации изобретения два комплементарных фрагмента экспрессируются из двух векторов, где первый вектор содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, и где первая нуклеиновая кислота функционально связана со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей фрагмент маркера пригодного для селекции. Вторым вектором содержит третью нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который способен связываться с первым полипептидом, кодируемым первой нуклеиновой кислотой, причем третья нуклеиновая кислота функционально связана с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей комплементарный фрагмент маркера пригодного для селекции. Таким образом, оба вектора одновременно вводятся в популяцию клеток, и проводится отбор на внутригенную комплементацию.

В таком случае, двухвекторная система для экспрессии антитела конструируется путем создания первого вектора, содержащего первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну цепь антитела, причем первая нуклеиновая кислота функционально связана со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей N-концевой фрагмент глутаминсинтетазы. Вторым вектором содержит третью нуклеиновую кислоту, кодирующую другую цепь антитела, причем третья нуклеиновая кислота функционально связана с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей C-концевой фрагмент глутаминсинтетазы. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина. Альтернативно, первая нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина.

Дополнительный вариант реализации изобретения включает использование одного

или нескольких IRES, допуская экспрессию одной или обеих субъединиц mutGS. «IRES» в контексте данного изобретения означает внутренний сайт связывания рибосомы, который облегчает инициацию трансляции мРНК с внутреннего сайта (то есть сайта, отличающегося от 5'-конца мРНК).

Одним из примеров подходящего IRES является IRES вируса энцефаломиокардита (ECMV), как описано в Jang and Wimmer *Genes & Development* 4 1560 (1990) и Jang, Davies, Kaufman and Wimmer *J. Vir.* 63 1651 (1989). Остатки 335-848 EMCV образуют подходящий IRES; другие варианты или части ECMV IRES известны и будут пригодны для использования в данном изобретении. Подходящей частью или вариантом IRES является такая, которая будет способствовать достаточной трансляции второй открытой рамки считывания (ОРС).

Кроме того, 3'-конец IRES может быть изменен (или мутирован) для уменьшения эффективности трансляции, тем самым обеспечивая средство для улучшения способов отбора и/или амплификации. Например, эффективность IRES может быть уменьшена с использованием последовательности, которая, как ранее стало известно, обеспечивает эффективный отбор и амплификацию (Aldrich et al., *Biotechnol Prog* 19, 1433; 2003). Альтернативные последовательности известны или могут быть определены специалистом в данной области техники.

В другом варианте реализации изобретение дополнительно включает нуклеиновую кислоту, кодирующую другой функциональный пригодный для селекции маркер, в дополнение к субъединице маркера пригодного для селекции и полипептида гетеромерного комплекса. В контексте данного документа «другой функциональный пригодный для селекции маркер» не является мутантной субъединицей маркера пригодного для селекции, который способен к внутригенной комплементации, но представляет собой белок с другой пригодной для селекции активностью. Хорошо известные маркеры, такие как зеомин, неомин, пурамицин, бластицидин S или GPT, который придает устойчивость к микофенольной кислоте и т. д., могут использоваться в качестве других функциональных пригодных для селекции маркеров. Дополнительно, также могут быть использованы комплементарные мутанты другого маркера пригодного для селекции, который способен к внутригенной комплементации.

В этом варианте реализации изобретение включает два вектора, где каждый из векторов содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который может образовывать гетеромерный комплекс, функционально связанную со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей по меньшей мере одну мутантную субъединицу маркера пригодного для селекции, а также нуклеиновой кислотой, кодирующей другой функциональный пригодный для селекции маркер. Кроме того, соответствующие полипептиды, кодируемые первой нуклеиновой кислотой каждого вектора, могут ассоциироваться с образованием комплекса, а субъединица или субъединицы, кодируемые вторыми нуклеиновыми кислотами каждого вектора, могут ассоциироваться с обеспечением пригодной для селекции активности, а полипептиды, кодируемые третьими

нуклеиновыми кислотами обеспечивают пригодную для селекции активность, отличающуюся от пригодной для селекции активности субъединиц, кодируемых вторыми нуклеиновыми кислотами.

Например, первый вектор может кодировать устойчивость к неомицину, а второй вектор может кодировать устойчивость к зеомицину, либо только один вектор может содержать дополнительный другой функциональный пригодный для селекции маркер. Таким образом, один вектор трансфицируется в клеточную линию и проводится отбор (т.е. препарат G418 добавляется к клеткам, устойчивым к неомицину). После отбора обычные способы могут быть использованы для определения наличия вектора и уровня экспрессии полипептидов, кодируемых нуклеиновыми кислотами вектора, например, путем ПЦР, саузерн-блоттинга, ELISA, вестерн-блоттинга и тому подобного. После получения высокого уровня экспрессии второй вектор трансфицируется в клеточную линию.

При продолжении отбора относительно первого вектора проводится отбор относительно второго маркера пригодного для селекции (т. е. на резистентность к зеомицину) и оценивается наличие второго вектора и экспрессии соответствующих белков, кодируемых вектором. В этом варианте реализации изобретения, как только было определено, что оба вектора присутствуют, проводится отбор относительно экспрессии субъединиц, которые ассоциируются в клетке, чтобы обеспечить пригодную для селекции активность, как описано в данном документе.

В альтернативном варианте реализации изобретения обе нуклеиновые кислоты согласно изобретению, кодирующие независимые пригодные для селекции активности, трансфицируются одновременно и отбор проводится одновременно. Как только было определено, что оба вектора присутствуют, проводится отбор относительно экспрессии субъединиц, которые ассоциируются в клетке, чтобы обеспечить пригодную для селекции активность, как описано выше.

В еще одном варианте реализации изобретения векторы согласно изобретению, кодирующие независимые пригодные для селекции активности, каждый трансфицируются в отдельные клеточные линии. После проведения отбора и идентификации клонов, которые экспрессируют высокие уровни белков, кодируемых каждым желаемым вектором, клетки сливаются, как описано в *Nogi et al.* (Патент США № 5,916,771). После завершения слияния проводится отбор относительно пригодной для селекции активности, обеспечиваемой субъединицами.

В еще одном варианте реализации изобретения нуклеиновые кислоты согласно изобретению, необязательно не содержащие отдельную пригодную для селекции активность, трансфицируются одновременно с третьим вектором. Третий вектор кодирует отдельную пригодную для селекции активность, такую как, например, устойчивость к неомицину или бета-галактозидазу, которая может позволить провести предварительный отбор клеток, которые были успешно трансфицированы. Как только этот предварительный отбор будет выполнен, может быть проведен отбор относительно пригодной для селекции активности мутантных субъединиц. В этом варианте реализации изобретения используются



равные количества двух векторов экспрессии для трансфекции, в то время как количество третьего вектора для трансфекции составляет одну треть от концентрации первых двух векторов (например, отношение 3:3:1 или 6:6:1 или тому подобное). Специалист в данной области техники поймет, что изменения в соотношениях находятся в пределах объема изобретения.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие компонент желаемого гетеромерного комплекса, могут быть получены в виде кДНК или в виде геномной ДНК способами, известными в данной области техники. Например, матричная РНК, кодирующая желаемый компонент, может быть выделена из подходящего источника, с использованием стандартных способов выделения РНК, и использования олиго-dT-целлюлозной хроматографии для отделения поли-А мРНК. В случае, когда гетеромерный комплекс, который должен быть экспрессирован, представляет собой антитело, подходящие источники желаемых нуклеиновых кислот могут быть выделены из зрелых В-клеток или культуры гибридомы. Кроме того, нуклеиновые кислоты для использования в изобретении могут быть получены с помощью химического синтеза.

В дополнение к нуклеиновой кислоте, кодирующей желаемый компонент гетеромерного комплекса, векторные конструкции могут содержать дополнительные компоненты для облегчения репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках, интеграции конструкции в эукариотическую хромосому и маркеры для проведения отбора и/или скрининга клеток, содержащих конструкцию. Векторы согласно изобретению представляют собой рекомбинантные векторы ДНК, включая, но не ограничиваясь этим, плазмиды, фаги, фагмиды, космиды, вирусы, ретровирусы и тому подобное, которые вводят желаемую нуклеиновую кислоту в клетку.

Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она имеет функциональную связь с другой нуклеиновой кислотой. Более конкретно, функциональная связь означает, что две разные нуклеиновые кислоты, кодирующие разные полипептиды, транскрибируются при одновременном индуцировании. Функциональная связь также должна означать, что связанные нуклеиновые кислоты могут соседствовать в единой транскрипционной единице, тогда как трансляция начинается от одного или нескольких сайтов связывания рибосомы (например, внутреннего сайта связывания рибосомы).

Функционально связанные транскрипционные единицы, которые кодируют два разных полипептида, называются «бицистронные транскрипты».

Способы согласно изобретению также могут быть использованы в сочетании с известными или еще не обнаруженными способами индукции продуцирования рекомбинантных белков. Под «индуцирующими условиями» подразумевается способ увеличения относительного продуцирования желаемого рекомбинантного белка в клетке. К таким способам, перечислив лишь несколько примеров, относятся температурный сдвиг и добавление химических веществ, и комбинации любых известных или еще не обнаруженных способов, а также любые еще не описанные и/или не обнаруженные способы индукции. Как правило, периодическая или проточная культура

клеток с высокой плотностью индуцируется для получения рекомбинантного белка. Часто другие клеточные процессы (такие как рост и деление) ингибируются, чтобы направлять большую часть энергии клеток на производство рекомбинантного белка.

В способах и композициях согласно изобретению можно использовать любой пригодный для селекции маркер, имеющий субъединицы. При использовании в контексте данного документа термин «субъединица» в контексте маркера пригодного для селекции относится к части маркера пригодного для селекции. Кроме того, первая мутантная субъединица (называемая в данном документе «исходной мутантной субъединицей») маркера пригодного для селекции может быть экспрессирована со второй комплементарной мутантной субъединицей (называемой в данном документе «комплементарной мутантной субъединицей») одного и того же маркера пригодного для селекции, чтобы обеспечить уровень пригодной для селекции активности, не характерный ни для одной из мутантных субъединиц по отдельности. Субъединица также может относиться к полипептиду, имеющему мутации, которые комплементируются другим мутированным полипептидом, который также представляет собой другую субъединицу маркера пригодного для селекции.

