

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047842**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.18

(51) Int. Cl. **C12P 21/02 (2006.01)**
C07K 16/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202390730

(22) Дата подачи заявки
2021.08.27

(54) **СТРАТЕГИИ ПОДПИТКИ АСПАРАГИНОМ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ
ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И УМЕНЬШЕНИЯ
КОЛИЧЕСТВА ВАРИАНТОВ ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АСПАРАГИНА**

(31) **63/072,740; 63/072,745**

(32) **2020.08.31**

(33) **US**

(43) **2023.04.25**

(86) **PCT/US2021/047870**

(87) **WO 2022/047108 2022.03.03**

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

(56) **LI-XIANG ZHANG ET AL.: "Responses of
CHO-DHFR cells to ratio of asparagine to glutamine
in feed media: cell growth, antibody production,
metabolic waste, glutamate, and energy metabolism",
BIORESOURCES AND BIOPROCESSING, vol.
3, no. 1, 8 February 2016 (2016-02-08),
XP055715739, DOI: 10.1186/s40643-015-0072-6, the
whole document**

WO-A2-2013006479

US-B1-10526631

US-A1-2013096283

(72) Изобретатель:
**Беннун-Серрано Сандра, Лоуренс
Шон М., Джонсон Эми С. (US)**

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

(57) Предложен способ культивирования эукариотических клеток для улучшения производительности клеточного культивирования. В общем случае способ включает размножение или поддержание эукариотических клеток в определенной клеточной культуральной среде; при этом в определенную клеточную культуральную среду добавляют аспарагин в количестве от около 2,6 до около 43,2 мМ во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и от около 2,6 до около 21,6 мМ во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой; и поддержание указанных клеток в указанной дополненной аспарагином клеточной культуральной среде в течение по меньшей мере части ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и по меньшей мере части поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой; при этом производительность клеточного культивирования улучшается за счет добавления аспарагина по сравнению с аналогичным способом с добавлением меньшего количества аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

B1

047842

047842

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение заявляет приоритет по дате подачи предварительной заявки США № 63/072740, поданной 31 августа 2020 г., и предварительной заявки США № 63/072745, поданной 31 августа 2020 г., содержание которых в полном объеме и во всех целях включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники изобретения

Данное изобретение относится к способам культивирования клеток для улучшения производительности клеточного культивирования. В частности, данное изобретение относится к способам культивирования клеток для улучшения производительности клеточного культивирования и уменьшения количества вариантов по последовательности аспарагина с применением добавления аспарагина и для производства белковых биофармацевтических препаратов.

Уровень техники изобретения

Биологические агенты, в частности белки и полипептиды, часто разрабатывают как новые биофармацевтические продукты. Сконструированные клетки, которые вырабатывают высокие уровни конкретного представляющего интерес белка, становятся критически важными для успешного коммерческого производства этих биофармацевтических продуктов. Контроль и оптимизация условий клеточного культивирования имеют большое влияние на уровень и качество терапевтического белка, получаемого в клеточной культуре.

Общепринято получать белки посредством клеточного культивирования с помощью периодического процесса или периодического процесса с подпиткой. Ранние стадии роста инокулята после оттаивания флакона включают культивирование клеток в посевной культуре. Как правило, клетки выращивают при скорости экспоненциального роста, например, в системе посевных биореакторов с целью постепенного увеличения размера и/или объема клеточной популяции. После масштабирования массы клеток посредством проведения нескольких стадий в биореакторах клетки переносят в производственный периодический биореактор с подпиткой, когда клетки все еще находятся на стадии экспоненциального роста (в логарифмической фазе) (Gambhir, A. et al., 2003, J. Bioscience Bioeng, 95(4):317-327).

После переноса в периодическую культуру с подпиткой клетки культивируют в течение некоторого периода времени, при этом композицию среды мониторят и контролируют, чтобы обеспечить получение представляющего интерес белка или полипептида. После достижения конкретного выхода или жизнеспособности клеток накопление отходов или истощение питательных веществ определяют, что культивирование следует прекратить, а полученный белок или полипептид выделяют. В течение последнего десятилетия было много значительных достижений, целью которых было улучшение выхода рекомбинантного белка, который на сегодняшний день достигает титров нескольких граммов на литр. Усовершенствования процессов производства белка, а также конструирования клеточных линий и разработка клеточной культуральной среды и подпитки внесли свой вклад в увеличение выхода белка. Например, схемы оптимизации клеточной культуральной среды и подпитки включают добавление питательных веществ и разработку химически определенной бессывороточной среды для поддержания условий клеточного роста и оптимальной секреции продукта.

Однако в данной области техники все еще остается потребность в средах и способах культивирования клеток, в которых среда обеспечивает здоровый и полноценный рост клеток и их поддержание, а также получение высоких титров рекомбинантных белков.

Краткое описание сущности изобретения

В одном аспекте предложен способ культивирования эукариотических клеток для улучшения производительности клеточного культивирования. В общем случае способ включает размножение или поддержание эукариотических клеток в определенной клеточной культуральной среде; при этом в определенную клеточную культуральную среду добавляют аспарагин в количестве от около 3,6 до около 43,2 мМ во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и от около 3,6 до около 21,6 мМ во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой; и поддержание указанных клеток в указанной дополненной аспарагином клеточной культуральной среде в течение по меньшей мере части ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и по меньшей мере части поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой; при этом по меньшей мере один параметр производительности клеточного культивирования улучшается за счет добавления аспарагина по сравнению с аналогичным способом с добавлением меньшего количества аспарагина или без добавления аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В определенных вариантах осуществления добавление аспарагина в клеточную культуру (как в ранней фазе, так и в поздней фазе) можно проводить в виде болюсной подпитки (например, одной болюсной подпитки во время ранней фазы и одной болюсной подпитки во время поздней фазы), нескольких болюсных подпиток в течение курса по меньшей мере части клеточного культивирования (например, 2, 3, 4 или 5 болюсных подпиток во время ранней фазы и 2, 3, 4 или 5 болюсных подпиток во время поздней фазы) или непрерывно в течение курса по меньшей мере части клеточного культивирования.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один параметр производительности

клеточного культивирования выбран из группы, состоящей из повышенной жизнеспособности клеток, повышенной скорости роста клеток, повышенной плотности клеток, повышенного титра представляющего интерес рекомбинантного белка, повышенного выхода представляющего интерес рекомбинантного белка, уменьшения истощения незаменимых аминокислот по меньшей мере в части клеточной культуры, уменьшения образования по меньшей мере одного побочного продукта клеточного культивирования по меньшей мере части в клеточной культуре и улучшения по меньшей мере показателя качества белка. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один побочный продукт клеточного культивирования выбран из группы, состоящей из ионов аммония и аланина. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один показатель качества белка представляет собой уменьшение количества вариантов по последовательности белка.

В определенных вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку млекопитающего, клетку птицы, клетку насекомого или дрожжевую клетку. В конкретных вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку СНО. В других вариантах осуществления рекомбинантный белок может быть выбран из Fc-слитого белка, рецепторного Fc-слитого белка (TRAP), антитела, фрагмента антитела или слитого белка ScFv-Fc.

В других аспектах предложен способ предотвращения появления вариантов по последовательности аспарагина в представляющем интерес полипептиде, экспрессируемом из клеток млекопитающего в клеточной культуре. В определенных вариантах осуществления способ может включать размножение или поддержание клеток млекопитающего в определенной клеточной культуральной среде; при этом в определенную клеточную культуральную среду добавляют аспарагин в количестве от около 3,6 до около 43,2 мМ во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и от около 3,6 до около 21,6 мМ во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой; и поддержание указанных клеток в указанной дополненной аспарагином клеточной культуральной среде в течение по меньшей мере части ранней и поздней стадий клеточного культивирования с периодической подпиткой в условиях, достаточных для экспрессии представляющего интерес полипептида. В определенных вариантах осуществления внутриклеточные уровни аспарагина в клеточной культуральной среде во время по меньшей мере ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой поддерживаются выше границы истощения около 0,1 мМ так, что представляющий интерес полипептид, экспрессируемый клетками млекопитающего, содержит менее 0,30% вариантов по последовательности аспарагина во всех локусах индивидуальных вариантов по последовательности.

В других аспектах предложен способ выявления вариантов по последовательности аспарагина в представляющем интерес полипептиде, экспрессируемом из эукариотической клетки в клеточной культуре. В определенных вариантах осуществления способ может включать размножение или поддержание эукариотических клеток в определенной клеточной культуральной среде; экспрессию представляющего интерес рекомбинантного белка из эукариотических клеток; измерение внутриклеточных и/или внеклеточных концентраций одной или более связанных с аспарагином аминокислот в определенной клеточной культуральной среде и корреляцию измеренных концентраций одной или более связанных с аспарагином аминокислот с количеством вариантов по последовательности аспарагина, присутствующих в экспрессируемом представляющем интерес рекомбинантном белке. Измеренные концентрации одной или более связанных с аспарагином аминокислот обратно коррелируют с количеством вариантов по последовательности аспарагина.

В других аспектах предложен способ мониторинга и контроля условий клеточной культуральной среды. В общем случае способ включает измерение одного или более параметров клеточного культивирования в клеточной культуре с использованием измерения одного или более параметров клеточного культивирования в клеточной культуре *in situ* с использованием одного или более из понижения точки замерзания, электрохимии, цифровой визуализации, фотометрии, анализатора биопроцессов или рамановской спектроскопии; сравнение измеренных одного или более параметров клеточного культивирования с предопределенным установленным значением для параметра клеточного культивирования для определения того, находятся ли один или более параметров клеточного культивирования в рамках предопределенного порогового диапазона; и корректировку одного или более параметров клеточного культивирования в случае определения, что параметр клеточного культивирования находится за пределами предопределенного порогового диапазона. В определенных вариантах осуществления можно мониторить концентрации ионов аммония и в случае определения, что концентрации ионов аммония находятся за пределами предопределенного порогового диапазона для конкретной клеточной культуры, можно корректировать подпитку аспарагином так, чтобы клеточная культура вырабатывала меньше аммония, получая при этом адекватное количество аспарагина.

Хотя описаны многие варианты осуществления, существуют также другие варианты осуществления настоящего изобретения, которые станут очевидными для специалистов в данной области техники из нижеприведенного подробного описания, в котором продемонстрированы и описаны иллюстративные варианты осуществления изобретения. Следует понимать, что изобретение допускает модификации в различных аспектах, которые можно осуществлять, не отступая от сути и объема настоящего изобретения. Соответственно, подробное описание следует воспринимать как иллюстративное по своей природе и

не ограничительное.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А иллюстрирует внеклеточное потребление незаменимых аминокислот во время клеточного культивирования с периодической подпиткой с использованием стандартной стратегии подпитки, тогда как фиг. 1В иллюстрирует потребление аспарагина во время клеточного культивирования с периодической подпиткой с использованием стандартной стратегии подпитки.

Фиг. 2А и 2В иллюстрируют внеклеточное потребление аминокислот (фиг. 2А) и аспарагина (фиг. 2В) во время клеточного культивирования с периодической подпиткой с использованием различных стратегий подпитки в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 3А иллюстрирует серию добавлений аспарагина на ранних стадиях периодического культивирования с подпиткой с низким, средним и высоким количеством добавок в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Фиг. 3В иллюстрирует повышение роста клеточной культуры при увеличении количества добавляемого аспарагина, тогда как фиг. 3С иллюстрирует повышение титра в клеточной культуре при увеличении количества добавляемого аспарагина в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 4А иллюстрирует низкое и высокое количество добавляемого аспарагина на поздних стадиях подпитки в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Фиг. 4С иллюстрирует отсутствие негативного влияния на общую продуктивность клеточного культивирования, тогда как фиг. 4В иллюстрирует увеличение образования побочных продуктов в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 5А-5D иллюстрируют улучшенную стратегию подпитки путем добавления аспарагина в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Фиг. 5А иллюстрирует внеклеточную концентрацию незаменимых аминокислот в клеточной культуре с периодической подпиткой, а фиг. 5В иллюстрирует внеклеточную концентрацию аспарагина в клеточной культуре с периодической подпиткой в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Фиг. 5С иллюстрирует повышение роста клеточной культуры, тогда как фиг. 5D иллюстрирует повышение титра в клеточной культуре в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 5Е-5G иллюстрируют титр клеток (фиг. 5Е), число жизнеспособных клеток (фиг. 5F) и жизнеспособность клеток (фиг. 5G) после добавления аспарагина в другой типовой клеточной линии в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 6А иллюстрирует потребление аспарагина после добавления аспарагина на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, тогда как фиг. 6В иллюстрирует потребление аспарагина после добавления аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 7 иллюстрирует уровни потребления аспарагина для диапазона стратегий подпитки аспарагином для типовой клеточной линии с высоким потреблением в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 8 иллюстрирует путь синтеза для аспарагина с использованием аспартата и глутамата.