Пригодные для селекции маркеры, которые придают устойчивость к конкретным лекарственным средствам, которые обычно токсичны для животной клетки, могут быть использованы в способах и композициях согласно изобретению. Например, далее указаны неограничивающие примеры пригодных для селекции маркеров стойкости: зеомидин (zeo); пурамицин (PAC); бластицидин S (BlaS), GPT, который придает устойчивость к микофенольной кислоте (Mulligan & Berg (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072); ген устойчивости к неомицину, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Colberre-Garapin et al. (1981), J. Mol. Biol. 150:1); и ген устойчивости к гигромицину, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre et al. (1984), Gene 30:147).

Метаболические ферменты, которые обеспечивают выживаемость клеток или индуцируют гибель клеток в заданных условиях, также могут быть использованы в способах и композициях согласно изобретению. Примеры включают, но не ограничиваются этим: дигидрофолатредуктаза (DHFR); тимидинкиназа вируса простого герпеса (TK) (Wigler et al. (1977), Cell 11:223), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT) (Szybalska & Szybalski (1962), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026) и аденин-фосфорибозилтрансфераза (APRT) (Lowy et al. (1980), Cell 22:817), которые представляют собой гены, которые могут быть использованы в клетках, не имеющих T3, HGPRT или APRT, соответственно.

В одном варианте реализации изобретения глутаминсинтетаза (GS) представляет собой пригодный для селекции маркер, используемым в способах и композициях согласно данному изобретению. GS содержит два соединенных пентамерных кольца идентичных субъединиц с десятью активными сайтами, образованными N-концевыми остатками одной субъединицы и C-концевыми остатками соседней субъединицы. N-концевые (mutGS-NT) и C-концевые (mutGS-CT) мутантные конструкции получают и оценивают относительно комплементации. Ни mutGS-NT, ни mutGS-CT не позволяют проходить клеточному росту

в среде, не содержащей глутамин, однако, когда GS-мутантные клетки трансфицируются обеими конструкциями, те клетки, которые трансфицированы обеими конструкциями на аналогичных уровнях, выживают в средах без глутамин. Когда происходит совместная трансфекция двумя такими мутантами, мутанты называются «комплементарными». Альтернативно, могут быть использованы клетки, экспрессирующие эндогенную GS, и трансфектанты могут быть отобраны, придавая повышенную устойчивость к токсическим уровням метионинсульфоксимины (MSX).

Пригодные для селекции маркеры, основанные на отборе по цвету, также могут использоваться в способах и композициях согласно изобретению. В конкретном примере можно использовать бета-галактозидазу (Blau et al.,

WO 98/44350). Флуоресцентные маркеры также могут быть использованы в способах согласно данному изобретению, например, GFP использовался для клонального отбора клеток для измерения взаимодействия белков в исследованиях комплементации белка-фрагмента (Remy and Michnick, 1999), Proc. Natl. Acad. Sci., 96:5394- 5399). Аналогично конъюгированный с флуоресцеином метотрексат может быть использован для обнаружения клеток, экспрессирующих комплементарные фрагменты DHFR (Remy and Michnick, 2001), Proc. Natl. Acad. Sci., 98:7678-83). Преимущество флуоресцентных маркеров заключается в том, что этот отбор может быть выполнен на любом типе животных клеток и не ограничен теми, которые имеют дефект в метаболическом пути или не требуют чувствительности к лекарственным средствам, например, к неомицину.

Используемый в контексте данного документа термин «полипептид» включает встречающиеся в природе или рекомбинантно экспрессированные белки, включая до- и посттрансляционную обработку, или их фрагменты, которые обычно сохраняют вторичную структуру. Белки представляют собой крупные молекулы с большой молекулярной массой (от около 10 000 для небольших (от 50 до 100 аминокислот) до более чем 1 000 000 для некоторых форм); они состоят из различных количеств тех же 20 аминокислот, которые в интактном белке объединены с помощью ковалентных химических связей, называемых пептидными связями. Связанные вместе аминокислоты образуют линейные неразветвленные полимерные структуры, называемые полипептидными цепями; такие цепи могут содержать сотни аминокислотных остатков; они расположены в определенном порядке для данных видов белка. Термин «пептид» включает короткие фрагменты полипептидов или белков, обычно длиной менее 20 аминокислот.

Термин «культура клеток» означает рост и распространение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Обычно культура клеток выращивается при стерильной, контролируемой температуре и атмосферных условиях в емкостях для культивирования тканей (например, 10-сантиметровые чашках, 96-луночных планшетах и т.д.) или в виде другой адгезивной культуры (например, на гранулах из микроносителя) или в суспензионной культуре, например, в бутылках с перемешиванием. Культуры можно выращивать в емкостях со встряхиванием, небольших биореакторах и/или крупномасштабных биореакторах. Биореактор представляет собой устройство,

используемое для культивирования клеток, в котором можно отслеживать и корректировать условия окружающей среды, такие как температура, атмосфера, перемешивание и/или pH. Ряд компаний (например, ABS Inc., Wilmington, Del, Cell Trends, Inc., Middletown, Md.), а также организации, финансируемые университетами и/или правительством (например, The Cell Culture Center, Миннеаполис, Миннесота) предлагают услуги по клеточному культивированию на контрактной основе.

Оптимальные периоды, при которых культуры находятся в контакте с агентами, которые отбирают пригодную для селекции активность, являются более длительными, чем обычный период одного нормального цикла роста (например, для клеток яичника китайского хомячка (клетки CHO), для которых сообщается о длительности одного цикла роста примерно 20-22 ч (Rasmussen et al. (1998), *Cytotechnology*, 28:31-42)). Таким образом, в одном варианте реализации изобретения культуры включают пригодные для селекции условия, например, лекарственные средства, метаболиты или цветные субстраты, предпочтительно в течение по меньшей мере около одного дня, более предпочтительно в течение по меньшей мере около 3 дней и еще более предпочтительно в течение по меньшей мере около 7 дней.

Широкое разнообразие линий животных клеток, подходящих для роста в культуре, доступно, например, в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Виргиния) и NRRL (Пеория, Иллинойс). Некоторые из наиболее известных клеточных линий, обычно используемых в промышленной или научной лаборатории, включают клеточные линии CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, CV1, MDCK, 293, 3T3, PC12, миелому (например, NSO) и WI38, перечислив лишь некоторые примеры. В других вариантах реализации изобретения клеточные линии, не являющиеся животными клеточными линиями, могут быть использованы в способах согласно изобретению, например, клеточные линии растений, клеточные линии насекомых (например, sf9), дрожжевых клеток или бактериальных клеток, таких как *E. coli*.

В одном варианте реализации изобретения используются GS-дефицитные клетки CHO, такие как CHOZN® GS -/-ZFN-модифицированные клетки CHO (Sigma Aldrich Fine Chemicals, Сент-Луис, Миссури). GS-дефицитные клетки CHO (или другие клетки млекопитающих) также могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники. Кроме того, клетками CHO легко манипулировать в качестве адгезивных или суспензионных культур и они проявляют относительно хорошую генетическую стабильность. Кроме того, новые линии клеток животных могут быть получены с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области техники (например, путем трансформации, вирусной инфекции и/или отбора).

Как отмечено выше, для экспрессии гетеромерных комплексов согласно изобретению можно использовать множество векторных систем, экспрессирующихся в хозяине. В случае, когда гетеромерный комплекс является растворимым, пептид или полипептид могут быть выделены из культуры, то есть из клетки-хозяина, в тех случаях, когда гетеромерные комплексы не секретируются, и из культуральной среды в случаях,

когда гетеромерные комплексы секретируются клетками. Однако системы экспрессии также охватывают модифицированные клетки-хозяева, которые экспрессируют гетеромерные комплексы, закрепленные в клеточной мембране.

Очистка или обогащение гетеромерных комплексов из таких систем экспрессии может быть осуществлена с использованием подходящих детергентов и липидных мицелл и способов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Однако такие модифицированные клетки-хозяева могут использоваться в ситуациях, когда важно не только сохранить структурные и функциональные параметры гетеромерных комплексов, но и оценить биологическую активность, например, в анализах скрининга лекарственных средств.

Белок, экспрессируемый согласно способов изобретения, может быть отобран. Кроме того, белок может быть очищен или частично очищен от такой культуры или компонента (например, из культуральной среды или клеточных экстрактов или жидкости организма) с использованием известных способов. Словосочетание «частично очищен» означает, что была проведена какая-либо процедура фракционирования или процедуры, но присутствует больше видов полипептидов (по меньшей мере 10%), нежели желаемый белок. Под «очищенным» подразумевается, что белок является по существу гомогенным, т.е. присутствует менее 1% загрязняющих белков. Процедуры фракционирования могут включать, но не ограничиваются этим, один или несколько этапов фильтрации, центрифугирования, осаждения, разделения фаз, аффинной очистки, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии (SEC), хроматографии посредством гидрофобного взаимодействия (HIC; с использованием таких смол, как фениловый эфир, бутиловый эфир или пропиловый эфир), ВЭЖХ или некоторую комбинацию вышеперечисленного.

Изобретение также необязательно включает дальнейшее приготовление белков. Под термином «приготовление» подразумевается, что для белков может быть заменен буфер, они могут быть стерилизованы, упакованы в многодозовой форме и/или упакованы для конечного пользователя. Для целей изобретения термин «стерильная многодозовая форма» означает, что приготовление является свободным или по существу свободным от микробного загрязнения (до такой степени, насколько это приемлемо для пищевых целей и/или лекарственных средств) и имеет определенный состав и концентрацию.

Термин «форма стерильной единичной дозы» означает форму, подходящую для введения или потребления клиентом и/или пациентом. Такие композиции могут содержать эффективное количество белка в комбинации с другими компонентами, такими как физиологически приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент. Термин «физиологически приемлемый» означает нетоксичный материал, который не влияет на эффективность биологической активности активного ингредиента(ов).

В соответствии с данным изобретением были разработаны наборы инактивирующих мутаций, которые кодируют изменения в N-конце (mutGS-NT) белка GS млекопитающего, а также наборы инактивирующих мутаций, которые кодируют изменения в C-конце

(mutGS-CT) белка. Каталитический сайт GS подвергался аланиновому сканированию, при котором мутации были сделаны индивидуально и в комбинации ко всем эволюционно консервативным остаткам аланина, которые участвуют в связывании глутамата, АТФ и/или аммиака. Большинство остатков были отобраны на основании данных опубликованных рентгенографических и биохимических исследований ферментов GS, но все остатки в пределах 4,5 Å субстратов/лигандов/металлов в активном центре были оценены как потенциальные кандидаты. Были идентифицированы комбинации N-концевых и C-концевых каталитически нарушенных, но структурно интактных мутантов GS и оценены на способность комплементировать друг друга, чтобы восстановить некоторую активность GS при совместной экспрессии.

Двухвекторную систему создавали путем объединения экспрессии одной цепи антитела с mutGS-NT или N-концевым фрагментом GS, а другой с mutGS-CT или C-концевым фрагментом GS. Был сконструирован один вектор экспрессии с промотором/энхансером, приводящим к экспрессии тяжелой цепи антитела (HC) на одной мРНК с IRES, позволяющим проходить экспрессии mutGS-NT или N-концевого фрагмента GS. Отдельно экспрессия легкой цепи (LC) антитела была связана с mutGS-CT или C-концевым фрагментом GS путем конструирования вектора с экспрессией LC, контролируемой промотором/энхансером, и IRES, который позволяет проходить экспрессии mutGS-CT или C-концевого фрагмента GS. Ни mutGS-NT, ни mutGS-CT, ни N-концевые, ни C-концевые фрагменты GS, сами по себе не позволяют расти клеткам в среде, не содержащей глутамин. Однако, когда GS-мутантные клетки были трансфицированы обеими конструкциями, те клетки, которые были трансфицированы обеими конструкциями на одинаковых уровнях, могли выживать в средах без глутамин. Эти клетки также продуцировали аналогичные количества LC и HC представляющего интерес антитела. Сила отбора может быть дополнительно увеличена за счет снижения эффективности IRES, что приводит к уменьшению трансляции маркера пригодного для селекции mutGS или, потенциально, путем добавления ингибитора GS, L-метионинсульфоксимида (MSX).

Данное изобретение не должно ограничиваться в объеме конкретными вариантами реализации изобретения, описанными в данном документе, которые предназначены лишь для иллюстрации отдельных аспектов изобретения, а функционально эквивалентные способы и компоненты находятся в пределах объема изобретения. Действительно, различные модификации изобретения, в дополнение к показанным и описанным в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопутствующих графических материалов. Такие модификации должны рассматриваться как входящие в объем прилагаемой формулы изобретения.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1

Этот пример описывает отбор и подготовку мутантов глутаминсинтетазы (GS) мыши, которые, по-видимому, могут быть полезны при внутригенной комплементации.

Четыре N-концевых остатка GS мыши (W60, N61, D63 и S66) и 11 C-концевых остатков (E134, E136, E196, E203, N248, N253, N255, R319, R324, E338 и R340) были выбраны для оценки в ходе аланинового сканирования мутаций. Индивидуальные и комбинированные мутантные конструкции были получены в векторах pcDNA3.3 (устойчивость к неомицину, Invitrogen Гранд-Айленд, Нью-Йорк), в результате чего было создано 9 N-концевых мутантных конструкций и 16 C-концевых мутантных конструкций.

Мутантные конструкции оценивали на предмет экспрессии цельного белка GS в клеточных линиях CHO-K1. Клетки культивировали в неселективных химически определенных средах для роста, содержащих глутамин в вентилируемых колбах со встряхиванием при температуре 36 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 70% относительной влажности и скорости встряхивания 150-160 об/мин во влажных камерах. Плотность жизнеспособных клеток (VCD) и жизнеспособность измеряли с помощью автоматизированного счетчика клеток ViCell (Beckman-Coulter, Inc., Брея, Калифорния). Культуры пассировали путем разведения каждые 3-4 дня.

Один миллион клеток для каждой условий трансфицировали с помощью 10 микрограмм линеаризованной ДНК путем электропорации (биологические трипликаты). ДНК линеаризовали с помощью рестрикционного фермента PvuI-HF (New England Biolabs, Ипсуич, Массачусетс) в течение ночи при температуре 37°C в соответствии с рекомендациями производителя. Агарозный гель-электрофорез использовали для подтверждения полной линеаризации каждой плазмиды. После рестрикционного расщепления ДНК осаждали в течение ночи при температуре -70 °C путем добавления 3 М ацетата натрия в количестве 10% от реакционного объема и 100% этанола в количестве 200% от реакционного объема к каждому продукту расщепления. После осаждения этанолом, ДНК осаждали, осадок промывали один раз 70% этанолом, сушили на воздухе и повторно суспендировали в солевом растворе, забуференном с помощью HEPES. Концентрации ДНК измеряли с помощью NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, Делавэр) и доводили до 1 микрограмма/микролитр с помощью солевого раствора, забуференного с помощью HEPES.

Для тестирования на предмет внутригенной комплементации использовали 5 микрограмм каждой из двух плазмид, а также 10 микрограмм ДНК из молок лососевых, фрагментированной в результате гидродинамического сдвига (Invitrogen). Трансфекции были проведены путем осаждения для каждого из условий 1 миллиона клеток из культуры, выращиваемой в течение 3 дней, ресуспендирования клеток в 150 мкл забуференном с помощью HEPES солевом растворе, добавления в общей сложности 10 мкг плазмидной ДНК (5 мкг каждой плазмиды и 10 микрограмм и переноса смесь в лунки 96-луночного планшета для электропорации (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния).

Электропорацию проводили с использованием 96-луночных планшетов Gene Pulser MXcell™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния) со следующими настройками: экспоненциальная волна, напряжение=290 В, емкость=950 мкФ, сопротивление=950 Ом. После электропорации клетки переносили в предварительно нагретую неселективную

среду для выращивания в вентилируемые 24-луночные планшеты (24DWP) объемом 2 мл/лунку и встряхивании при 220 об/мин во влажных камерах Kühner (Kühner AG, Базель, Швейцария).

Через три дня после трансфекции клетки подсчитывали и переносили в селективную среду (химически определенные ростовые среды без глутамин) при плотности  $1 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. Стабильные пулы были получены путем последовательного пассирования клеток в селективной среде каждые 3-4 дня до восстановления жизнеспособности культуры выше 90%. Количество клеток было подсчитано с помощью проточного цитометра Guava EasyCyte™ HT (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс) с использованием модуля анализа ViaCount после 15-минутной инкубации клеток в реагенте (разведение культуры 1:10 в реагенте ViaCount FLEX (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс) при рабочей концентрации (разведение 1:50 в PBS)).

Во всех пулах восстанавливалась жизнеспособность до уровня не менее 90% до тестирования в исследованиях функциональности. После образования пула был проведен анализ с помощью вестерн-блоттинга пулов трипликатов, чтобы определить уровень сверхэкспрессии белка GS для каждой конструкции и определить, не повлияла ли какая-либо мутация на продуцирование цельного белка GS.

Для анализа вестерн-блоттинга  $3 \times 10^6$  клеток лизировали в 100 мкл буфера RIPA (Thermo Scientific Pierce, Рокфорд, Иллинойс), дополненного Ингибиторной Смесью для Остановки Протеазы и Фосфатазы без ЭДТА (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс) в течение 30 минут на льду. Лизаты очищали с помощью центрифугирования при 13000 об/мин, добавляли 4-кратный буфер для нанесения (Invitrogen, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) и образцы кипятили при температуре 95°C в течение 5 минут. 15 мкл каждого образца прогоняли на гелях E-Page 48 (Invitrogen, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) и переносили на мембраны PVDF с использованием iBlot (Invitrogen,

Гранд-Айленд, Нью-Йорк). Каждую мембрану исследовали при соотношении 1:500 с антителом против глутаминсинтетазы

(Cat #610518, BD biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) в течение ночи при температуре 4°C с последующей инкубацией при соотношении 1:2000 с антимышиными вторичными антителами Alexa Fluor 680 (Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк). Блоты сканировали с использованием инфракрасной системы визуализации Odyssey (LI-COR, Линкольн, Нью-Йорк) и количественно оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ.

Таблица 1: Исследованные мутанты глутаминсинтетазы мыши

| Отобранные мутанты GS<br>(аланиновое сканирование) | Класс Мутанта | Интактный<br>белок GS | ID<br>последовательности |
|--|---------------|-----------------------|--------------------------|
| W60A   | N-конец       | Да                    | 2                        |
| N61A   | N-конец       | Да                    | 3                        |
| D63A   | N-конец       | Да                    | 4                        |



|                              |         |    |    |
|------------------------------|---------|----|----|
| S66A                         | N-конец | Да | 5  |
| W60A N61A D63A (NT1)         | N-конец | Да | 6  |
| W60A N61A S66A               | N-конец | Да | 7  |
| W60A D63A S66A               | N-конец | Да | 8  |
| N61A D63A S66A               | N-конец | Да | 9  |
| W60A N61A D63A S66A<br>(NT2) | N-конец | Да | 10 |
| E134A                        | C-конец | Да | 11 |
| E136A                        | C-конец | Да | 12 |
| E196A                        | C-конец | Да | 13 |
| E203A                        | C-конец | Да | 14 |
| N248A                        | C-конец | Да | 15 |
| H253A                        | C-конец | Да | 16 |
| N255A                        | C-конец | Да | 17 |
| R319A                        | C-конец | Да | 18 |
| R324A                        | C-конец | Да | 20 |
| E134A E136A E196A E203A      | C-конец | Да | 21 |
| N248A H253A N255A            | C-конец | Да | 22 |

Хотя в изначальный анализ определил остатки E388 и R340 в качестве остатков-кандидатов для мутации, сверхэкспрессия мутантов GS E388A и R340A (как одиночные мутации или в сочетании с другими мутациями) не приводила к получению интактного белка GS. Поэтому конструкции, содержащие эти мутации, не рассматривались далее.

Поскольку стабильные пулы мутантов GS были получены в линии родительских клеток CHO-K1 дикого типа, которая имеет функциональный фермент GS, оценку активности мутантов проводили с помощью скрининга роста/жизнеспособности в селективной среде без глутамин и дополненной 25 мкМ ингибитора GS, L-метионинсульфоксимином (MSX). Клетки CHO-K1 дикого типа погибали после 4 пассажей в селективной среде. Определенные N-концевые и C-концевые мутации препятствовали росту культуры в селективной среде, но даже пулы с ослабленным ростом сохраняли относительно высокую жизнеспособность.