Фиг. 9А-9D иллюстрируют эффект уровней аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой типовой клеточной линии с высоким потреблением в соответствии с вариантами осуществления изобретения, при этом на фиг. 9А-9В показаны внеклеточные концентрации аспарагина (фиг. 9А) и внеклеточные концентрации глутамата (фиг. 9В), а на фиг. 9С-9D показаны внутриклеточные концентрации аспарагина (фиг. 9С) и внутриклеточные концентрации глутамата (фиг. 9D).

Фиг. 10А-10D иллюстрируют эффект уровней аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой другой типовой клеточной линии с высоким потреблением в соответствии с вариантами осуществления изобретения, при этом на фиг. 10А, 10В показаны внеклеточные концентрации аспарагина (фиг. 10А) и внеклеточные концентрации глутамата (фиг. 10В), а на фиг. 10С, 10D показаны внутриклеточные концентрации аспарагина (фиг. 10С) и внутриклеточные концентрации глутамата (фиг. 10D).

Фиг. 11А-11D иллюстрируют эффект уровней аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой типовой клеточной линии с высоким потреблением в соответствии с вариантами осуществления изобретения, при этом на фиг. 11А, 11В показаны внеклеточные концентрации аспарагина (фиг. 11А) и внеклеточные концентрации глутамата (фиг. 11В), а на фиг. 11С, 11D показаны внутриклеточные концентрации аспарагина (фиг. 11С) и внутриклеточные концентрации глутамата (фиг. 11D).

Фиг. 12А-12F иллюстрируют эффект высоких (3X ранняя стадия, 1,5X поздняя стадия) и очень высоких (6X ранняя стадия, 3X поздняя стадия) уровней аспарагина в клеточной культуре с периодической подпиткой в соответствии с вариантами осуществления изобретения, при этом на фиг. 12А показаны концентрации аспарагина, на фиг. 12В показаны концентрации аспартата, на фиг. 12С показан титр, на фиг. 12D показаны концентрации глутамата, на фиг. 12Е показаны концентрации глутаминна и на фиг. 12F показана концентрация аммония.

Фиг. 13А-13D иллюстрируют эффект болюсной и непрерывной подпитки аспарагином в соответст-

вии с вариантами осуществления изобретения, при этом на фиг. 13А показано число жизнеспособных клеток, на фиг. 13В показан титр, на фиг. 13С показано образование аммония и на фиг. 13D показано образование аланина. Фиг. 13Е-13G иллюстрируют, что непрерывная подпитка путем добавления аспарагина замедляет истощение внеклеточного аспарагина (фиг. 13Е), аспартата (фиг. 13F) и глутамата (фиг. 13G) по сравнению с болюсной подпиткой путем добавления аспарагина, характеризующейся таким же самым общим количеством добавляемого аспарагина, в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 14А-14D иллюстрируют эффект болюсной и непрерывной подпитки аспарагином в соответствии с вариантами осуществления изобретения. фиг. 14А показано потребление аспарагина, тогда как на фиг. 14В, 14С показано потребление связанных с аспарагином метаболитов (аспарат, фиг. 14В и глутамат фиг. 14С). Фиг. 14D показано образование побочного продукта клеточного культивирования, аммония.

Фиг. 15А-15G иллюстрируют гибридный подход подпитки (непрерывная подпитка путем добавления аспарагина в комбинации с болюсной подпиткой путем добавления аспарагина) в типовой клеточной линии в соответствии с вариантами осуществления изобретения, при этом фиг. 15А иллюстрирует внеклеточный аспарагин, фиг. 15В иллюстрирует внеклеточный аспарат, фиг. 15С иллюстрирует внеклеточный глутамат, фиг. 15D иллюстрирует число жизнеспособных клеток, фиг. 15Е иллюстрирует титр, фиг. 15F иллюстрирует образование аммония и фиг. 15G иллюстрирует образование аланина.

Фиг. 16А-16Е иллюстрируют гибридный подход подпитки (непрерывная подпитка путем добавления аспарагина в комбинации с болюсной подпиткой путем добавления аспарагина) в другой типовой клеточной линии в соответствии с вариантами осуществления изобретения, при этом фиг. 16А иллюстрирует внеклеточный аспарагин, фиг. 16В иллюстрирует число жизнеспособных клеток, фиг. 16С иллюстрирует титр, фиг. 16D иллюстрирует образование аммония и фиг. 16Е иллюстрирует образование аланина.

Фиг. 17А иллюстрирует потребление аспарагина при клеточном культивировании с периодической подпиткой после применения стратегий подпитки аспарагином в соответствии с вариантами осуществления изобретения, при этом на фиг. 17В показано уменьшение образования вариантов по последовательности аспарагина.

Фиг. 18А иллюстрирует потребление аспарагина при клеточном культивировании с периодической подпиткой после применения стратегий подпитки аспарагином в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Фиг. 18В иллюстрирует внутриклеточные уровни глутамата, при этом на фиг. 18С показано уменьшение образования вариантов по последовательности аспарагина в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 19А-19G иллюстрируют корреляцию между аспарагином, связанными с аспарагином аминокислотами и вариантами по последовательности аспарагина для типовой клеточной линии в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Фиг. 19В-19D иллюстрирует внеклеточный аспарагин (фиг. 19В), аспарат (фиг. 19С) и глутамат (фиг. 19D), тогда как фиг. 19Е-19G иллюстрируют типовой внутриклеточный аспарагин (фиг. 19Е), аспарат (фиг. 19F) и глутамат (фиг. 19G).

Фиг. 20А-20D иллюстрируют корреляцию между аспарагином, связанными с аспарагином аминокислотами и вариантами по последовательности аспарагина для другой типовой клеточной линии (клеточной линии с высоким потреблением) в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Фиг. 20В-20D иллюстрируют внеклеточный аспарагин (фиг. 20В), внутриклеточный аспарат (фиг. 20С) и внутриклеточный глутамат (фиг. 20D).

Фиг. 21А-21F иллюстрируют тенденции для вариантов по последовательности аспарагина для типовой клеточной линии в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Фиг. 21А и 21С иллюстрируют стратегию ранней подпитки высоким количеством аспарагина (фиг. 21А, количества вариантов по последовательности, определенные методом масс-спектрометрии, фиг. 21С, концентрации внутриклеточного глутамата). Фиг. 21В и 21D иллюстрируют стратегию ранней подпитки низким количеством аспарагина (фиг. 21В, количества вариантов по последовательности, определенные методом масс-спектрометрии, фиг. 21D, концентрации внутриклеточного глутамата). Фиг. 21Е иллюстрирует внутриклеточные уровни глутамата для одной типовой клеточной линии, при этом на фиг. 21F показан внутриклеточный профиль глутамата для другой типовой клеточной линии.

Фиг. 22А-22Н иллюстрируют корреляцию между аспарагином, связанными с аспарагином аминокислотами и вариантами по последовательности аспарагина для типовых клеточных линий. Фиг. 22А-22D иллюстрируют внеклеточный аспарагин (фиг. 22А), внеклеточный аспарат (фиг. 22В), внеклеточный глутамат (фиг. 22С) и внеклеточный глутамин (фиг. 22D) для типовой клеточной линии для стратегии подпитки высоким и низким количеством аспарагина. Фиг. 22Е-22Н иллюстрируют внеклеточный аспарагин (фиг. 22Е), внеклеточный аспарат (фиг. 22F), внеклеточный глутамат (фиг. 22G) и внеклеточный глутамин (фиг. 22Н) для другой типовой клеточной линии для стратегии подпитки высоким и низким количеством аспарагина.

Фиг. 23А-23С дополнительно иллюстрируют, что внеклеточный глутамин может служить суррогатом вариантов по последовательности аспарагина на поздних стадиях клеточного культивирования с пе-

риодической подпиткой. Фиг. 23А иллюстрирует получение глутамина с помощью стратегии с подпиткой высоким количеством аспарагина в типовой клеточной линии. Аналогично, фиг. 23В иллюстрирует получение глутамина с помощью стратегии с подпиткой высоким количеством аспарагина в типовой клеточной линии. И наконец, фиг. 23С показывает, что при отсутствии добавления аспарагина в день 6 и 8 выявляют варианты по последовательности аспарагина, а внеклеточный уровень глутамина падает ниже пределов истощения (т.е. вырабатывается недостаточно глутамина с помощью стратегий с подпиткой аспарагином).

Подробное описание изобретения

В соответствии с аспектами изобретения неожиданно было обнаружено, что проведение операций клеточного культивирования с оптимизированными стратегиями подпитки аспарагином может улучшить производительность клеточного культивирования, включая улучшение роста клеток и выработки клетками белка в клеточной культуре, по сравнению с операциями клеточного культивирования без таких оптимизированных стратегий подпитки аспарагином.

В качестве неограничивающего примера улучшение производительности клеточного культивирования можно определять путем оценки скорости роста клеток, жизнеспособности клеток, выработки белка, выработки побочных продуктов клеточного роста (например, концентрации ионов аммония, концентрации аланина и т.д.) и различных их комбинаций. Улучшения можно оценивать в сравнении с операциями клеточного культивирования без оптимизированных стратегий подпитки аспарагином, как описано в данном документе.

Аспарагин представляет собой заменимую аминокислоту, часто потребляемую на высоких уровнях клетками в культуре, которая играет центральную роль в метаболизме клеточной культуры. В определенных аспектах изобретения роль аспарагина в производительности клеточной культуры с периодической подпиткой исследовали наряду с метаболическими исследованиями внутриклеточного и внеклеточного аспарагина и связанных с ним метаболитов.

Как проиллюстрировано на фиг. 1А и 1В, было обнаружено, что внеклеточные незаменимые аминокислоты (фиг. 1А) потребляются на высоком уровне и в конце клеточного культивирования с периодической подпиткой большей частью истощаются, тогда как внеклеточный аспарагин, заменимая аминокислота (фиг. 1В) истощается в течение времени клеточного культивирования с периодической подпиткой при стандартной стратегии болюсной подпитки аспарагином.

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам клеточного культивирования с использованием добавления аспарагина для минимизации, замедления и предотвращения истощения аминокислот с улучшением при этом производительности клеточного культивирования. Например, на фиг. 2А, 2В было обнаружено, что истощение внеклеточных незаменимых аминокислот можно предотвратить за счет добавления незаменимых аминокислот (фиг. 2А), но что большее количества аспарагина, добавляемое во время фазы роста (ранняя стадия) и стационарной фазы/фазы затухания (поздняя стадия) продуктивной фазы клеточного культивирования с периодической подпиткой, не предотвращает истощение внеклеточного аспарагина в типовых клеточных линиях с высокой производительностью, что позволяет предположить, что уровни потребления аспарагина превышают стехиометрические требования (фиг. 2В). Следовательно, в соответствии с вариантами осуществления изобретения оценивали влияние добавления аспарагина во время и после ранней стадии, фазы роста, и поздней стадии, стационарной фазы/фазы затухания, клеточного культивирования с периодической подпиткой, чтобы выбрать сбалансированные стратегии подпитки аспарагином, как описано в данном документе.

Названия заголовков, используемые в данном документе, предназначены исключительно для упорядочения, и их не следует воспринимать как ограничивающие описанный предмет изобретения. Описанные в данном документе способы и технологии в общем случае осуществляют в соответствии с традиционными способами, известными в данной области техники и описанными в различных общих и более специфических литературных источниках, которые цитируются и обсуждаются в описании настоящего изобретения, 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), Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), и Julio E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998), и Dieffenbach and Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995). Все публикации, упоминаемые в тексте этого изобретения, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют те же значения, которые обычно подразумеваются специалистом в области техники, к которой относится это изобретение. Хотя при практической реализации настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, далее будут описаны конкретные способы и материалы.

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле,

содержащей два или более аминокислотных остатка, соединенных друг с другом пептидной связью. Пептиды, полипептиды и белки также могут содержать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксиглирование и АДФ-рибозилирование. Пептиды, полипептиды и белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая белковые лекарственные препараты. Пептиды, полипептиды и белки включают, помимо прочего, антитела и химерные или слитые белки. Пептиды, полипептиды и белки вырабатываются рекомбинантными клеточными линиями животных с использованием способов клеточного культивирования.

В контексте данного документа термин "гетерологичная полинуклеотидная последовательность" относится к полимерам нуклеиновых кислот, кодирующим представляющие интерес белки, такие как химерные белки (такие как молекулы-ловушки), антитела или части антител (например, V_H , V_L , CDR3), которые получают как биофармацевтическое лекарственное вещество. Гетерологичную полинуклеотидную последовательность можно получать с помощью технологий геномной инженерии (например, таких как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, последовательность без интронов и т.д.) и вносить в клетку, в которой она может находиться в виде эписомы или интегрироваться в геном клетки. Гетерологичная полинуклеотидная последовательность может представлять собой встречающуюся в природе последовательность, которую вносят в эктопический сайт в геноме вырабатывающей клетки. Гетерологичная полинуклеотидная последовательность может представлять собой встречающуюся в природе последовательность из другого организма, такую как последовательность, кодирующая человеческий ортолог.

"Антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает отнесение как к гликозилированным, так и негликозилированным иммуноглобулинам любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, например антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с несколькими разными эпитопами. Биспецифические антитела в целом описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527, которая включена в этот документ посредством ссылки.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или "фрагмент антитела") относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989), Nature, 241:544-546), который состоит из домена V_H ; (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, V_L и V_H , соединенных синтетическим линкером с образованием одной белковой цепи, в которой пара областей V_L и V_H образует одновалентные молекулы. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охвачены термином "антитело" (см., например, Holliger et al. (1993), PNAS, USA, 90:6444-6448; Poljak et al. (1994), Structure, 2:1121-1123).

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть частью более крупной молекулы иммуноадгезии, образованной за счет ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или части антитела с одним или более белками или пептидами. Примеры молекул иммуноадгезии включают использование коровой области стрептавидина для создания тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al. (1995), Human Antibodies and Hybridomas, 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевого полигистидинового тега для создания двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al. (1994), Mol. Immunol. 31:1047-1058). Части антител, такие как фрагменты Fab и $F(ab')_2$, можно получать из цельных антител, используя традиционные технологии, такие как расщепление цельных антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии можно получать, используя стандартные технологии рекомбинантных ДНК, общеизвестные в данной области техники (см. Sambrook et al., 1989).

Подразумевается, что термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародыше-

вой линии. Человеческие антитела по изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, внесенные за счет случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например в CDR и, в частности, в CDR3. При этом в контексте данного документа подразумевается, что термин "человеческое антитело" не включает антитела, в которых последовательности CDR получены из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, и привитые в человеческие каркасные последовательности.

В контексте данного документа подразумевается, что термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает все человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, антитела, выделенные от животного (например, мыши), которое является трансгенным в отношении генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992), Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг генных последовательностей человеческого иммуноглобулина другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. При этом в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают *in vitro* мутагенезу (или, когда используют животное, трансгенное в отношении последовательностей человеческого Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу), и поэтому аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L человеческой зародышевой линии и родственны с ними, могут не существовать в природе в репертуаре зародышевой линии человеческих антител *in vivo*.

"Fc-слитые белки" содержат часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые в ином случае не встречаются вместе в природе. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полученных из антител полипептидов (включая Fc-домен), было описано, например, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:10535, 1991; Byrn et al., Nature, 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, p. 10.19.1-10.19.11, 1992. "Рецепторные Fc-слитые белки" включают один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которой следуют домены C_H2 и C_H3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок содержит две или более разные цепи рецептора, которые связываются с одним или более лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc из hIgG1; см. патент США № 6927004) или ловушку VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig VEGF-рецептора Flt1, слитый с доменом 3 Ig VEGF-рецептора Flk1, слитым с Fc из hIgG1; см. патенты США № 7087411 и 7279159).

Добавление аспарагина.

В определенных аспектах изобретения было обнаружено, что добавление в клеточную культуру с периодической подпиткой аспарагина влияет на производительность клеточного культивирования. При этом также было обнаружено, что вне зависимости от количества добавляемого аспарагина истощения аспарагина во время клеточного культивирования с периодической подпиткой избежать невозможно. В связи с этим, без каких-либо ограничений, в определенных аспектах изобретения неожиданно было обнаружено, что, хотя истощение аспарагина во время клеточного культивирования с периодической подпиткой негативно влияет на производительность клеточного культивирования, подпитка слишком высокими уровнями аспарагина также может негативно влиять на производительность клеточного культивирования, например, в форме образования побочных продуктов, таких как аммоний.

В определенных вариантах осуществления предложен способ культивирования эукариотических клеток для улучшения производительности клеточного культивирования. В общем случае способ включает размножение или поддержание эукариотических клеток в определенной клеточной культуральной среде; при этом в определенную клеточную культуральную среду добавляют аспарагин в количестве от около 2,6 до около 28,6 мМ во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и от около 2,6 до около 21,6 мМ во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой; и поддержание указанных клеток в указанной дополненной аспарагином клеточной культуральной среде в течение по меньшей мере части ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и по меньшей мере части поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой; при этом производительность клеточного культивирования улучшается за счет добавления аспарагина по сравнению с аналогичным способом с добавлением меньшего количества аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

Как более подробно описано в данном документе, добавление аспарагина в клеточную культуру

(как в ранней фазе, так и в поздней фазе) можно проводить в виде болюсной подпитки (например, одной болюсной подпитки во время ранней фазы и одной болюсной подпитки во время поздней фазы), нескольких болюсных подпиток в течение курса по меньшей мере части клеточного культивирования (например, 2, 3, 4 или 5 болюсных подпиток во время ранней фазы и 2, 3, 4 или 5 болюсных подпиток во время поздней фазы) или непрерывно в течение курса по меньшей мере части клеточного культивирования.

В определенных вариантах осуществления добавление аспарагина можно проводить как часть общей подпитки или как отдельную дополнительную подпитку к общей подпитке. Конкретнее, добавление в клеточную культуру (как в ранней фазе, так и в поздней фазе) можно проводить в виде болюсной или непрерывной подпитки, в виде части общей подпитки или в виде отдельной дополнительной подпитки к общей подпитке.

В определенных вариантах осуществления плотность и/или титр клеточной культуры повышены по сравнению с аналогичным способом с добавлением меньшего количества аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В определенных аспектах клеточная культура может сохранять число жизнеспособных клеток, составляющее по меньшей мере около 10-50 млн клеток/мл, например около 10-35 млн клеток/мл, в течение по меньшей мере части поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой после добавления аспарагина.

В определенных вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клеточную линию с высоким потреблением аспарагина, например, клетка потребляет по меньшей мере от около 1,8 до около 9,3 мМ/день аспарагина. В других вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клеточную линию с низким потреблением аспарагина, например, клетка потребляет по меньшей мере от около 0,32 до около 1,8 мМ/день аспарагина.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает экспрессию представляющего интерес рекомбинантного белка из эукариотических клеток во время клеточного культивирования с периодической подпиткой. Титр представляющего интерес рекомбинантного белка может быть по меньшей мере на 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или по меньшей мере на 20% выше, чем титр сравнимой(ых) клетки(ок), культивируемой(ых) в культуре без добавления аспарагина. Выход представляющего интерес рекомбинантного белка может быть повышен по меньшей мере на 0,1 г/л, по меньшей мере на 0,5 г/л, по меньшей мере на 1 г/л, по меньшей мере на 1,2 г/л, по меньшей мере на 1,4 г/л, по меньшей мере на 1,6 г/л, по меньшей мере на 1,8 г/л, по меньшей мере на 2 г/л, по меньшей мере на 2,2 г/л, по меньшей мере на 2,4 г/л или по меньшей мере на 2,5 г/л по сравнению с аналогичным способом, в котором клетку(и) культивируют в культуре без добавления аспарагина. В определенных вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клеточную линию с высокой производительностью, например, представляющий интерес рекомбинантный белок вырабатывается с выходом по меньшей мере 4 г/л, по меньшей мере 5 г/л, по меньшей мере 6 г/л, по меньшей мере 7 г/л, по меньшей мере 8 г/л, по меньшей мере 9 г/л или по меньшей мере 10 г/л, по меньшей мере 11 г/л, по меньшей мере 12 г/л, по меньшей мере 13 г/л, по меньшей мере 14 г/л.

В определенных вариантах осуществления в определенную клеточную культуральную среду добавляют аспарагин в количестве от около 2,6 до около 28,6 мМ, от около 3,0 до около 25,0 мМ, от около 5,0 до около 23,0 мМ, от около 6,0 до около 22,0 мМ, от около 7,2 до около 21,6 мМ, от около 10,6 мМ и т.д. во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и от около 2,6 до около 21,6 мМ, от около 2,6 до около 20,0 мМ, от около 2,6 до около 18,0 мМ, от около 2,6 до около 16,0 мМ, от около 2,6 до около 14,4 мМ, около 5,3 мМ и т.д. во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В других вариантах осуществления в определенную клеточную культуральную среду добавляют аспарагин в количестве от около 7,2 до около 21,6 мМ во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и от около 2,6 до около 14,4 мМ во время поздней стадии культивирования периодической подпитки. В других вариантах осуществления в определенную клеточную культуральную среду добавляют аспарагин в количестве около 10,6 мМ во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и около 5,3 мМ во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В определенных вариантах осуществления клетки можно поддерживать в условиях клеточной культуры с добавлением аспарагина в течение по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней или в течение всего клеточного культивирования с периодической подпиткой. Добавление аспарагина можно проводить по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, один раз в день или непрерывно в течение по меньшей мере части ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. Аналогично, добавление аспарагина можно проводить по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, один раз в день или непрерывно в течение по меньшей мере части поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В определенных вариантах осуществления клетки можно поддерживать в условиях клеточной куль-

туры с добавлением аспарагина с объемом по меньшей мере 500 л, по меньшей мере 750 л, по меньшей мере 1000 л, по меньшей мере 1500 л, по меньшей мере 2000 л, по меньшей мере 2500 л, по меньшей мере 5000 л, по меньшей мере 7500 л, по меньшей мере 10000 л, по меньшей мере 12500 л, по меньшей мере 15000 л, по меньшей мере 20000 л, по меньшей мере 25000 л, от 500 до 25000 л и т.д.

В определенных вариантах осуществления добавление аспарагина можно проводить непрерывно на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В определенных аспектах непрерывное добавление аспарагина в клеточную культуру приводит к замедлению истощения внеклеточных аминокислот аспарагина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты по меньшей мере на 1 день, по меньшей мере на 2 дня, по меньшей мере на 3 дня или по меньшей мере на 4 дня или более по сравнению с аналогичным способом с проведением добавления аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой в виде болюсной подпитки.

Конкретнее, в определенных вариантах осуществления, как описано в данном документе, добавление аспарагина можно проводить непрерывно в течение по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней или в течение ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. Аналогично, в определенных вариантах осуществления добавление аспарагина можно проводить непрерывно в течение по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней или в течение поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

Без каких-либо ограничений, в определенных вариантах осуществления добавление аспарагина можно проводить непрерывно, начиная в день 2 или после него клеточного культивирования с периодической подпиткой, а после этого в течение по меньшей мере части ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, или в день 5 или после него клеточного культивирования с периодической подпиткой, а после этого в течение по меньшей мере части поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. Такое добавление аспарагина на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой можно прекращать в день 10 или после него поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

Добавление аспарагина для уменьшения количества вариантов по последовательности аспарагина.

В других аспектах было обнаружено, что истощение аспарагина (Asn) во время клеточного культивирования с периодической подпиткой может приводить к появлению вариантов по последовательности (ВП) аспарагина в представляющем интерес полипептиде, экспрессируемом из клеток млекопитающего в клеточной культуре. Согласно известному уровню техники, как описано в патенте США № 9096879, который включен в данный документ посредством ссылки, известно, что истощение конкретной аминокислоты во время рекомбинантной экспрессии представляющего интерес полипептида в клетках млекопитающих может инициировать ошибочное включение аминокислот. Например, истощение конкретной аминокислоты во время рекомбинантной экспрессии представляющего интерес полипептида в клетках млекопитающих может приводить к замещению аминокислоты второй аминокислотой во время трансляции представляющего интерес полипептида в клетке млекопитающего. Наблюдают варианты по последовательности аспарагина с Asn→Ser (т.е. ошибочным включением серина вместо аспарагина во время трансляции представляющего интерес полипептида), но их можно минимизировать путем добавления в клеточную культуральную среду аспарагина.

В связи с этим было обнаружено, что добавление в клеточную культуру с периодической подпиткой аспарагина может минимизировать образование ВП аспарагина. В соответствии с вариантами осуществления изобретения было неожиданно обнаружено, что ВП аспарагина можно минимизировать путем поддержания внеклеточных уровней аспарагина в клеточной культуральной среде в течение по меньшей мере ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой выше предела истощения около 1,0 мМ, около 0,5 мМ, около 0,25 мМ, около 0,2 мМ, около 0,1 мМ и т.д. В определенных вариантах осуществления внеклеточные уровни аспарагина в клеточной культуральной среде можно поддерживать выше такого предела истощения в течение по меньшей мере первых 6 дней ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, по меньшей мере первых 5 дней ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, по меньшей мере первых 4 дней ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, по меньшей мере первых 3 дней ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, по меньшей мере первых 2 дней ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и т.д. В качестве примера, продолжительность поддержания выше такого предела истощения может включать добавление аспарагина по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, один раз в день, непрерывно и т.д. во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В соответствии с определенными вариантами осуществления изобретения добавление в клеточную культуру с периодической подпиткой аспарагина может уменьшать, т.е. предотвращать появление ВП аспарагина до количества менее чем около 0,50% ВП аспарагина в представляющем интерес полипептиде, до количества менее чем около 0,45% ВП аспарагина в представляющем интерес полипептиде, до количества менее чем около 0,40% ВП аспарагина в представляющем интерес полипептиде, до количества менее чем около 0,35% ВП аспарагина в представляющем интерес полипептиде, до количества менее

чем около 0,30% ВП аспарагина в представляющем интерес полипептиде, до количества менее чем около 0,25% ВП аспарагина в представляющем интерес полипептиде, до количества менее чем около 0,20% ВП аспарагина в представляющем интерес полипептиде, до количества менее чем около 0,15% ВП аспарагина в представляющем интерес полипептиде, до количества менее чем около 0,10% ВП аспарагина в представляющем интерес полипептиде, до отсутствия выявления ВП аспарагина и т.д.