Клетки, трансфицированные отдельными N-концевыми мутантами GS, росли аналогично конструкции дикого типа, поэтому эти конструкции далее не были протестированы. Однако две N-концевые конструкции с множественными мутациями W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6) и W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) обеспечили высокие уровни сверхэкспрессированного белка GS и вели себя наиболее сходно с пустым вектором отрицательного контроля в функциональном анализе, и были отобраны для дальнейшего анализа. Кроме того, две другие N-концевые мутантные

конструкции, W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3;

SEQ ID NO: 25) и W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19) были получены с целью повышения жесткости эффекта комплементации, и оценены. В последней конструкции аспаратат-63 был мутирован с заменой аланина на аргинин, поскольку аналогичный мутант в *Anabena azollae* полностью исключил биосинтетическую активность и экспрессировался так же, как и дикий тип, тогда как мутация с заменой на аланин обеспечивала сохранение 6,5% биосинтетической активности (Eur. J. Biochem. 266, 1202 (1999) Crespo et al.).

Несмотря на то, что несколько конструкций с одиночными мутациями на С-конце прошли функциональную оценку, две конструкции, которые содержали множественные мутации, E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21) и N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22), были отобраны для дальнейшего анализа.

### Пример 2

Этот пример описывает влияние мутаций в GS на экспрессию рекомбинантного гетеродимерного белка, то есть моноклонального антитела (mAb). Отобранные N-концевые и С-концевые мутанты, описанные в Примере 1, клонировали в векторы экспрессии mAb для построения множества комбинаций двухвекторных систем, где экспрессия легкой цепи (LC) связана с помощью IRES с mutGS-CT, а тяжелая цепь (HC) связана с mutGS-NT. Нокаутная по GS клеточная линия CHO-K1 была получена с использованием CompoZr® Knockout ZFN Kit-CHO GS в соответствии с инструкциями производителя (Sigma-Aldrich Сент-Луис, Миссури). Нокаутные относительно глутаминсинтетазы клеточные линии CHO-K1 (CHO-K1 GS-KO) культивировали, как описано выше.

Трипликатные трансфекции нокаутных CHO-K1 GS выполняли с использованием векторов, содержащих LC или HC mAb, связанные либо с GS дикого типа (положительный контроль), либо с отобранными N- и С-концевыми мутантами и культивировали в среде, не содержащей глутамина. Первоначальный вектор pcDNA3.3, содержащий GS дикого типа, использовали в качестве дополнительного положительного контроля. Как пулы дикого типа GS pcDNA3.3, так и mAb-связанные пулы GS дикого типа обеспечивали восстановление более 90% жизнеспособности на 20-й день пассирования в среде, не содержащей глутамина. Напротив, пулы, трансфицированные в качестве отрицательного контроля без ДНК и все mAb-связанные мутантные пулы GS погибли через 17 дней в среде, не содержащей глутамина, что подтверждает, что отобранные мутанты обеспечивают получение функционального продукта белка GS.

Наконец, отобранные N-концевые и С-концевые мутанты были оценены на предмет внутригенной комплементации GS в двухвекторной системе экспрессии для получения пулов, продуцирующих mAb, в нокаутной клеточной линии CHO-K1 GS. Эти клетки трансфицировали векторами внутригенной комплементации А (LC:mutGS-CT) и В (HC:mutGS-NT) с указанными мутациями в последовательности GS (см. Таблицу 2 ниже). Все оцененные комбинации mutGS-CT/mutGS-NT смогли обеспечить восстановление до около 90% жизнеспособности в течение 25 дней после пассирования в среде, не

содержащей глутамина. Двухвекторные пулы LC:mutGS-CT/HC:mutGS-NT имели большее снижение жизнеспособности и потребовали больше времени для восстановления в селективной среде, чем одновекторные положительные контроли, содержащие GS дикого типа.

Полученные трипликатные стабильные пулы дополнительно оценивали на предмет экспрессии mAb с помощью 10-дневного исследования продуцирования при культивировании с подпиткой. Исследования продуцирования проводили с использованием культур, выращиваемых в течении 4 дней, при разделении 1:5 путем разбавления в химически определенной среде для продуцирования в 24DWP ( $\sim 0,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл). Рост и жизнеспособность культуры отслеживали на 3, 6, 8 и 10 дни с использованием анализа Guava ViaCount (Millipore, Биллерика, Массачусетс). Болюсное введение питательных веществ проводили на 3, 6 и 8 дни с химически определенной питательной средой. Концентрацию глюкозы в среде измеряли в дни добавления питательных веществ с использованием колориметрического реагента PolyChem (Polymedco, Кортленд Манор, Нью-Йорк) и доводили до 12 г/л с помощью 50%-ного стокового раствора глюкозы. Конечный титр продукта определяли с использованием супернатанта культуры 10-го дня с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием колонки POROS A/20 Protein A. Все пулы, полученные с помощью двухвекторной системы внутригенной комплементации GS, содержащей отдельные цепи mAb, связанные через IRES

с отдельными мутантами GS продуцировали детектируемые уровни антител; значения показаны в Таблице 2 (Пример 3) ниже.

### Пример 3

В этом примере описан способ увеличения титра антител в трансфицированных пулах путем увеличения жесткости отбора с помощью снижения эффективности связи GS и IRES. Последовательность в исходных конструкциях представляет собой последовательность EMCV дикого типа до ATG-12, которая была слита с стартовым кодоном GS (Davies and Kaufman, *J Virol* 66, 1924; 1992). Эффективность IRES была снижена путем использованием ранее показанной последовательности для обеспечения эффективного отбора и амплификации (Aldrich et al., *Biotechnol Prog* 19, 1433; 2003). Ниже последовательность ДНК соединений в более эффективном (ED3) соединении сравнивается с последовательностью ДНК менее эффективного соединения (317). Числами, указанными ниже последовательности ED3 отмечены ATG, найденные в EMCV WT. Последний ATG определяет стартовый кодон GS.

317 GATGATAATACCCTCGAGATCCGTGCCATCATG (SEQ ID NO:23)

ED3 GATGATAATATGGCCACAACCATG (SEQ ID NO:24)

10 11 12

Векторы экспрессии были идентичны векторам, показанным на Фигуре 1, за исключением последовательности соединения IRES и GS. Трансфекция клеток обеими плазмидами с менее эффективным соединением IRES-GS приводила к более низкой

выживаемости после трансфекции и более продолжительному времени восстановления. Только две из трех трансфекций CT1-NT4 восстановились, и ни одна из других комбинаций mutIRES не восстановилась. Однако для тех комбинаций mutIRES, которые действительно восстанавливались, 10-дневное культивирование с подпиткой привело к получению 0,55 грамм/л для одного пула и 0,17 г/л для другого. Удельная продуктивность этих пулов составляла 16 p/c/d и 6,9 p/c/d, соответственно. Титр 0,55 г/л превосходит те, о которых ранее сообщалось и не требует сортировки FACS для достижения их уровня (Ye, J. *et al. Biotechnol Prog* 26, 1431; 2010).

Таблица 2: Экспрессия трансфектантов с внутригенной GS с различными соединениями IRES-GS.

| Конструкция        | Средний титр (n=3) г/л | Средняя qP (n=3) p/c/d |
|--------------------|------------------------|------------------------|
| CT1-NT1            | 0.08                   | 1.17                   |
| CT1-NT2            | 0.05                   | 0.76                   |
| CT1-NT3            | 0.05                   | 0.82                   |
| CT1-NT4            | 0.07                   | 0.82                   |
| CT2-NT1            | 0.04                   | 0.59                   |
| CT2-NT2            | 0.05                   | 0.72                   |
| CT2-NT3            | 0.06                   | 0.87                   |
| CT2-NT4            | 0.04                   | 0.56                   |
| CT2-NT4 MSX 1      | 0.29                   | 9.18                   |
| mut IRES CT1-NT4 1 | 0.55                   | 15.69                  |
| mut IRES CT1-NT4 3 | 0.17                   | 6.86                   |

В образцах, обозначенных как CT1-NT1-4 и CT2-NT1-4, использовалось соединение pED3 (SEQ ID NO:24). Образцы, отмеченные как mutIRES, имеют менее эффективный IRES, представленный в SEQ ID NO:23.

#### Пример 4

В этом примере описывается другая стратегия повышения селективности этих культур. Трансфекции проводили, как описано в Примере 2, но во время отбора к культурам добавляли ингибитор GS, MSX, чтобы провести отбор относительно более высоких уровней экспрессии GS. Одна из трех культур CT2-NT4 с более эффективным (т.е. не мутантным) IRES восстанавливалась, в то время как ни один из CT1-NT4 или любой из трансфектантов с мутантным IRES не восстанавливался. Для единственной культуры, которая восстановилась, 10-дневной культуры, выращиваемой с подпиткой был получен выход 0,29 грамма/л с удельной продуктивностью 9,18 p/c/d (см. Таблицу 2 выше).

#### Пример 5

В этом примере описываются результаты большого количества трансфекций IRES CT1-NT4. Эти конструкции имеют менее эффективные IRES, указанные в SEQ ID NO:23. В общей сложности было проведено 88 трансфекций CHO-K1, нокаутных относительно GS,

с использованием векторов, содержащих mut IRES CT1-NT4. В общей сложности 10 из 88 трансфекций выжили в результате отбора и привели к получению устойчивых растущих пулов трансфекций после приблизительно 25 дней культивирования и вели себя аналогично меньшему количеству трансфекций в Примере 2. Пулы GS, трансфицированные в качестве отрицательного контроля без ДНК погибли после 17 дней в среде, не содержащей глутамина.

Дубликатные стабильные пулы дополнительно оценивали на предмет экспрессии mAb с помощью 10-дневного исследования продуцирования при культивировании с подпиткой. Исследования продуктивности были проведены с использованием выращиваемой в течении 4 дней культуры в химически определенной среде для продуцирования в 24DWPс при  $0,6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. Рост и жизнеспособность культуры отслеживали на 3, 6, 8 и 10 дни с использованием анализа Guava ViaCount (Millipore, Биллерика, Массачусетс). Болюсное введение питательных веществ проводили на 3, 6 и 8 дни с химически определенной питательной средой. Концентрацию глюкозы в среде измеряли в дни добавления питательных веществ с использованием колориметрического реагента PolyChem (Polymedco, Кортленд Манор, Нью-Йорк) и доводили до 12 г/л с помощью 50%-ного стокового раствора глюкозы. Конечный титр продукта определяли с использованием супернатанта культуры 10-го дня с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием колонки POROS A/20 Protein A. Все пулы, полученные с помощью двухвекторной системы внутригенной комплементации GS, содержащей отдельные цепи mAb, связанные с помощью IRES с отдельными мутантами GS, продуцировали относительно высокие уровни антител, причем два пула имели среднее значение выше 1 г/л; значения приведены в Таблице 3 ниже.

Таблица 3: Экспрессия внутригенных трансфектантов CT1-NT4 GS с соединениями mut IRES-GS.

| Конструкция         | Средний титр (n=2) г/л | Средняя qP (n=2) p/c/d |
|---------------------|------------------------|------------------------|
| mut IRES CT1-NT4 4  | 0.425                  | 14.10                  |
| mut IRES CT1-NT4 5  | 0.76                   | 13.02                  |
| mut IRES CT1-NT4 6  | 0.57                   | 11.05                  |
| mut IRES CT1-NT4 7  | 1.025                  | 11.64                  |
| mut IRES CT1-NT4 8  | 0.44                   | 6.73                   |
| mut IRES CT1-NT4 9  | 1.055                  | 11.74                  |
| mut IRES CT1-NT4 10 | 0.6                    | 12.16                  |
| mut IRES CT1-NT4 11 | 0.375                  | 7.61                   |
| mut IRES CT1-NT4 12 | 0.56                   | 7.21                   |
| mut IRES CT1-NT4 13 | 0.81                   | 14.06                  |

Пример 6.

В этом примере описывается подход молекулярной комплементации фермента глутаминсинтетазы. Фермент глутаминсинтетазы экспрессировали в виде двух отдельных фрагментов, и активность ферментов полностью восстанавливалась путем генетической комплементации двух фрагментов. Была создана серия конструкций, в которых фермент глутаминсинтетазы был разделен в различном положении остатков. Выбор этих точек был основан на информации о молекулярной структуре фермента. Эти конструкции были протестированы в клеточном анализе на предмет их способности обеспечивать выживаемость клеточной линии, которая имеет дефект активности глутаминсинтетазы. В результате этого тестирования было идентифицировано несколько фрагментов, которые способны полностью обеспечивать выживаемость клеток, дефективных относительно глутаминсинтетазы, и, следовательно, продемонстрировать, что эти фрагменты могут связываться для создания полностью функционального фермента глутаминсинтетазы.

В большей части предыдущей работы по комплементации фрагментов белка использовались белки, которые существуют в качестве функциональных мономеров и их сборка требует лишь наличие разработанных фрагментов. Эта работа продемонстрировала возможность использовать молекулярную комплементацию для повторения активности как мономера GS, так и последующего образования декамерного функционального ферментного комплекса. Комплементация фрагментов белка была идентифицирована с использованием подхода молекулярного моделирования для поиска областей в мономерах GS, которые позволяли бы разделить белок. К отдельным фрагментам также добавляли лейциновую застежку GCN4 (LZ) и гибкий линкер, чтобы обеспечить сборку. Протестированные фрагменты приведены в Таблице 4, а последовательности белка мышиноного GS, использованного в этих исследованиях приведены в Таблице 5. Фрагменты GS клонировали в вектор экспрессии млекопитающих и трансфицировали в клетки CHO, которые имели недостаток активности GS. Эти клетки обычно могут выживать только в клеточных культурах, дополненных глутамином. Способность этих конструкций обеспечивать выживаемость этих клеток была проверена путем удаления глутамин из среды.

Таблица 4: Конструкция фрагментов молекулярной комплементации GS:

|    | A-цепь 1            | B-цепь 2            |
|----|---------------------|---------------------|
| 1. | N-конец - E110 - LZ | LZ - T111 - C-конец |
| 2. | N-конец - Y104 - LZ | LZ - N105 - C-конец |
| 3. | N-конец - S125 - LZ | LZ - N126 - C-конец |
| 4. | N-конец - N126 - LZ | Q127 - C-конец - LZ |
| 5. | N-конец - E264 - LZ | LZ - N265 - C-конец |

N

конец

LZ=MSDRMKQLEDKVEELLSKVYHLENEVARLKKLVGERGGGGSGGGGS

C

конец

LZ=GGGGSGGGGGSSDRMKQLEDKVEELLSKVYHLENEVARLKKLVGER-STOP

**Таблица 5:** Последовательность фермента GS мышцы, используемая в данных исследованиях, и выделенные точки разделения

1 MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCCE  
 51 PKCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCE  
 101 VFKYNNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHWPFGMEQEYTLMGTDGHPFGWP  
 151 SNGFPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMFA  
 201 QWEFQIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGA  
 251 GCHTNFSTKAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRL  
 301 TGFHETSININDFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYA  
 351 VTEAIVRTCLLNETGDEPFQYKN\*  
 Y 104 E 110 S 125 N 126 E 264

Как изображено на Фигуре 2, конструкции 1, 2, 3 и 5 смогли успешно обеспечить выживаемость клеток, дефицитных относительно глутаминсинтетазы. Это демонстрирует, что эти фрагменты способны образовывать полнофункциональный фермент глутаминсинтетазы *in vivo*. Краткое описание результатов обеспечения выживаемости изображено на Фигуре 6. В качестве контроля было оценено, удалось ли какому-либо из фрагментов А или В обеспечить выживаемость клеточной линии, дефицитной относительно глутаминсинтетазы. Как изображено на Фигуре 4, ни один из фрагментов А или В не смог обеспечить выживаемость клеточной линии, дефицитной относительно глутаминсинтетазы, подтвердив, что оба фрагмента необходимы для восстановления активности фермента глутаминсинтетазы.

**Таблица 6:** Динамика обеспечения выживаемости фрагментами GS, описанными в Таблице 4.

| Конструкция | Обеспечение выживаемости<br>СНО-К1 GS КО | Дней до >90%<br>жизнеспособности |
|-------------|--|----------------------------------|
| WT          | 4/4                                      | 14                               |
| 1.          | 2/4                                      | ~30                              |
| 2.          | 4/4                                      | 18                               |
| 3.          | 4/4                                      | ~24                              |
| 4.          | 0/4                                      | Нет восстановления               |
| 5.          | 4/4                                      | ~24                              |

Эти конструкции с молекулярной комплементацией были затем протестированы в контексте векторов экспрессии, содержащих гены легкой цепи и тяжелой цепи антитела, для оценки их полезности в системе отбора развития клеточной линии. Два вектора экспрессии были адаптированы для содержания комплементарных фрагментов глутаминсинтетазы, как показано в Таблице 4, один из которых содержит гены легкой цепи антитела, а второй содержит гены тяжелой цепи антитела (Фигура 4). Последовательности IRES также были заменены версией, которая ослаблена с помощью мутации в рамке ATG

(BioTechniques 20:102-110 January 1996). Это привело в дальнейшем уменьшению уровней экспрессии фрагментов глутаминсинтетазы, по сравнению с генами антител, и повышению жесткости отбора системы для достижения уровня давления отбора, который бы был склонен к интеграции в геном в сайты с высокой транскрипционной активностью. Результаты этого исследования изображены на Фигуре 6. Конструкции 1, 2, 3 и 5 тестировались в этом исследовании, а также связывали гены тяжелой цепи и легкой цепи в обеих ориентациях с каждым из фрагментов глутаминсинтетазы А и В. Векторы, содержащие фрагменты глутаминсинтетазы из конструкции 2, смогли обеспечить выживаемость при отборе в среде, не содержащей глутамин.

Продуктивность клеток двух отобранных пулов конструкции 2 была оценена в анализе продуктивности при культивировании с подпиткой в течение 10 дней и сравнена с контрольным пулом, который был отобран с использованием вектора, экспрессирующего полноразмерный фермент GS. Как изображено на Фигуре 6, клетки конструкции 2 продемонстрировали высокую продуктивность.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор, содержащий:
  - первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, и
  - вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, причем второй полипептид представляет собой исходный фрагмент маркера пригодного для селекции,
  - причем транскрипция первой нуклеиновой кислоты функционально связана с транскрипцией второй нуклеиновой кислоты,
  - дополнительно содержащий:
    - третью нуклеиновую кислоту, кодирующую третий полипептид, причем третий полипептид способен связываться с первым полипептидом с образованием гетеромерного комплекса и
    - четвертую нуклеиновую кислоту, которая кодирует четвертый полипептид, причем четвертый полипептид представляет собой комплементарный фрагмент маркера пригодного для селекции,
    - причем транскрипция третьей нуклеиновой кислоты функционально связана с транскрипцией четвертой нуклеиновой кислоты,
    - причем исходный фрагмент и комплементарный фрагмент маркера пригодного для селекции взаимодействуют, чтобы обеспечить пригодную для селекции активность, и, кроме того, вектор способен трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток.
2. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что гетеромерный комплекс представляет собой иммуноглобулин, необязательно при этом первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина.
3. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что пригодный для селекции маркер представляет собой метаболический фермент, выбранный из группы, состоящей из глутаминсинтетазы, аргиносукцинатлиазы, аденилосукцинатсинтетазы и глутаматдегидрогеназы.
4. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) находится на участке, выбранном из группы, состоящей из:
  - участка между первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой;
  - участка между третьей нуклеиновой кислотой и четвертой нуклеиновой кислотой, и
  - участков между первой и второй, и третьей и четвертой нуклеиновыми кислотами,
  - необязательно при этом внутренний сайт связывания рибосомы содержит SEQ ID NO: 23.
5. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что исходная мутантная субъединица маркера пригодного для селекции представляет собой N-концевой фрагмент глутаминсинтетазы, а комплементарная мутантная субъединица маркера пригодного для селекции представляет собой C-концевой фрагмент глутаминсинтетазы.
6. Вектор по п. 5, отличающийся тем, что N-концевой фрагмент и/или C-концевой

фрагмент глутаминсинтетазы разделены в аминокислотной позиции глутаминсинтетазы, выбранной из группы, состоящей из: E110, Y104, S125, N126, E264, T111, N105, N126, Q127 и N265

7. Вектор по п. 6, дополнительно содержащий N-концевую лейциновую застежку или C-концевую лейциновую застежку.