В определенных вариантах осуществления добавление в клеточную культуру с периодической подпиткой аспарагина может уменьшать образование ВП аспарагина до таких уровней после, например, дня 4 клеточного культивирования, дня 5 клеточного культивирования, дня 6 клеточного культивирования, дня 7 клеточного культивирования, дня 8 клеточного культивирования, дня 9 клеточного культивирования, дня 10 клеточного культивирования, дня 11 клеточного культивирования, дня 12 клеточного культивирования, дня 13 клеточного культивирования, дня 14 клеточного культивирования во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и т.д.

В определенных вариантах осуществления добавление аспарагина можно добавлять аспарагин, как в целом описано в данном документе, например, в количестве от около 2,6 до около 28,6 мМ, например от около 7,2 до около 21,6 мМ, около 10,6 мМ и т.д. во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и от около 2,6 до около 21,6 мМ, например от около 2,6 до около 14,4 мМ, от около 5,3 мМ и т.д. во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В определенных вариантах осуществления добавление аспарагина можно проводить как часть общей подпитки или как отдельную дополнительную подпитку аспарагином.

В определенных аспектах неожиданно было обнаружено, что образование ВП аспарагина можно уменьшить, если проводить достаточное добавление аспарагина во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой для предотвращения истощения аспарагина до по меньшей мере дня 4 клеточного культивирования с периодической подпиткой (например, в определенных вариантах осуществления, второй болюсной подпитки). В определенных вариантах осуществления предложено добавление на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой с последующим достаточным добавлением аспарагина и во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой для предотвращения истощения аспартата (Asp) и глутамата (Glu) (или для выработки достаточного количества глутамина (Gln), т.е. >100 мг/л) с компенсацией при этом образования избытка аммония для оптимизированного уменьшения количества ВП аспарагина.

В определенных вариантах осуществления неожиданно было обнаружено, что проведение достаточного добавления аспарагина во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой для поддержания уровней выше предела истощения (т.е. по меньшей мере до дня 4 клеточного культивирования с периодической подпиткой) и последующего достаточного добавления аспарагина во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой минимизирует образование нежелательных побочных продуктов (например, аммония). В качестве неограничивающего примера добавление аспарагина во время ранней стадии и поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой может соответствовать любым из следующих критериев для обеспечения снижения риска появления ВП аспарагина.

Неограничивающие типовые условия ранней стадии культивирования с периодической подпиткой

| Аминокислота | 0,1 мМ предел истощения | Руководство по мин. подпитке (мг/л) Д4/вторая подпитка |
|------------------------------|-------------------------|---|
| L-аспарагин.Н ₂ О | 15 мг/л | 100 мг/л |

Неограничивающие типовые условия поздней стадии культивирования с периодической подпиткой

| Аминокислота | 0,1 мМ предел истощения | Руководство по мин. подпитке (мг/л) Д8 - окончание культивирования с периодической подпиткой |
|------------------------------|-------------------------|---|
| L-глутаминовая кислота | 15 мг/л | 100 мг/л |
| L-аспарагиновая кислота | 13 мг/л | 100 мг/л |
| L-аспарагин.Н ₂ О | 15 мг/л | 15 мг/л |
| L-глутамин | 15 мг/л | 100 мг/л |

Связанные с аспарагином аминокислоты.

В других аспектах изобретения было обнаружено, что направленное истощение аспарагина может влиять на заменимые аминокислоты, которые связаны с аспарагином посредством клеточных метаболических путей. Согласно известному уровню техники аспарагин (Asn), аспарат (Asp), глутамат (Glu) и глутамин (Gln) могут взаимно превращаться друг в друга посредством клеточных метаболических путей.

Если необходим аспарагин, клетки могут увеличивать потребление аспартата и глутамата для синтеза добавочного количества аспарагина. Повышенные внутриклеточные/внеклеточные концентрации аспартата, глутамата и глутамина могут свидетельствовать о том, что клетки имеют достаточное количество внутриклеточного аспарагина для поддержания клеточных потребностей. При этом снижение концентраций аспартата, глутамата и глутамина может свидетельствовать о недостатке аспарагина.

Связанные с аспарагином аминокислоты как суррогатные маркеры вариантов по последовательности (ВП) аспарагина.

В других аспектах было обнаружено, что связанные с аспарагином аминокислоты, включая аспартат (Asp), глутамат (Glu) и глутамин (Gln), можно использовать как суррогатные маркеры вариантов по последовательности аспарагина, образуемых во время выработки представляющего интерес полипептида. В соответствии с определенными вариантами осуществления изобретения было обнаружено, что внутриклеточные и внеклеточные концентрации связанных с аспарагином аминокислот могут служить качественными показателями образования вариантов по последовательности аспарагина.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что повышенные уровни внутриклеточных и/или внеклеточных концентраций связанных с аспарагином аминокислот в общем случае свидетельствуют о том, что клетки имеют нормальное количество внутриклеточного аспарагина для поддержания клеточных потребностей. Такое нормальное количество внутриклеточного аспарагина обуславливает минимальное количество вариантов по последовательности аспарагина в вырабатываемом представляющем интерес полипептиде. И наоборот, сниженные уровни внутриклеточных и/или внеклеточных концентраций связанных с аспарагином аминокислот в общем случае свидетельствуют о том, что клетки имеют аномальное количество внутриклеточного аспарагина для поддержания клеточных потребностей. Такое аномальное количество внутриклеточного аспарагина обуславливает повышенное количество вариантов по последовательности аспарагина в вырабатываемом представляющем интерес полипептиде. Следовательно, связанные с аспарагином аминокислоты можно использовать как суррогатные маркеры вариантов по последовательности аспарагина на основании общей обратной корреляции. Величина корреляции этих суррогатов зависит от влияния направленного добавления аспарагина на внеклеточные и внутриклеточные аминокислотные профили связанных аминокислот, которые, в свою очередь, могут быть частично обусловленными клеточной линией и концентрацией аспарагина.

В определенных вариантах осуществления внутриклеточные и внеклеточные концентрации аспарагина и связанных с аспарагином аминокислот можно использовать как суррогатные маркеры вариантов по последовательности аспарагина. Без какого-либо ограничения, было неожиданно обнаружено, что ВП аспарагина можно, в частности, минимизировать путем добавления достаточного количества аспарагина на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, при этом образование ВП аспарагина можно мониторить, используя внутриклеточные и внеклеточные концентрации аспарагина и связанных с аспарагином аминокислот. В качестве примера образование ВП аспарагина можно мониторить *in situ* путем отслеживания внутриклеточных и внеклеточных концентраций аспарагина и связанных с аспарагином аминокислот. В определенных вариантах осуществления внеклеточный аспарагин (Asn) можно мониторить на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой как суррогат ВП аспарагина, тогда как внеклеточный аспарагин (Asn), аспартат (Asp), глутамат (Glu) и глутамин (Gln) можно мониторить на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В альтернативных вариантах осуществления внутриклеточные Asn, Asp, Glu и Gln можно мониторить на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В определенных вариантах осуществления предложены способы выявления, измерения или скрининга вариантов по последовательности аспарагина в представляющем интерес полипептиде. Эти способы в общем случае включают размножение или поддержание эукариотических клеток в определенной клеточной культуральной среде; экспрессию представляющего интерес рекомбинантного белка из эукариотических клеток; измерение внутриклеточных и/или внеклеточных концентраций аспарагина или одной или более связанных с аспарагином аминокислот в определенной клеточной культуральной среде; и корреляцию измеренных концентраций аспарагина или одной или более связанных с аспарагином аминокислот с наличием вариантов по последовательности аспарагина, присутствующих в экспрессируемом представляющем интерес рекомбинантном белке. В некоторых вариантах осуществления измеренные концентрации аспарагина или одной или более связанных с аспарагином аминокислот обратно коррелируют с наличием вариантов по последовательности аспарагина.

В определенных вариантах осуществления в определенную клеточную культуральную среду можно добавлять аспарагин, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления связанная с аспарагином аминокислота может быть выбрана из аспартата (Asp), глутамата (Glu), глутамина (Gln) и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления связанная с аспарагином аминокислота представляет собой глутамин. В некоторых вариантах осуществления связанную с аспарагином аминокислоту можно измерять внутриклеточно.

В некоторых вариантах осуществления одну или более связанных с аспарагином аминокислот можно измерять во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, например, после дня 5, после дня 6, после дня 7, после дня 8, после дня 9, после дня 10 и т.д. клеточного куль-

тивирования с периодической подпиткой.

В определенных аспектах способы выявления, измерения или скрининга вариантов по последовательности аспарагина с использованием связанных с аспарагином аминокислот как суррогатных маркеров могут обеспечить высокоэффективные технологии скрининга и оптимизации для идентификации оптимальных параметров клеточного культивирования для конкретных представляющих интерес полипептидов. Например, способ можно использовать для достижения оптимальных уровней подпитки аспарагином, которые минимизируют количество вариантов по последовательности аспарагина для конкретного представляющего интерес полипептида.

Оптимизация добавления аспарагина, *in situ* мониторинг и контроль.

В определенных вариантах осуществления предложены способы для мониторинга и контроля параметров клеточного культивирования, включая добавление аспарагина. Такие способы могут обеспечивать мониторинг и контроль различных технологических параметров клеточного культивирования для обеспечения оптимального добавления аспарагина в целевую клеточную линию и/или представляющий интерес полипептид. Типовые технологические параметры клеточного культивирования, которые можно мониторить и контролировать, включают, но не ограничиваются этим, концентрации аспарагина, концентрации связанных с аспарагином аминокислот, число жизнеспособных клеток, число мертвых клеток, титр белка, ионы аммония, аланин, осмоляльность и их комбинации.

В определенных аспектах способы мониторинга и контроля по изобретению можно использовать для оптимизации и предотвращения истощения аспарагина в клеточной культуральной среде с одновременным контролем образования побочных продуктов клеточного культивирования, таких как ионы аммония и аланин. Следовательно, такой мониторинг и контроль могут обеспечить улучшенный контроль параметров производительности клеточного культивирования, например, числа жизнеспособных клеток и титра белка.

В определенных вариантах осуществления предложен способ мониторинга и контроля условий клеточной культуральной среды. В общем случае способ может включать измерение одного или более параметров клеточного культивирования в клеточной культуре с использованием *in situ* понижения точки замерзания, электрохимии, цифровой визуализации, фотометрии, анализатора биопроцессов или рамановской спектроскопии; сравнение измеренных одного или более параметров клеточного культивирования с предопределенным установленным значением для параметра клеточного культивирования для определения того, находятся ли один или более параметров клеточного культивирования в рамках предопределенного порогового диапазона; и корректировку одного или более параметров клеточного культивирования в случае определения, что параметр клеточного культивирования находится за пределами предопределенного порогового диапазона. В определенных вариантах осуществления можно мониторить концентрации ионов аммония и в случае определения, что концентрации ионов аммония находятся за пределами предопределенного порогового диапазона для конкретной клеточной культуры, можно корректировать подпитку аспарагином так, чтобы клеточная культура вырабатывала меньше аммония, получая при этом адекватное количество аспарагина. Такой способ можно использовать для обеспечения оптимального и максимального количества добавляемого аспарагина, минимизируя при этом выработку клеточных побочных продуктов, таких как ионы аммония и аланин.

В определенных вариантах осуществления в способах мониторинга и контроля по изобретению можно использовать *in situ* понижение точки замерзания, электрохимию, цифровую визуализацию, фотометрию, анализатор биопроцессов или рамановскую спектроскопию или другую подходящую *in situ* методологию измерения параметров клеточного культивирования и технологии хемотрического моделирования для оценки параметров клеточного культивирования в режиме реального времени в комбинации с технологиями обработки сигнала для точной и непрерывной обратной связи и контроля на основе прогнозирующих моделей технологических параметров клеточного культивирования. *In situ* понижение точки замерзания, электрохимия, цифровая визуализация, фотометрия, анализатор биопроцессов или рамановская спектроскопия содержимого биореактора позволяют анализировать одну или более переменных процесса без физического изъятия образца для исследования. Такие технологии могут обеспечить контроль с обратной связью в режиме реального времени технологических параметров клеточного культивирования, включая добавление аспарагина.