8. Выделенная клетка-хозяин, которая была трансфицирована, трансформирована или транслирована вектором по любому из пп. 1-7, необязательно при этом клетка выбрана из группы, состоящей из CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, клеточной линии миеломы и клеток WI38.

9. Способ получения гетеромерного комплекса, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по п. 8, в условиях, при которых гетеромерный комплекс экспрессируется клеткой-хозяином, необязательно при этом гетеромерный комплекс представляет собой антитело.

10. Способ по п. 9, дополнительно включающий выделение гетеромерного комплекса.

11. Система экспрессии, содержащая:

а) первый вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, которая функционально связана со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, причем второй полипептид представляет собой исходный фрагмент маркера пригодного для селекции, и

б) второй вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую третий полипептид, которая функционально связана с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей четвертый полипептид, причем четвертый полипептид является комплементарным фрагментом маркера пригодного для селекции, который способен связываться с исходным мутантным фрагментом маркера пригодного для селекции для обеспечения пригодной для селекции активности,

причем третий полипептид способен связываться с первым полипептидом с образованием гетеромерного комплекса;

и кроме того система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор указанных клеток.

12. Система экспрессии по п. 11, отличающаяся тем, что гетеромерный комплекс представляет собой иммуноглобулин, необязательно при этом первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина, а третья нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь иммуноглобулина.

13. Система экспрессии по п. 11, отличающаяся тем, что пригодный для селекции маркер выбран из группы, состоящей из глутаминсинтетазы, аргиносуццинатлиазы, аденилосуццинатсинтетазы и глутаматдегидрогеназы.

14. Система экспрессии по п. 11, отличающаяся тем, что внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) находится на участке, выбранном из группы, состоящей из: участка между первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой;

участка между третьей нуклеиновой кислотой и четвертой нуклеиновой кислотой, и участков между первой и второй, и третьей и четвертой нуклеиновыми кислотами, необязательно при этом внутренний сайт связывания рибосомы содержит SEQ ID NO: 23.

15. Система экспрессии по п. 11, отличающаяся тем, что исходный фрагмент маркера пригодного для селекции представляет собой N-концевой фрагмент глутаминсинтетазы, а комплементарный фрагмент маркера пригодного для селекции представляет собой C-концевой фрагмент глутаминсинтетазы.

16. Система экспрессии по п. 15, отличающаяся тем, что N-концевой фрагмент и/или C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы разделены в аминокислотной позиции глутаминсинтетазы, выбранной из группы, состоящей из: E110, Y104, S125, N126, E264, T111, N105, N126, Q127 и N265

17. Выделенная клетка-хозяин, трансфицированная, трансформированная или трансдуцированная системой экспрессии по любому из пп. 11-16, необязательно при этом клетка выбрана из группы, состоящей из CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, клеточной линии миеломы и клеток WI38.

18. Способ получения гетеромерного комплекса, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по п. 17, в условиях, при которых гетеромерный комплекс экспрессируется клеткой-хозяином.

19. Способ по п. 18, дополнительно включающий выделение гетеромерного комплекса.

20. Система экспрессии, содержащая первый вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела, функционально связанную со второй нуклеиновой кислотой, которая кодирует N-концевой фрагмент глутаминсинтетазы, и второй вектор, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, функционально связанную с четвертой нуклеиновой кислотой, которая кодирует C-концевой фрагмент глутаминсинтетазы, причем каждый фрагмент глутаминсинтетазы не имеет пригодной для селекции активности, если он экспрессируется отдельно, а совместная экспрессия N-концевого фрагмента и C-концевого фрагмента глутаминсинтетазы обеспечивает активность глутаминсинтетазы, при этом система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток, необязательно при этом N-концевой фрагмент и/или C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы разделены в аминокислотной позиции глутаминсинтетазы, выбранной из группы, состоящей из: E110, Y104, S125, N126, E264, T111, N105, N126, Q127 и N265

21. Выделенная клетка-хозяин, трансфицированная, трансформированная или трансдуцированная системой экспрессии по п. 20.

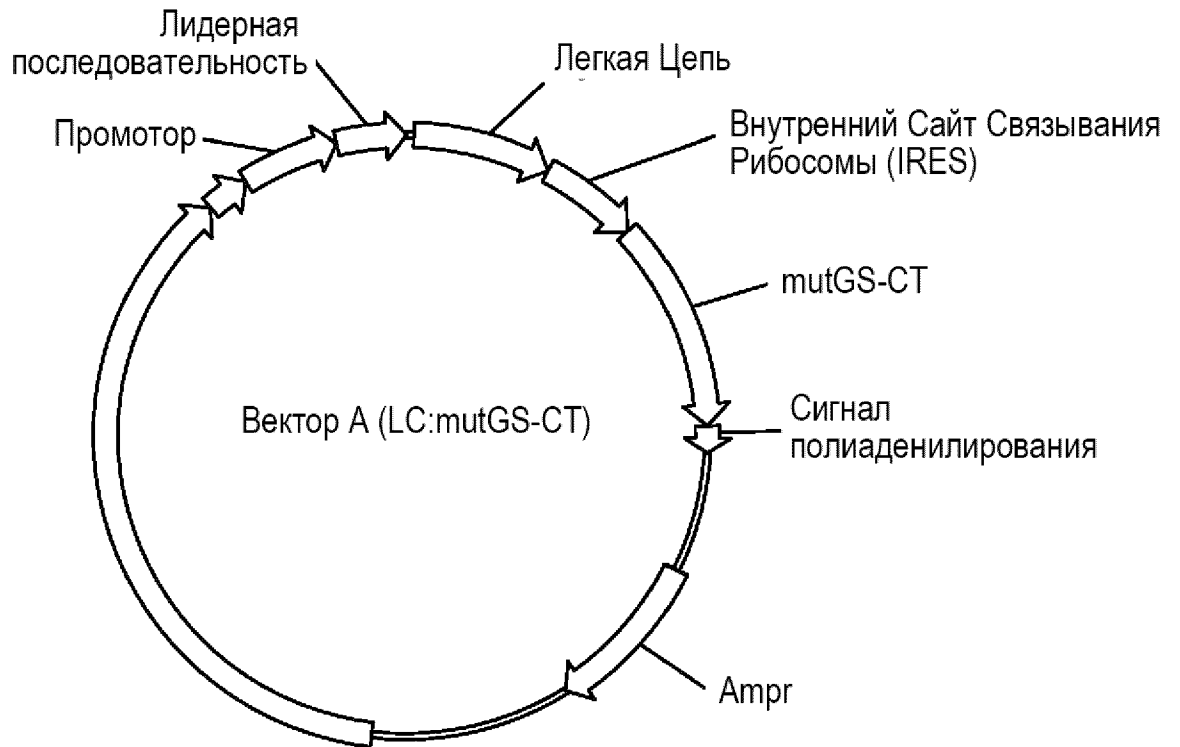
22. Система экспрессии, содержащая первый вектор, кодирующий бицистронный транскрипт, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый полипептид, функционально связанную со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей исходный фрагмент маркера пригодного для селекции, и второй вектор, кодирующий

бицистронный транскрипт, содержащий третью нуклеиновую кислоту, функционально связанную с четвертой нуклеиновой кислотой, кодирующей комплементарный фрагмент маркера пригодного для селекции, причем первая и комплементарная мутантные субъединицы маркера пригодного для селекции ассоциируются с получением пригодной для селекции активности и при этом система экспрессии способна трансфицироваться в клетки млекопитающих и улучшать отбор трансфицированных клеток, и кроме того первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь антитела, а третья нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь антитела, необязательно при этом пригодный для селекции маркер представляет собой глутаминсинтетазу, и N-концевой фрагмент и/или C-концевые фрагменты глутаминсинтетазы разделены в аминокислотной позиции глутаминсинтетазы, выбранной из группы, состоящей из: E110, Y104, S125, N126, E264, T111, N105, N126, Q127 и N265.

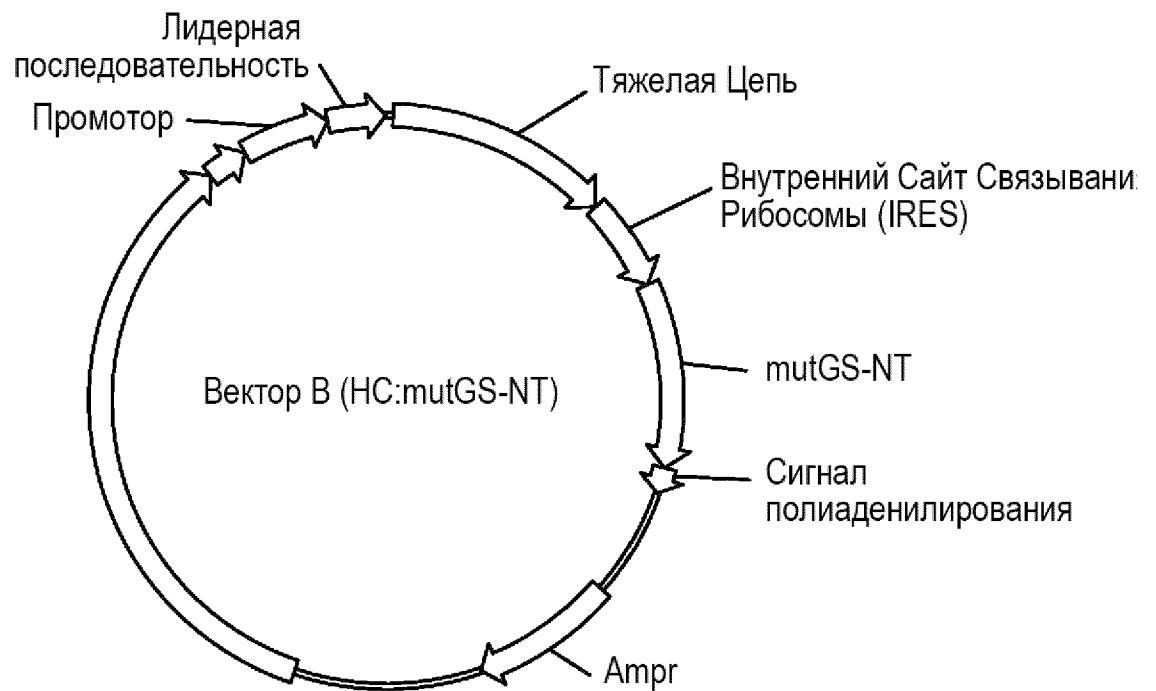
23. Выделенный хозяин, трансфицированный, трансформированный или трансдуцированный системой экспрессии по п. 22.

По доверенности

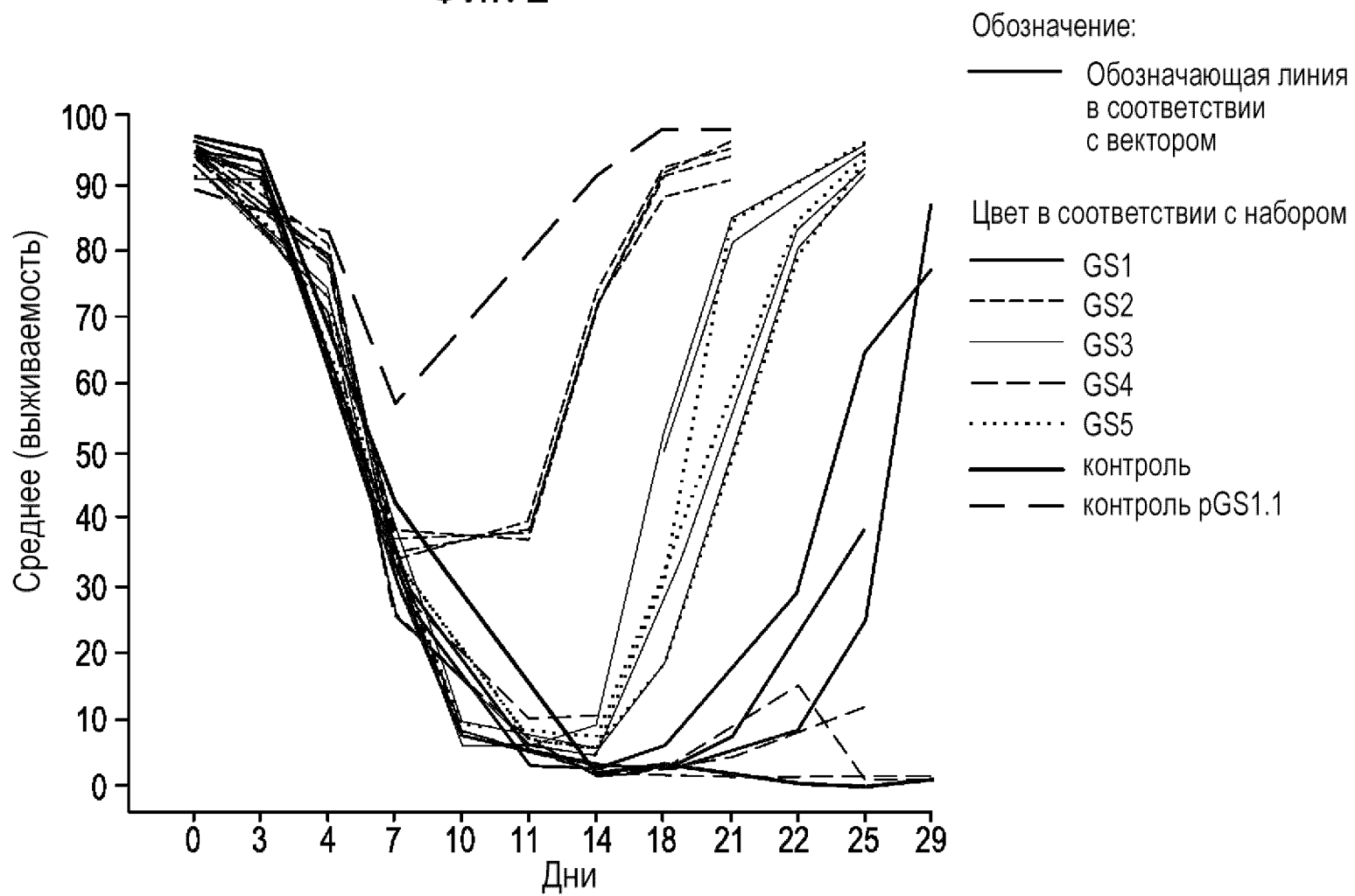
Фиг. 1А



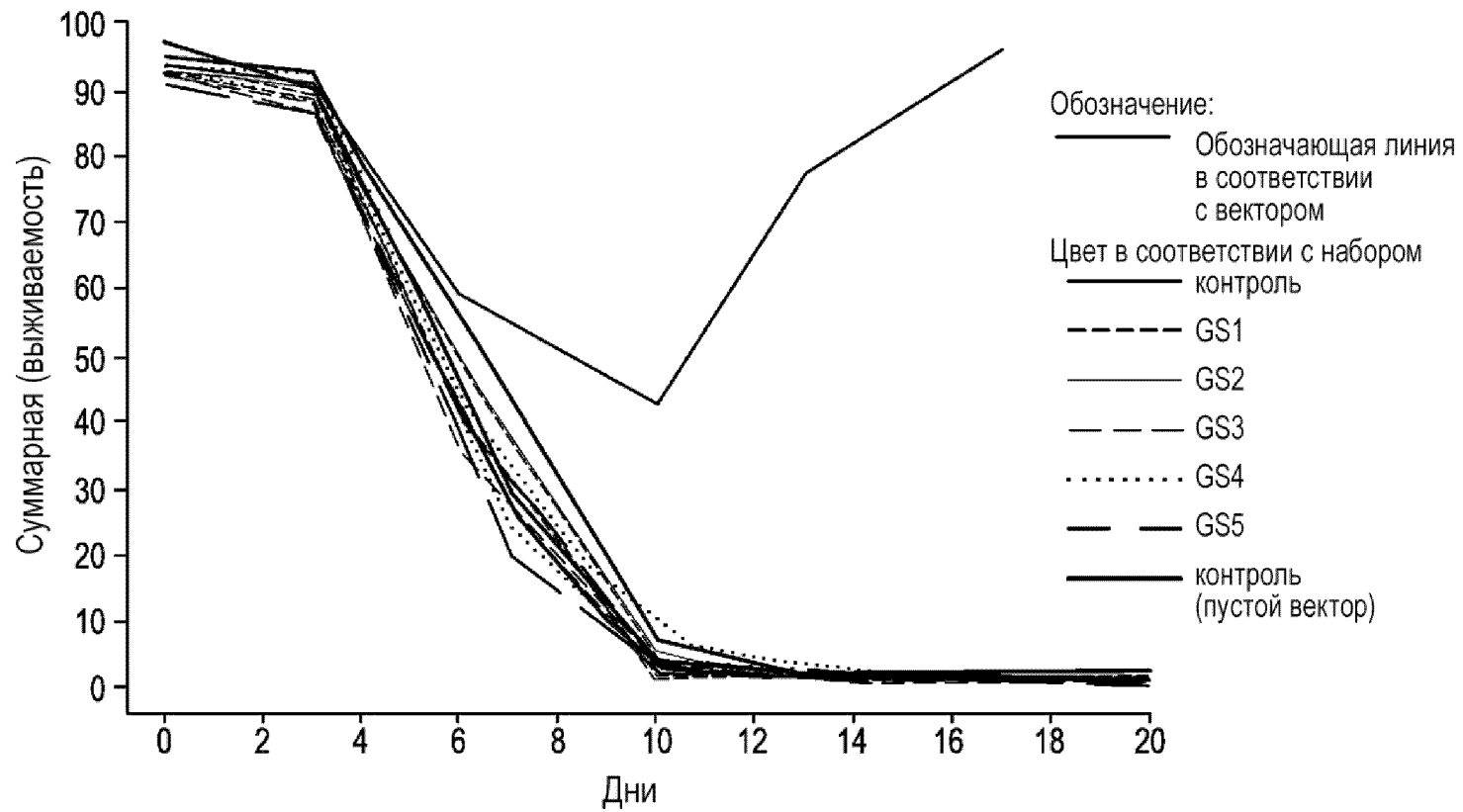
Фиг. 1В



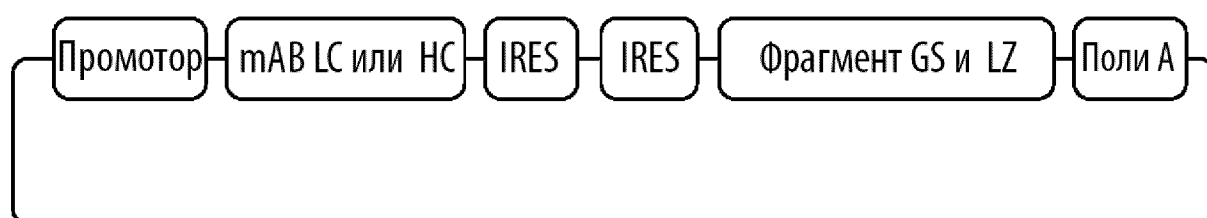
Фиг. 2



Фиг. 3

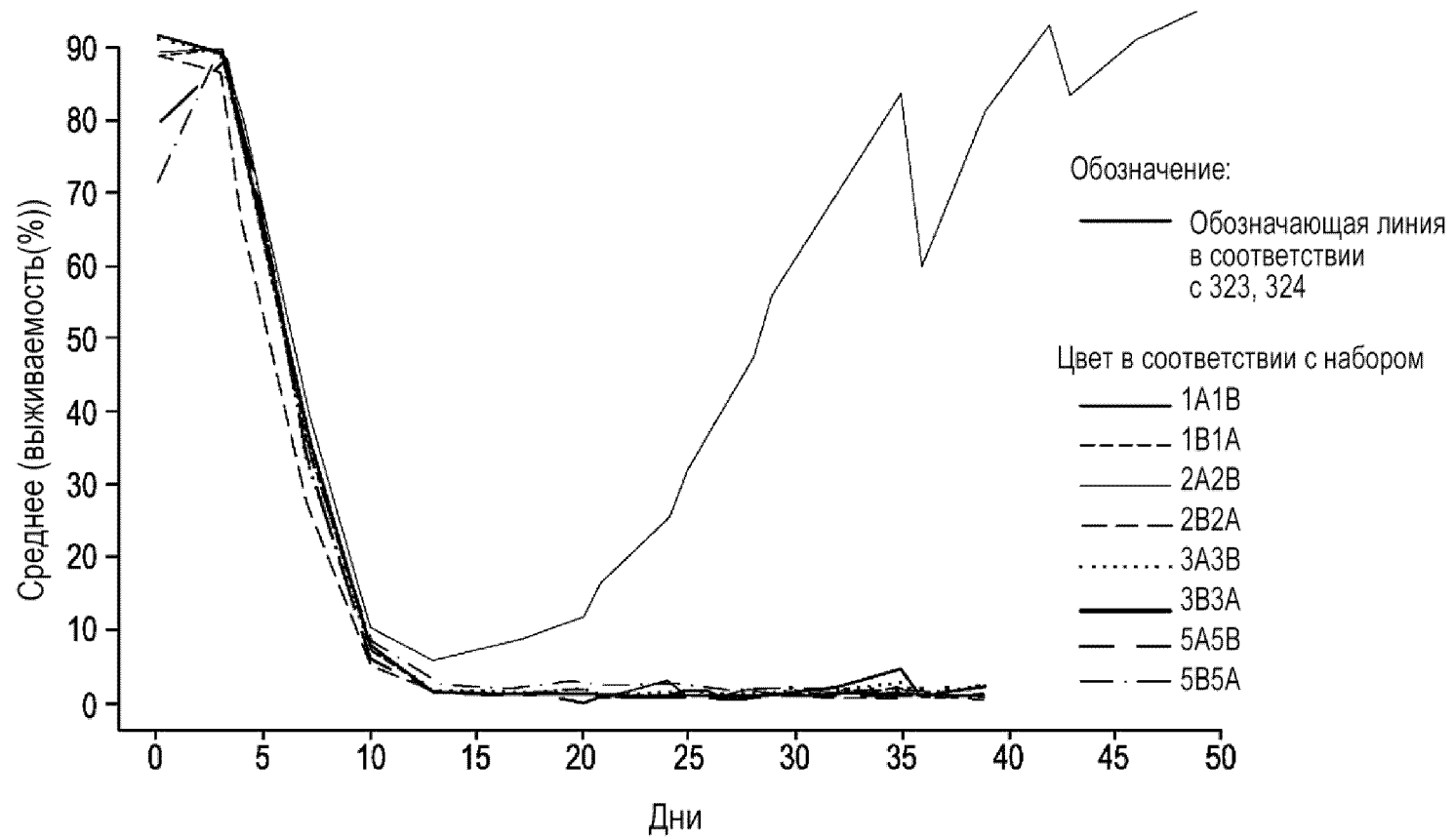


Фиг. 4

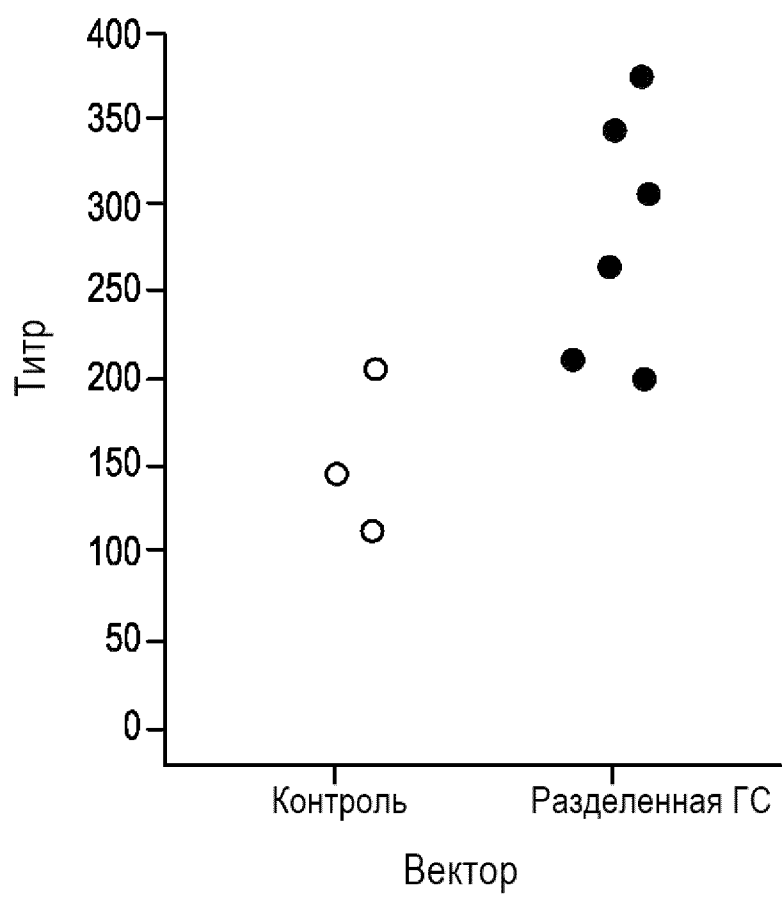




Фиг. 5



Фиг. 6



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|   |   |  |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference<br>A-2011-WOPCT | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below. |  |
| International application No.<br>PCT/US2017/032139    | International filing date ( <i>day/month/year</i> )<br>11 May 2017 (11-05-2017)               | (Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> )<br>11 May 2016 (11-05-2016) |
| Applicant<br><br>AMGEN INC                            |   |  |

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

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

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

1. **Basis of the report**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/032139

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2017/032139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12N15/65 C12N15/67  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | WO 2012/095514 A1 (VIVALIS [FR]; COURTEJE JEROME [FR]; GUEHENNEUX FABIENNE [FR]; ROPART A) 19 July 2012 (2012-07-19) figure 7 | 1-68                  |
| A         | -----<br>CN 1 966 682 A (LONZA BIOLOGICS PLC [GB]) 23 May 2007 (2007-05-23) the whole document                                | 1-68                  |
| A         | -----<br>US 2013/244231 A1 (TAKAHASHI KENICHI [JP]) 19 September 2013 (2013-09-19) the whole document                         | 1-68                  |
|           | -----<br>-/--   |                       |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

|   |  |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search<br>13 July 2017 | Date of mailing of the international search report<br>26/07/2017 |
|---|--|

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/032139

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| A  | <p>RODRIGUEZ-POMBO P ET AL: "Towards a model to explain the intragenic complementation in the heteromultimeric protein propionyl-CoA carboxylase",<br/>           BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, AMSTERDAM, NL, vol. 1740, no. 3, 10 June 2005 (2005-06-10), pages 489-498, XP027810999, ISSN: 0925-4439<br/>           [retrieved on 2005-06-10]<br/>           page 491, column 1, last paragraph - page 491, column 2, paragraph 1</p> | 1-68                  |
| A  | <p>MACNEIL T ET AL: "FINE STRUCTURE DELETION MAP AND COMPLEMENTATION ANALYSIS OF THE GLN-A-GLN-L-GLN-G REGION IN ESCHERICHIA-COLI",<br/>           1982, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, VOL. 150, NR. 3, PAGE(S) 1302-1313, XP002772014, ISSN: 0021-9193<br/>           the whole document</p>  | 1-68                  |