В одном варианте осуществления можно устанавливать предопределенное максимальное установленное значение для ионов аммония и/или аланина. Аналогично, можно устанавливать предопределенное установленное значение для скорости непрерывного потока добавляемого аспарагина. Непрерывную подпитку путем добавления аспарагина можно начинать в любой необходимый момент времени клеточного культивирования с периодической подпиткой (например, в рамках ранней стадии культивирования с периодической подпиткой, в день 1, в день 2, в день 3, в день 4, в рамках поздней стадии культивирования с периодической подпиткой, в день 5, в день 6, в день 7, в день 8, в день 9, в день 10 и т.д.). Один или более параметров из концентрации аспарагина, связанных с аспарагином аминокислот, ионов аммония и/или аланина можно мониторить во время операций клеточного культивирования с помощью понижения точки замерзания, электрохимии, цифровой визуализации, фотометрии, анализатора биопроцессов или рамановской спектроскопии. В определенных вариантах осуществления, чтобы гарантировать, что

исходные спектральные данные всегда являются актуальными, данные, получаемые с помощью понижения точки замерзания, электрохимии, цифровой визуализации, фотометрии, анализатора биопроцессов или рамановской спектроскопии, можно получать приблизительно от каждых 10 мин до 2 ч. В другом варианте осуществления данные можно получать приблизительно от каждых 15 мин до 1 ч. В другом варианте осуществления данные можно получать приблизительно от каждых 20 до 30 мин.

Мониторинг одного или более технологических параметров клеточного культивирования можно осуществлять с помощью любых коммерчески доступных анализаторов, которые позволяют проводить анализ *in situ*. *In situ* анализатор должен обеспечивать получение исходных данных в клеточной культуре (например, анализатор должен быть оснащен зондом, которые можно вставлять в биореактор). Подходящие анализаторы включают, но не ограничиваются этим, анализаторы RamanRXN2 и RamanRXN4 (Kaiser Optical Systems, Inc. Ann Arbor, Mich.) или автоматизированный анализатор клеточных культур BioProfile Flex.

Исходные спектральные данные, полученные с помощью анализатора *in situ*, можно сравнивать с оффлайн-измерениями конкретного параметра процесса, подлежащего мониторингу или контролю (например, оффлайн-измерениями концентрации аспарагина), с целью корреляции данных с технологическим параметром. Данные оффлайн-измерений можно получать любым подходящим аналитическим способом. Кроме того, можно использовать любой тип многофакторного программного обеспечения, например, SIMCA 13 (MKS Data Analytic Solutions, Umea, Sweden) для корреляции данных с оффлайн-измерениями конкретной технологической переменной, подлежащей мониторингу или контролю. При этом в некоторых вариантах осуществления может быть необходимой предварительная обработка исходных данных с помощью фильтров для удаления каких-либо изменчивых базовых данных. Например, исходные данные можно предварительно обрабатывать с помощью функции сглаживания или функции нормализации любого типа. Нормализация может быть необходима, например, для корректировки в отношении каких-либо вариаций мощности и времени экспозиции. В одном варианте осуществления исходные данные можно обрабатывать с помощью точечного сглаживания, такого как первая производная с 21 см^{-1} точечным сглаживанием, и нормализации, такой как нормализация с помощью стандартного отклонения случайной величины с нормальным распределением (SNV).

Также для полученных спектральных данных можно проводить хемометрическое моделирование. В определенных вариантах осуществления в отношении спектральных данных можно использовать один или более многофакторных способов, включая, но не ограничиваясь этим, метод частичных наименьших квадратов (PLS), анализ основных компонентов (PCA), метод ортогональных частичных наименьших квадратов (OPLS), многофакторную регрессию, каноническую корреляцию, факторный анализ, кластерный анализ, графические процедуры и т.п. В одном варианте осуществления полученные спектральные данные используют для создания регрессионной модели PLS. Регрессионную модель PLS можно создавать путем проекции прогнозируемых переменных и наблюдаемых переменных на новое пространство. В этом аспекте регрессионную модель PLS можно создавать, используя значения измерений, полученных из рамановского анализа, и значения оффлайн-измерений. Регрессионная модель PLS обеспечивает прогнозные технологические значения, например, прогнозные значения концентрации питательных веществ.

После хемометрического моделирования в отношении прогнозных технологических значений (например, прогнозных значений концентрации аспарагина) можно применять методику обработки сигнала. В одном варианте осуществления методика обработки сигнала включает методику подавления шумов. В определенных вариантах осуществления в отношении прогнозных технологических параметров можно применять одну или более методик подавления шумов. Можно использовать любую методику подавления шумов, известную в данной области техники. Например, методика подавления шумов может включать сглаживание данных и/или отбраковку сигнала. Сглаживание обеспечивают с помощью ряда алгоритмов сглаживания и фильтров, тогда как при отбраковке сигнала используют характеристики сигнала, для определения данных, которые не следует включать в анализируемые спектральные данные. В одном варианте осуществления для прогнозных технологических значений проводят подавление шумов с помощью фильтра подавления шумов. Фильтр подавления шумов обеспечивает конечные отфильтрованные технологические значения (например, конечные отфильтрованные значения концентрации питательных веществ). В этом аспекте в методике подавления шумов скомбинированы исходные измерения с оценкой на основе модели, которую необходимо получить при измерении в соответствии с моделью. В одном варианте осуществления в методике подавления шумов скомбинировано текущее прогнозное технологическое значение с его неопределенностью. Неопределенность можно определить по повторяемости прогнозных технологических значений и текущим условиям процесса. После получения следующего прогнозного технологического значения оценку прогнозного технологического значения (например, прогнозного значения концентрации питательных веществ) обновляют, используя средневесовое значение, при этом больший вес приписывают оценкам с большей степенью определенности. Используя итеративный подход, конечные технологические значения можно обновлять на основании предыдущего измерения и текущих условий процесса. В этом аспекте алгоритм должен быть рекурсивным и возможным для выполнения в режиме реального времени так, чтобы использовать текущее прогнозное технологическое

значение, предыдущее значение и экспериментально определенные постоянные. Методика подавления шумов улучшает робастность измерений, полученных из рамановского анализа и прогнозов PLS, путем подавления шумов, после чего начинает действовать автоматический контроллер обратной связи.

После получения конечных отфильтрованных технологических значений (например, конечных отфильтрованных значений концентрации питательных веществ) конечные значения можно посылать на автоматический контроллер обратной связи. Автоматический контроллер обратной связи можно использовать для контроля и поддержания технологических параметров (например, мониторинга концентрации аммония и контроля концентрации аспарагина) на предопределенном установленном уровне или ниже его. В одном варианте осуществления при выявлении концентраций аммония выше максимального установленного значения автоматический контроллер обратной связи может предложить уменьшить количество подпитки аспарагином в рамках порогового диапазона. Автоматический контроллер обратной связи может включать любой тип контроллера, который способен рассчитывать значение погрешности как разницу между необходимым установленным значением (например, предопределенным установленным значением) и измеренным технологическим параметром и автоматически применять точную и адаптивную корректировку. Автоматический контроллер обратной связи также должен иметь параметры контроля, которые можно изменять в режиме реального времени с интерфейса платформы. Например, автоматический контроллер обратной связи должен иметь пользовательский интерфейс, которые позволяет осуществлять корректировку предопределенного установленного значения. Автоматический контроллер обратной связи должен быть способен реагировать на изменение предопределенного установленного значения.

В одном варианте осуществления автоматический контроллер обратной связи может представлять собой пропорционально-интегральный дифференциальный (ПИД) контроллер. В этом аспекте ПИД-контроллер выполнен с возможностью расчета разницы между предопределенным установленным значением и измеренной технологической переменной (например, измеренной концентрацией аспарагина) и автоматического применения точной корректировки. Например, когда необходимо контролировать концентрацию питательных веществ в клеточной культуре, ПИД-контроллер может быть выполнен с возможностью расчета разницы между отфильтрованным значением питательных веществ и предопределенным установленным значением и обеспечивать коррекцию количества питательных веществ. В этом аспекте ПИД-контроллер может находиться в функциональном соединении с насосом для питательных веществ биореактора так, чтобы корректировать количество питательных веществ, подаваемых в биореактор.

За счет использования анализа в режиме реального времени и контроля с обратной связью способы по изобретению могут обеспечивать оптимальное добавление аспарагина для целевой клеточной линии и/или представляющего интерес полипептида. Это означает, что способ по настоящему изобретению способен обеспечивать оптимальное добавление аспарагина в клеточную культуру, минимизируя при этом количество побочных продуктов клеточного культивирования, включая вредные побочные продукты клеточного культивирования.

Клеточная культуральная среда.

Термины "клеточная культуральная среда" и "культуральная среда" относятся к раствору питательных веществ, используемому для выращивания клеток, например эукариотических клеток, который, как правило, обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как углеводный источник энергии, незаменимые (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и заменимые (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин) аминокислоты, следовые элементы, источники энергии, липиды, витамины и т.д. Клеточная культуральная среда может содержать экстракты, например сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые обеспечивают исходные материалы, которые поддерживают клеточный рост. Среда может содержать дрожжевые или соевые экстракты вместо экстрактов животного происхождения. Химически определенная среда относится к клеточной культуральной среде, в которой известны все химические компоненты (т.е. они имеют известную химическую структуру). В общем случае химически определенная среда не содержит компонентов животного происхождения, таких как сывороточные или животные пептоны, и дрожжевых или соевых экстрактов. В одном варианте осуществления среда представляет собой химически определенную среду.

Среда также может содержать компоненты, которые повышают рост и/или выживаемость выше минимального уровня, включая гормоны и факторы роста. Среда предпочтительно составлена до pH и концентрации солей, оптимальных для выживания и пролиферации клеток.

В определенных аспектах клеточная культуральная среда может быть бессывороточной. Слово "бессывороточная" применимо к клеточной культуральной среде, которая не содержит животной сыворотки, такой как фетальная бычья сыворотка. Бессывороточная среда может содержать ≤ 16 г/л гидролизатов, таких как соевый гидролизат. В настоящем изобретении также предложена химически определенная среда, которая не только является бессывороточной, но также не содержит гидролизаты. Выражение "не содержит гидролизаты" применимо к клеточной культуральной среде, которая не содержит гидролизаты экзогенного белка, такие как гидролизаты животного или растительного белка, такие как, например,

пептоны, триптоны и т.п.

"Базовая среда" представляет собой исходную среду (например, присутствующую в посевной системе и/или в день 0 получения клеточной культуры), в которой размножают клетки, и содержит все необходимые питательные вещества, которые включают базовую смесь аминокислот. Различные рецептуры (т.е. составы) базовых сред можно производить или приобретать в коммерчески доступных партиях. Аналогично, "базовая подпиточная среда" содержит смеси дополнительных питательных веществ, которые обычно потребляются во время производственного культивирования и используются в схеме подпитки (для так называемого культивирования "с периодической подпиткой"). Различные базовые подпиточные среды являются коммерчески доступными. "Подпитка" включает запланированное добавление или добавление в среду через регулярные интервалы, например в соответствии с протоколом, включая систему культивирования с непрерывной подпиткой, как в хемостате (смотрите С. Altamirano et al., *Biotechnol Prog.* 2001 November-December; 17(6):1032-41), или в соответствии с процессом с периодической подпиткой (Y.M. Huang et al., *Biotechnol. Prog.* 2010 September-October; 26(5):1400-10). Например, культуру можно подпитывать один раз в день, через день, каждые три дня или можно подпитывать, когда концентрация конкретного компонента среды, мониторинг которого проводят, выходит за пределы необходимого диапазона.

Без каких-либо ограничений, данное изобретение можно практически реализовать с любой одной или более из ряда базовых сред или их комбинаций. Базовые среды в общем случае известны в данной области техники и включают, помимо прочего, среду Игла MEME (минимальная питательная среда) (Eagle, *Science*, 1955, 112(3168):501-504), среду Хэма F12 (Ham, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1965, 53:288-293), среду F-12 К, среду Дульбекко, среду Игла в модификации Дульбекко (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1952 August; 38(8): 747-752), DMEM/среду Хэма F12 1:1, среду Тройэлла T8, A2 (Holmes and Wolf, *Biochem. Biochem. Cytol.*, 1961, 10:389-401), среду Веймаута (Davidson and Waymouth, *Biochem. J.*, 1945, 39(2):188-199), среду Вильямса E (William's et al., *Exp. Cell Res.*, 1971, 69:105 et seq.), RPMI 1640 (Moore et al., *J. Amer. Med. Assoc.*, 1967, 199:519-524), среду MCD8 104/110 (Bettger et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1981, 78(9):5588-5592), среду Ventrex HL-1, альбумин-глобулиновую среду (Org et al., *Appl. Microbiol.*, 1973, 25(1):49-54), среду RPMI-1640, среду RPMI-1641, среду Дульбекко в модификации Искова, среду МакКоя 5 А, среду Лейбовица L-15 и бессывороточные среды, такие как EX-CELL™ серии 300 (JRH Biosciences, Lenexa, Kans.), протамин-цинк-инсулиновую среду (Weiss et al., 1974, патент США № 4072565), биотин-фолатную среду (Cartaya, 1978, US Re30985), среду с трансферрином и жирными кислотами (Baker, 1982, патент США № 4560655), среду с трансферрином-EGF (Hasegawa, 1982, патент США № 4615977; Chesseebeuf, 1984, патент США № 4786599) и другие комбинированные среды (см. Inlow, патент США № 6048728; Drapeau, патент США № 7294484; Mather, патент США № 5122469; Furukawa, патент США № 5976833; Chen, патент США № 6180401; Chen, патент США № 5856179; Etcheverry, патент США № 5705364; Etcheverry, патент США № 7666416; Ryll, патент США № 6528286; Singh, патент США № 6924124; Luan, патент США № 7429491 и т.п.).

Клеточную культуральную среду также можно подпитывать периодически (как в так называемых культурах "с периодической подпиткой") с дополнительными ингредиентами, такими как полиамины, или без них, или повышенными концентрациями соединений, таких как аминокислоты, соли, сахара, витамины, гормоны, факторы роста, буферы, антибиотики, липиды, следовые элементы и т.п., в зависимости от требований подлежащих культивированию клеток или необходимых параметров клеточного культивирования.

В определенных аспектах может происходить истощение клеточной культуральной среды в отношении аминокислот во время выработки рекомбинантного белка, при этом дополнительное добавление аминокислот не обеспечивают, или же истощение клеточной культуральной среды может "не происходить", когда обеспечивают восполнение истощенных аминокислот (как описано ниже).

В одном варианте осуществления среда дополнительно содержит 100±15 мкМ орнитина, или 300±45 мкМ орнитина, или 600±90 мкМ орнитина, или даже 900±135 мкМ орнитина. В другом варианте осуществления среда содержит по меньшей мере около 29±1 мкМ орнитина, или по меньшей мере около 59±12 мкМ орнитина, 80±13 мкМ орнитина, или по меньшей мере около 296±44 мкМ орнитина, или по меньшей мере около 593±89 мкМ орнитина, или по меньшей мере около 889±133 мкМ орнитина.

В пополняемую среду можно необязательно добавлять путресцин. Путресцин был включен в низких концентрациях например 0,01-120 мг/л, как компонент в некоторых составах клеточных культуральных сред; смотрите, например, WO 2005/028626, где описано 0,02-0,08 мг/л путресцина; патент США № 5426699 (0,08 мг/л); патент США № RE30985 (0,16 мг/л); патент США № 5811299 (0,27 мг/л); патент США № 5122469 (0,5635 мг/л); патент США № 5063157 (1 мг/л); WO 2008/154014 (~10082 М - ~1000 мкМ); заявка на патент США № 2007/0212770 (0,5-30 мг/л полиамина; 2 мг/л путресцина; 2 мг/л путресцина+2 мг/л орнитина; 2 мг/л путресцина+10 мг/л орнитина).

В некоторых вариантах осуществления в клеточную культуральную среду дополнительно добавляют комбинацию орнитина и путресцина, при этом путресцин может находиться в концентрации по меньшей мере от около 150 до 720 мкМ. В некоторых вариантах осуществления в среду дополнительно

добавляют путресци в концентрации от около 170 до 230 мкМ. В одном варианте осуществления среда содержит 200 ± 30 мкМ путресцина в дополнение к $\geq 90 \pm 15$ мкМ орнитина. В одном варианте осуществления среда содержит $\leq 186 \pm 28$ мкМ путресцина в дополнение к $\leq 89 \pm 13$ мкМ орнитина. В другом варианте осуществления среда содержит $\geq 186 \pm 28$ мкМ путресцина в дополнение к $\geq 89 \pm 13$ мкМ орнитина. (См. международную публикацию № WO 2014/144198 A1, опубликованную 18 сентября 2014 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.)

В других вариантах осуществления орнитин присутствует в среде в концентрации в диапазоне от $0,09 \pm 0,014$ до $0,9 \pm 0,14$ мМ, например $0,09 \pm 0,014$ мМ, $0,3 \pm 0,05$ мМ, $0,6 \pm 0,09$ мМ или $0,9 \pm 0,14$ мМ орнитина. В некоторых вариантах осуществления среда также содержит по меньшей мере $0,20 \pm 0,03$ мМ путресцина. В некоторых вариантах осуществления дополнительный путресцин находится в концентрации в диапазоне от $0,20 \pm 0,03$ до $0,714 \pm 0,11$ мМ, например $0,20 \pm 0,03$ мМ, $0,35 \pm 0,06$ или $0,714 \pm 0,11$ мМ путресцина.

В других вариантах осуществления в среду можно добавлять таурин в концентрации (выраженной в миллимолях на литр) по меньшей мере около 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мМ.

В культуральную среду можно добавлять различные другие добавки, которые известны специалисту в данной области техники для дополнительного определения соответствующих условий. В определенных вариантах осуществления добавка может представлять собой добавку аспарагина, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в среду добавляют смесь аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина, лизина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, валина, аргинина, гистидина, аспарагина, глутамина, аланина, изолейцина, лейцина, метионина, тирозина и триптофана, с целью предотвращения истощения или по мере необходимости дополнительных питательных веществ (т.е. общая подпитка).

В одном варианте осуществления в среду дополнительно добавляют от около 170 до 175 мкМ нуклеозидов. В одном варианте осуществления среда содержит производные пурина в общей концентрации по меньшей мере 40 мкМ, по меньшей мере 45 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 55 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ, по меньшей мере 65 мкМ, по меньшей мере 70 мкМ, по меньшей мере 75 мкМ, по меньшей мере 80 мкМ, по меньшей мере 85 мкМ, по меньшей мере 90 мкМ, по меньшей мере 95 мкМ, по меньшей мере 100 мкМ или по меньшей мере 105 мкМ. В одном варианте осуществления среда содержит от около 100 мкМ до 110 мкМ производных пурина. Производные пурина включают гипоксантин и нуклеозиды аденозин и гуанозин. В одном варианте осуществления среда содержит производные пиримидина в общей концентрации по меньшей мере 30 мкМ, по меньшей мере 35 мкМ, по меньшей мере 40 мкМ, по меньшей мере 45 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 55 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ или по меньшей мере 65 мкМ. В одном варианте осуществления среда содержит от около 65 до 75 мкМ производных пиримидина. Производные пиримидина включают нуклеозиды тимидин, уридин и цитидин. В конкретном варианте осуществления среда содержит аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

В дополнение к включению любых из вышеуказанных добавок, в одном варианте осуществления в среду дополнительно добавляют микромолярные количества жирных кислот (или производных жирных кислот) и токоферол. В одном варианте осуществления жирные кислоты включают любые одну или более из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, тиоктовой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, декановой кислоты, додекановой кислоты, гексановой кислоты, лигноцеридиновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты. В одном варианте осуществления среда содержит токоферол, линолеовую кислоту и тиоктовую кислоту.

В одном варианте осуществления в среду также можно дополнительно добавлять смесь витаминов, которая содержит другие питательные вещества и незаменимые питательные вещества, в общей концентрации по меньшей мере около 700 мкМ или по меньшей мере около 2 мМ. В одном варианте осуществления смесь витаминов содержит одно или более из D-биотина, хлорида холина, фолиевой кислоты, миоинозита, ниацинамида, пиридоксин-HCl, D-пантотеновой кислоты (геми-Са), рибофлавина, тиамин-HCl, витамина B12 и т.п. В одном варианте осуществления смесь витаминов содержит все из D-биотина, хлорида холина, фолиевой кислоты, миоинозита, ниацинамида, пиридоксин-HCl, D-пантотеновой кислоты (геми-Са), рибофлавина, тиамин-HCl и витамина B12.

В конкретном варианте осуществления клеточная культуральная среда может быть химически определена и может содержать: смеси аминокислот, обсуждаемые в данном документе, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KCl; MgSO_4 ; NaCl; Na_2HPO_4 или другие фосфатные соли; пируват; D-биотин; хлорид холина; фолиевую кислоту; миоинозит; ниацинамид; пиридоксин-HCl; D-пантотеновую кислоту; рибофлавин; тиамин-HCl; витамин B12; p-аминобензойную кислоту; этаноламин-HCl; полоксамер 188; DL- α -токоферола фосфат; линолеовую кислоту; Na_2SeO_3 ; тиоктовую кислоту; один или более буферов и глюкозу; и необязательно аденозин; гуанозин; цитидин; уридин; тимидин; и гипоксантин 2Na.

В одном варианте осуществления начальная осмоляльность среды по изобретению составляет 200-

500, 250-400, 275-350 или около 300 мОсм. Во время роста клеток в среде по изобретению и, в частности, после какой-либо подпитки в соответствии с протоколом периодической подпитки, осмоляльность культуры может повышаться до около 350, 400, 450, 500 или до около 550 мОсм.

В некоторых вариантах осуществления, в которых осмоляльность среды составляет менее чем около 300, осмоляльность можно корректировать до около 300 добавлением одной или более солей в избытке относительно указанного количества. В одном варианте осуществления осмоляльность повышают до необходимого уровня путем добавления одного или более осмолитов, выбранных из хлорида натрия, хлорида калия, соли магния, соли кальция, соли аминокислоты, соли жирной кислоты, бикарбоната натрия, карбоната натрия, карбоната калия, хелатора, который представляет собой соль, сахара (например, галактозы, глюкозы, сахарозы, фруктозы, фукозы и т.д.) и их комбинации. В одном варианте осуществления осмолит добавляют в концентрации, выше его концентрации в компоненте, уже присутствующем в определенной среде (например, сахар добавляют в концентрации, выше концентрации, указанной для сахарного компонента).

Клеточная культура.

В одном аспекте изобретения предложена клеточная культура, содержащая клеточную линию, экспрессирующую представляющий интерес рекомбинантный белок в культуре с добавлением аспарагина, как описано в данном документе. Примеры клеточных линий, которые обычно используют для получения рекомбинантных белков, включают, помимо прочего, первичные клетки, клетки BSC, клетки HeLa, клетки HepG2, клетки LLC-MK, клетки CV-1, клетки COS, клетки VERO, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки CRFK, клетки RAF, клетки RK, клетки TCMK-1, клетки LLCPK, клетки PK15, клетки LLC-RK, клетки MDOK, клетки BHK, клетки BHK-21, клетки CHO, клетки CHO-K1, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки 3T3, клетки 293, клетки Per.C6 и клетки куриных эмбрионов. В одном варианте осуществления клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO или один или более из нескольких конкретных вариантов CHO, оптимизированных для крупномасштабного получения белка, например CHO-K1.

Другой аспект изобретения относится к способам культивирования клеток с применением добавления аспарагина, как описано в данном документе, при этом применение такого добавления аспарагина усиливает рост эукариотических клеток, в то же время улучшая титр одного или более представляющих интерес рекомбинантных белков в таких клетках и поддерживая жизнеспособность клеток, в частности за счет применения на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и/или на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, по сравнению с аналогичным способом с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В некоторых аспектах титр рекомбинантного белка улучшен по сравнению с клетками, выращиваемыми с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В некоторых вариантах осуществления титр белка, получаемый в клеточной культуре, выращиваемой с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, является по меньшей мере на около 4%, по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 6%, по меньшей мере на около 7%, по меньшей мере на около 8%, по меньшей мере на около 9%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 11%, по меньшей мере на около 12%, по меньшей мере на около 13%, по меньшей мере на около 14%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 16%, по меньшей мере на около 17%, по меньшей мере на около 18%, по меньшей мере на около 19%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 21%, по меньшей мере на около 22% большим, по меньшей мере на около 23% большим, по меньшей мере на около 24% большим, по меньшей мере на около 25% большим, по меньшей мере на около 26% большим, по меньшей мере на около 27% большим, по меньшей мере на около 28% большим или по меньшей мере на около 29% большим, чем титр (выход) белка в клетках, выращиваемых с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В некоторых вариантах осуществления титр белка, получаемый в клеточной культуре с добавлением аспарагина по изобретению, превышает титр аналогичных или идентичных клеток, культивируемых с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В некоторых аспектах происходит улучшение клеточного роста (например, скорости удвоения), плотности жизнеспособных клеток, жизнеспособности клеток и их комбинаций по сравнению с клетками, выращиваемыми с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В некоторых вариантах осуществления скорость удвоения количества жизнеспособных клеток, культивируемых с добавлением аспарагина по изобретению, является по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, по меньшей мере на 13%,

по меньшей мере на 14%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 16%, по меньшей мере на 17%, по меньшей мере на 18%, по меньшей мере на 19%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 21%, по меньшей мере на 22%, по меньшей мере на 23%, по меньшей мере на 24%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 26%, по меньшей мере на 27%, по меньшей мере на 28%, по меньшей мере на 29%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере в 3 раза большей, чем скорость удвоения количества клеток, культивируемых с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В некоторых вариантах осуществления скорость удвоения количества жизнеспособных клеток, культивируемых с добавлением аспарагина по изобретению, является на около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30% большей, чем скорость удвоения количества жизнеспособных клеток, культивируемых с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В некоторых вариантах осуществления время удвоения количества активно циркулирующих клеток млекопитающего составляет менее чем 30 ч, менее чем 29 ч, менее чем 28 ч, менее чем 27 ч, менее чем 26 ч, менее чем 25 ч, менее чем 24 ч, менее чем 23 ч, менее чем 22 ч, менее чем 21 ч, менее чем 20 ч, менее чем 19 ч или менее чем 18 ч при культивировании с добавлением аспарагина по изобретению по сравнению с клеткой, культивируемой с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В некоторых вариантах осуществления время удвоения количества активно растущих клеток млекопитающего составляет менее чем 28 ч при культивировании с добавлением аспарагина по изобретению по сравнению с клеткой, культивируемой с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В некоторых вариантах осуществления время удвоения количества клеток млекопитающего составляет около 27 ± 1 ч, около 26 ± 1 ч, около 25 ± 1 ч, около 24 ± 1 ч, около 23 ± 1 ч, около 22 ± 1 ч или около 21 ± 1 ч при культивировании с добавлением аспарагина по изобретению по сравнению с клеткой, культивируемой с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В некоторых вариантах осуществления время удвоения количества активно циркулирующих клеток млекопитающего составляет около 24 ± 1 ч при культивировании с добавлением аспарагина по изобретению по сравнению с клетками, культивируемыми с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой. В некоторых вариантах осуществления время удвоения количества активно делящихся клеток при культивировании с добавлением аспарагина по изобретению является по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 16%, по меньшей мере на 17%, по меньшей мере на 18%, по меньшей мере на 19%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 25% меньшим, чем время удвоения количества активно циркулирующих клеток, культивируемых с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В отношении жизнеспособности клеток, клетки, культивируемые с добавлением аспарагина по изобретению, демонстрируют жизнеспособность, которая является по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере в 3 раза большей, чем жизнеспособность клеток, культивируемых с более низким количеством добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В производственном культуральном сосуде или биореакторе базовую культуральную среду и клетки помещают в культуральный сосуд после фазы посевной культуры или роста. В определенных вариантах осуществления клеточный супернатант или клеточный лизат собирают после производственного культивирования. В других вариантах осуществления представляющий интерес полипептид или белок выделяют из культуральной среды или клеточного лизата, или чего-либо еще, в зависимости от локализации представляющего интерес белка, используя технологии, хорошо известные в данной области техники.