| A  | <p>WALKER DAVID C ET AL: "Intragenic complementation at the human argininosuccinate lyase locus. Identification of the major complementing alleles",<br/>           1997, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 272, NR. 10, PAGE(S) 6777-6783, XP002772015, ISSN: 0021-9258<br/>           the whole document</p>  | 1-68                  |
| A  | <p>MITCHELL A P: "THE GLN-1 LOCUS OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE ENCODES GLUTAMINE SYNTHETASE",<br/>           1985, GENETICS, VOL. 111, NR. 2, PAGE(S) 243-258, XP002772016, ISSN: 0016-6731<br/>           the whole document</p>  | 1-68                  |
| A  | <p>TREVISSON EVA ET AL: "Functional Complementation in Yeast Allows Molecular Characterization of Missense Argininosuccinate Lyase Mutations",<br/>           October 2009 (2009-10), JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 284, NR. 42, PAGE(S) 28926-28934, XP002772017, ISSN: 0021-9258(print)<br/>           the whole document</p>   | 1-68                  |
|  | -/--  |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2017/032139

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| A  | <p>YU BOMINA ET AL: "Mechanisms for intragenic complementation at the human argininosuccinate lyase locus",<br/>BIOCHEMISTRY,<br/>vol. 40, no. 51,<br/>25 December 2001 (2001-12-25), pages<br/>15581-15590, XP002772018,<br/>ISSN: 0006-2960<br/>the whole document</p> <p>-----</p> | 1-68                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/US2017/032139 |
|---|

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date              |
|--|------------------|-------------------------|-------------------------------|
| WO 2012095514                          | A1               | 19-07-2012              | NONE                          |
|  |                  |                         |                               |
| CN 1966682                             | A                | 23-05-2007              | CN 1966682 A 23-05-2007       |
|  |                  |                         | CN 101492656 A 29-07-2009     |
|  |                  |                         | MY 136860 A 28-11-2008        |
|  |                  |                         | MY 137536 A 27-02-2009        |
|  |                  |                         | TW I352120 B 11-11-2011       |
|  |                  |                         | TW 200307047 A 01-12-2003     |
|  |                  |                         |                               |
| US 2013244231                          | A1               | 19-09-2013              | CN 103201382 A 10-07-2013     |
|  |                  |                         | EP 2639303 A1 18-09-2013      |
|  |                  |                         | JP 5913122 B2 27-04-2016      |
|  |                  |                         | JP W02012063799 A1 12-05-2014 |
|  |                  |                         | KR 20130100182 A 09-09-2013   |
|  |                  |                         | US 2013244231 A1 19-09-2013   |
|  |                  |                         | WO 2012063799 A1 18-05-2012   |
|  |                  |                         |                               |