"Клеточная линия" относится к клетке или клетками, которые получены из конкретной линии дифференцировки посредством серийного пассирования или субкультивирования клеток. Термин "клетки" используют взаимозаменяемо с термином "клеточная популяция".

Термин "клетка" включает любую клетку, которая подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки эукариот, такие как клетки отличных от человека животных, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки птиц, клетки насекомых, клетки дрожжей или клеточные слияния, такие как, например, гибридомы или квадromы. В определенных вари-

антах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления клетка выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетка сетчатки, Vero, CV1, клетка почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцит, например, Jurkat (Т-лимфоцит) или Daudi (В-лимфоцит), A431 (эпидермальная), CV-1, U937, 3T3, клетка L, клетка C127, SP2/0, NS-0, клетка ММТ, стволовая клетка, опухолевая клетка, и клеточной линии, полученной из вышеупомянутых клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6®). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO K1.

В фазе выработки рекомбинантного белка "клеточная культура с периодической подпиткой" или "культура с периодической подпиткой" относится к периодической культуре, в которой в культуральный сосуд сначала добавляют клетки животных и культуральную среду и осуществляют медленную подпитку культуры дополнительными культуральными питательными веществами, непрерывно или отдельными шагами, во время культивирования, с периодическим сбором клеток и/или продукта или без него, перед окончанием культивирования. Культура с периодической подпиткой включает "полунепрерывную культуру с периодической подпиткой", когда периодически удаляют всю культуру (которая может содержать клетки и среду) и заменяют свежей средой. Культура с периодической подпиткой отличается от просто "периодической культуры", в которой все компоненты для культивирования клеток (включая клетки животных и культуральные питательные вещества) вносят в культуральный сосуд в начале процесса культивирования в периодической культуре. Культура с периодической подпиткой может дополнительно отличаться от перфузионного культивирования при условии, что супернатант не удаляют из культурального сосуда во время процесса, тогда как при перфузионном культивировании клетки ограничивают в культуре посредством, например, фильтрации, а культуральную среду непрерывно или периодически вносят в культуральный сосуд и удаляют из него. При этом предусмотрено изъятие образцов в целях исследования во время клеточного культивирования с периодической подпиткой. Процесс с периодической подпиткой продолжают до определения достижения максимальных рабочего объема и/или выработки белка.

В контексте данного документа выражение "непрерывная клеточная культура" относится к методике, используемой для непрерывного выращивания клеток, обычно в конкретной фазе роста. Например, если необходимо постоянное внесение клеток или необходима выработка конкретного представляющего интерес полипептида или белка, клеточную культуру может быть необходимо поддерживать в конкретной фазе роста. Таким образом, условия необходимо постоянно мониторить и соответственно корректировать с целью поддержания клеток в этой конкретной фазе.

Один аспект изобретения относится к производственной клеточной культуре с периодической подпиткой, в которой вырабатывается и собирается белок. Перед продуктивной фазой, как правило, идет фаза роста (также известная как посевная система или посевная культура), в которой все компоненты клеточного культивирования вносят в культуральный сосуд в начале процесса культивирования, а затем клеточную популяцию размножают до готовности для производственного масштаба. Следовательно, культуральный сосуд инокулируют клетками при подходящей плотности посева для начального клеточного роста в зависимости от начальной клеточной линии. В некоторых аспектах добавление аспарагина по изобретению можно использовать с производственной клеточной культурой с периодической подпиткой, как дополнительно описано в данном документе.

Культуральные сосуды включают, но не ограничиваются этим, луночные планшеты, Т-колбы, шейкерные колбы, сосуды с перемешиванием, вращающиеся колбы, полое волокно, эрлифтные биореакторы и т.п. Подходящим клеточным культуральным сосудом является биореактор. Биореактор относится к любому культуральному сосуду, который изготовлен или сконструирован для управления или контроля условий окружающей среды. Такие культуральные сосуды хорошо известны в данной области техники.

Процессы и системы с использованием биореакторов были разработаны для оптимизации газообмена, подачи достаточного количества кислорода для поддержания роста и продуктивности клеток и для удаления CO₂. Поддержание эффективности газообмена является важным критерием для гарантии успешного масштабирования клеточной культуры и выработки белка. Такие системы хорошо известны специалисту в данной области техники.

В одном варианте осуществления среду добавляют через определенные интервалы во время клеточного культивирования в соответствии с процессом с периодической подпиткой. Культивирование с периодической подпиткой в общем случае известно в данной области техники и применяется для оптимизации получения белка (см. Y.M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* 2010 September-October; 26(5):1400-10). Процессы с периодической подпиткой, как правило, используют во время продуктивной фазы.

Дополнительную подпитку можно проводить так, чтобы она включала дополнительные питательные вещества, такие как витамины, аминокислоты и другие питательные вещества, описанные выше в данном документе, через интервалы с частотой каждый день или каждые 2-3 дня в течение производст-

венного культивирования. Дополнительную подпитку можно проводить (добавляют дополненную среду, содержащую питательные вещества) по меньшей мере 2 раза или по меньшей мере 8 раз в течение производственного культивирования для 2-недельной или более культуры. В другом варианте осуществления дополнительную подпитку можно проводить каждый день в течение культивирования. Также предусмотрены альтернативные схемы подпитки культуры.

Добавление дополнительных аминокислот также можно проводить для обеспечения неистощенной среды, при этом истощенные аминокислоты определяют в соответствии со способами, известными в данной области техники и описанными в данном документе. При применении этой схемы дополнительные аминокислоты пополняют или добавляют через интервалы, предпочтительно с частотой каждый день или каждые 2-3 дня в течение производственного культивирования, в зависимости от определения истощения аминокислот. В одном варианте осуществления смесь дополнительных аминокислот для поддержания неистощенной клеточной культуральной среды добавляют в культуру в или примерно в день 1, в или примерно в день 2, в или примерно в день 3, в или примерно в день 4, в или примерно в день 5, в или примерно в день 6, в или примерно в день 7, в или примерно в день 8, в или примерно в день 9, в или примерно в день 10, в или примерно в день 11, в или примерно в день 12, в или примерно в день 13 и в или примерно в день 14 для 2-недельной или более культуры. Также предусмотрены альтернативные схемы подпитки культуры.

Эукариотические клетки, такие как клетки СНО, можно культивировать в мелкомасштабных культурах, например в 125 мл контейнерах, содержащих около 25 мл среды, 250 мл контейнерах, содержащих от около 50 до 100 мл среды, 250 мл контейнерах, содержащих от около 150 до 240 мл среды, 500 мл контейнерах, содержащих от около 100 до 200 мл среды. В альтернативном варианте культуры могут быть крупномасштабными, например в 1000 мл контейнерах, содержащих от около 300 до 1000 мл среды, 3000 мл контейнерах, содержащих от около 500 до 3000 мл среды, 8000 мл контейнерах, содержащих от около 2000 до 8000 мл среды, и 15000 мл контейнерах, содержащих около от 4000 до 15000 мл среды. Культуры для производства могут содержать 10000 л среды или более. Крупномасштабные клеточные культуры, например для клинического производства белковых терапевтических средств, как правило, поддерживают в течение дней или даже недель, пока клетки вырабатывают необходимый(е) белок(ки). В течение этого времени культуру можно дополнять концентрированной подпиточной средой, содержащей компоненты, такие как питательные вещества и аминокислоты, которые потребляются во время культивирования. Концентрированная подпиточная среда может быть основана на любом составе клеточной культуральной среды. Такая концентрированная подпиточная среда может содержать большинство компонентов клеточной культуральной среды на уровне, например, около 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 12×, 14×, 16×, 20×, 30×, 50×, 100×, 200×, 400×, 600×, 800× или даже около 1000× от их нормального применяемого количества. Концентрированные подпиточные среды часто используют в процессах культивирования с периодической подпиткой.

В некоторых вариантах осуществления в клеточную культуру можно дополнительно добавлять "добавки по необходимости", также известные как добавки, ингредиенты по необходимости или химические вещества по необходимости, во время роста клеток или выработки белка. Добавки по необходимости включают любые один или более факторов роста или других белков, буфер, источник энергии, соль, аминокислоту, металл и хелатор. Другие белки включают трансферрин и альбумин. Факторы роста, которые включают цитокины и хемокины, в общем случае известны в данной области техники как стимулирующие рост клеток или, в некоторых случаях, дифференцировку клеток. Фактор роста обычно представляет собой белок (например, инсулин), небольшой пептид или стероидный гормон, такой как эстроген, ДНЕА, тестостерон и т.п. В некоторых случаях фактор роста может представлять собой неприродное химическое вещество, которое способствует пролиферации клеток или выработке белка, такое как, например, тетрагидрофолат (ТНФ), метотрексат и т.п. Неограничивающие примеры белковых и пептидных факторов роста включают ангиопоэтины, костные морфогенетические белки (BMP), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста и дифференцировки 9 (GDF9), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста из гепатомы (HDGF), инсулин, инсулиноподобный фактор роста (IGF), стимулирующий миграцию фактор, миостатин (GDF-8), фактор роста нервов (NGF) и другие нейротрофины, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), тромбопоэтин (TPO), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), фактор некроза опухолей альфа (TNF- α), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), агонистов сигнального пути wnt, плацентарный фактор роста (PIGF), фетальный бычий соматотропин (FBS), интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 и т.п. В одном варианте осуществления в клеточную культуральную среду по необходимости добавляют дополнительный фактор роста инсулин. В одном варианте осуществления концентрация инсулина в среде, т.е. количество инсулина в клеточной культуральной среде после добавления, составляет от около 0,1 до 10 мкМ.

Буферы в общем случае известны в данной области техники. Данное изобретение не ограничено каким-либо конкретным буфером или буферами, при этом любой специалист в данной области техники может выбрать подходящие буфер или буферную систему для применения с конкретной клеточной линией, вырабатывающей конкретный белок. В одном варианте осуществления добавочный буфер по необходимости представляет собой NaHCO_3 . В другом варианте осуществления буфер представляет собой ГЭПЭС. В других вариантах осуществления добавочный буфер по необходимости содержит как NaHCO_3 , так и ГЭПЭС.

Источники энергии для применения в качестве добавки по необходимости в клеточной культуре также хорошо известны в данной области техники. Без ограничения, в одном варианте осуществления добавляемый по необходимости источник энергии представляет собой глюкозу. С учетом конкретных и специфических требований конкретной клеточной линии и вырабатываемого белка, в одном варианте осуществления глюкозу можно добавлять в концентрации от около 1 до 20 мМ в среде. В некоторых случаях глюкозу можно добавлять на высоких уровнях 20 г/л или выше.

Хелаторы также хорошо известны в области клеточного культивирования и получения белка. Дигидрат тетранатрия ЭДТА и цитрат представляют собой два общепринятых хелатора, используемых в данной области техники, хотя при практической реализации этого изобретения можно применять другие хелаторы. В одном варианте осуществления добавочный хелатор по необходимости представляет собой дигидрат тетранатрия ЭДТА. В одном варианте осуществления добавочный хелатор по необходимости представляет собой цитрат, такой как $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.

В одном варианте осуществления в клеточную культуральную среду по необходимости можно добавлять одну или более добавочных аминокислот в качестве источника энергии, таких как, например, глутамин. В одном варианте осуществления в клеточную культуральную среду по необходимости добавляют глутамин в конечной концентрации от около 1 до 13 мМ.

Другие добавки по необходимости включают одну или более солей различных металлов, таких как соли железа, никеля, цинка и меди. В одном варианте осуществления в клеточную культуральную среду добавляют одно или более из сульфата меди, сульфата цинка, хлорида железа и сульфата никеля.

Выработка белка.

В определенных аспектах в настоящем изобретении предложены способы улучшения производительности клеточного культивирования, включая улучшение титра рекомбинантного белка, при получении рекомбинантного белка путем культивирования эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления эукариотические клетки содержат стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок. В других вариантах осуществления способы по изобретению обеспечивают улучшение клеточного роста (например, скорости удвоения), плотности жизнеспособных клеток, жизнеспособности клеток и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению включают проведение добавления аспарагина по изобретению; культивирование эукариотических клеток с добавлением аспарагина; экспрессию представляющего интерес рекомбинантного белка из эукариотических клеток и получение более высокого титра рекомбинантного белка из эукариотических клеток, культивируемых с добавлением аспарагина, по сравнению с аналогичными или идентичными эукариотическими клетками, культивируемыми с более низким количеством добавляемого аспарагина или без добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В некоторых вариантах осуществления выход или титр вырабатываемого белка, который можно выражать в граммах белкового продукта на литр культуральной среды, из клеток, культивируемых с добавлением аспарагина по изобретению, составляет по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 1 г/л, по меньшей мере 1,2 г/л, по меньшей мере 1,4 г/л, по меньшей мере 1,6 г/л, по меньшей мере 1,8 г/л, по меньшей мере 2 г/л, по меньшей мере 2,5 г/л, по меньшей мере 3 г/л, по меньшей мере, 3,5 г/л, по меньшей мере 4 г/л, по меньшей мере 4,5 г/л, по меньшей мере 5 г/л, по меньшей мере 5,5 г/л, по меньшей мере 6 г/л, по меньшей мере 6,5 г/л, по меньшей мере 7 г/л, по меньшей мере 7,5 г/л, по меньшей мере 8 г/л, по меньшей мере 8,5 г/л, по меньшей мере 9 г/л, по меньшей мере 9,5 г/л, по меньшей мере 10 г/л, по меньшей мере 15 г/л или по меньшей мере 20 г/л.

В некоторых вариантах осуществления титр белка, получаемого из клеток, культивируемых с добавлением аспарагина по изобретению, является по меньшей мере на около 2%, по меньшей мере на около 3%, по меньшей мере на около 4%, по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 6%, по меньшей мере на около 7%, по меньшей мере на около 8%, по меньшей мере на около 9%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 11%, по меньшей мере на около 12%, по меньшей мере на около 13%, по меньшей мере на около 14%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 16%, по меньшей мере на около 17%, по меньшей мере на около 18%, по меньшей мере на около 19%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 21%, по меньшей мере на около 22%, по меньшей мере на около 23% большим, по меньшей мере на около 24% большим, по меньшей мере на около 25% большим, по меньшей мере на около 26% большим, по меньшей мере на около 27% большим, по меньшей мере на около 28% большим или по меньшей мере на около 29% большим, чем титр (выход) для аналогичных или идентичных клеток, культивируемых с

более низким количеством добавляемого аспарагина или без добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

В некоторых вариантах осуществления титр (выход) белка для клеток млекопитающего, культивируемых с добавлением аспарагина по изобретению, является по меньшей мере на 100 мг/л, по меньшей мере на 0,5 г/л, по меньшей мере на 1 г/л, по меньшей мере на 1,2 г/л, по меньшей мере на 1,4 г/л, по меньшей мере на 1,6 г/л, по меньшей мере на 1,8 г/л, по меньшей мере на 2 г/л, по меньшей мере на 2,5 г/л большим, чем титр белка для аналогичных или идентичных клеток, культивируемых с более низким количеством добавляемого аспарагина или без добавляемого аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

Способы по изобретению применимы для улучшения получения белка посредством процессов клеточного культивирования. Клеточные линии, используемые в изобретении, можно генетически конструировать для экспрессии рекомбинантного белка, представляющего коммерческий или научный интерес. Генетическое конструирование клеточных линий включает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток рекомбинантной полинуклеотидной молекулой или иное изменение (например, посредством гомологичной рекомбинации и геной активации или слияния рекомбинантной клетки с нереконбинантной клеткой), направленное на то, чтобы клетка-хозяин экспрессировала необходимый рекомбинантный полипептид. Способы генетического конструирования клеток или клеточных линий для экспрессии представляющего интерес полипептида хорошо известны специалистам в данной области техники; например, различные технологии 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, p. 15-69. Обширный выбор клеточных линий, подходящих для роста в культуре, доступен от Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния) и коммерческих поставщиков.

В некоторых вариантах осуществления белковый продукт (представляющий интерес белок) представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')₂, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3, антитело IgG4 или их комбинации. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к белку запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела к PD1, описанного в публикации заявки на патент США № US 2015/0203579 A1), антитела к лиганду белка запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела к PD-L1, описанного в публикации заявки на патент США № US 2015/0203580 A1), антитела к DИ4, антитела к ангиопоэтину-2 (например, антитела к ANG2, описанного в патенте США № 9402898), антитела к подобному ангиопоэтину белку 3 (например, антитела к AngPt13, описанного в патенте США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитела к PDGFR, описанного в патенте США № 9265827), антитела к Erb3, антитела к рецептору пролактина (например, антитела к PRLR, описанного в патенте США № 9302015), антитела к компоненту комплемента 5 (например, антитела к C5, описанного в публикации заявки на патент США № US 2015/0313194 A1), антитела к TNF, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитела к EGFR, описанного в патенте США № 9132192, или антитела к EGFRvIII, описанного в публикации заявки на патент США № US 2015/0259423 A1), антитела к пропротеиновой конвертазе субтилизин/кексин 9 (например, антитела к PCSK9, описанного в патенте США № 8062640 и публикации заявки на патент США № US 2014/0044730 A1), антитела к фактору роста и дифференцировки 8 (например, антитела к GDF8, также известного как антитело к миостатину, описанного в патентах США № 8871209 или 9260515), антитела к Erb3, антитела к глюкогоновому рецептору (например, антитела к GCGR, описанного в публикациях заявок на патент США № US 2015/0337045 A1 или US 2016/0075778 A1), антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитела к IL4R, описанного в публикации заявки на патент США № 8062640 или патентах США № 8735095 или 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, антитела к IL6R, описанного в патентах США № 7582298, 8043617 или 9173880), антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к интерлейкину 33 (например, антитела к IL33, описанного в публикациях заявок на патент США № US2014/0271658A1 или US 2014/0271642 A1), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, антитела к CD3, описанного в публикациях заявок на патент США № US2014/0088295 A1 и US 20150266966 A1, и в заявке США № 62/222605), антитела к кластеру диффе-

ренцировки 20 (например, антитела к CD20, описанного в публикациях заявок на патент США № US 2014/0088295 A1 и US 20150266966 A1 и в патенте США № 7879984), антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, антитела к CD48, описанного в патенте США № 9228014), антитела к Fel d1 (например, описанного в патенте США № 9079948), антитела к вирусу гриппа, антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, антитела к RSV, описанного в публикации заявки на патент США № US 2014/0271653 A1), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу Среднего Востока (например, антитела к MERS-CoV, описанного в публикации заявки на патент США № US 2015/0337029 A1), антитела к вирусу Эбола (например, описанного в публикации заявки на патент США № US 2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к вирусу тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) (например, антитела к SARS-CoV, антитела к COVID-19 (например, антитела к SARS-CoV-2), антитела к гену активации лимфоцитов 3 (например, антитела к LAG3 или антитела к CD223), антитела к фактору роста нервов (например антитела к NGF, описанного в публикации заявки на патент США № US 2016/0017029 и патентах США № 8309088 и 9353176) и антитела к активину А. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела к CD3×CD20 (описанного в публикациях заявок на патент США № US 2014/0088295 A1 и US 20150266966 A1), биспецифического антитела к CD3×муцину 16 (например, биспецифического антитела к CD3×Muc16) и биспецифического антитела к CD3×простатспецифическому мембранному антигену (например, биспецифического антитела к CD3×PSMA). В одном варианте осуществления представляющий интерес белок содержит комбинацию любых из вышеприведенных белков.

В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из антитела к вирусу гриппа, антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, антитела к RSV, описанного в публикации заявки на патент США № US 2014/0271653 A1), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу Среднего Востока (например, антитела к MERS-CoV, описанного в публикации заявки на патент США № US 2015/0337029 A1), антитела к вирусу Эбола (например, описанного в публикации заявки на патент США № US 2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к вирусу тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) (например, антитела к SARS-CoV, антитела к COVID-19 (например, антитела к SARS-CoV-2). В одном варианте осуществления представляющий интерес белок содержит комбинацию любых из вышеприведенных белков.

В одном варианте осуществления представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из алирокумаба, сарилумаба, фасинумаба, несвакумаба, дупилумаба, тревогрумаба, эвинакумаба и ринукумаба. В одном варианте осуществления представляющий интерес белок содержит комбинацию любых из вышеприведенных белков.

В одном варианте осуществления представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, связанного с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следуют домены C_H2 и C_H3 IgG. В некоторых вариантах осуществления рецепторный Fc-слитый белок содержит две или более разных цепей рецептора, которые связываются с одним лигандом или несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc из hIgG1; см. патент США № 6927004, который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки) или ловушку VEGF (например, афлиберцепт или ziv-афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig VEGF-рецептора Flt1, слитый с доменом 3 Ig VEGF-рецептора Flk1, слитым с Fc из hIgG1; см. патенты США № 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или более антигенсвязывающих доменов, таких как вариабельный фрагмент тяжелой цепи и вариабельный фрагмент легкой цепи, антитела, связанного с Fc-фрагментом.

Снова, настоящее изобретение не ограничено конкретным типом клетки для выработки рекомбинантного белка. Примеры типов клеток, подходящих для выработки рекомбинантного белка, включают клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки птиц, клетки бактерий и клетки дрожжей. Клетки могут представлять собой стволовые клетки или рекомбинантные клетки, трансформированные вектором для экспрессии рекомбинантного гена, или клетки, трансфицированные вирусом для выработки вирусных продуктов. Клетки могут содержать рекомбинантную гетерологичную полинуклеотидную конструкцию, которая кодирует представляющий интерес белок. Эта конструкция может представлять собой эписому или же она может быть элементом, который физически интегрирован в геном клетки. Клетки также могут вырабатывать представляющий интерес белок в отсутствие гетерологичной полипептидной конструкции, кодирующей этот белок. Другими словами, клетка может естественным образом кодировать представляющий интерес белок, например, как В-клетка, вырабатывающая антитело. Клетки также могут представлять собой первичные клетки, такие как клетки куриных эмбрионов, или первичные кле-

точные линии.

Примеры применимых клеток включают CHO, COS, клетку сетчатки, Vero, CV1, клетку почки, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцит, A431, CV-1, U937, 3T3, клетку L, клетку C127, SP2/0, NS-0, клетку MMT, стволовую клетку, опухолевую клетку и клеточную линию, полученную из вышеупомянутых клеток. В различных вариантах осуществления клеточная линия представляет собой производное клеток CHO, такое как CHO-K1, CHO DUX B-11, CHO DG-44, Veggie-CHO, GS-CHO, S-CHO, или мутантные линии CHO Ies.

Продуктивную фазу можно проводить при любом масштабе культивирования, от шейкерных колб или мешков wave до 250 мл биореакторов, до однолитровых биореакторов и до крупномасштабных промышленных биореакторов. Аналогично, фазу размножения в посевной системе можно проводить при любом масштабе культивирования, от шейкерных колб или мешков wave до 250 мл биореакторов, до однолитровых или более крупных биореакторов. Крупномасштабный процесс можно проводить в объеме от около 100 до 20000 л или более. Для контроля выработки белка можно использовать один или более показателей, таких как температурный сдвиг или химическая индукция. Фаза роста может происходить при более высокой температуре, чем производственная фаза. Например, фаза роста может происходить при первой температуре от около 35 до 38°C, в производственная фаза может происходить при второй температуре от около 29 до 37°C, необязательно от около 30 до 36°C или от около 30 до 34°C. Кроме того, можно добавлять химически индукторы выработки, такие как кофеин, бутират, тамоксифен, эстроген, тетрациклин, доксициклин и гексаметилен-бис-ацетамид (НМВА), одновременно, до или после температурного сдвига. Если индукторы добавляют после температурного сдвига, их можно добавлять в течение от одного часа до пяти дней после температурного сдвига, например от одного до двух дней после температурного сдвига. Производственные клеточные культуры можно поддерживать в виде культуральной системы с непрерывной подпиткой, как в хемостате (см. С. Altamirano et al., 2001, выше), или в соответствии с процессом с периодической подпиткой (Huang, 2010, выше).

Настоящее изобретение не ограничено по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе, которые предназначены для иллюстрации отдельных аспектов или вариантов осуществления изобретения. Функционально эквивалентные способы и компоненты входят в объем изобретения. Различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данном документе являются очевидными для специалистов в данной области техники из вышеприведенного описания и прилагающихся графических материалов. Такие модификации входят в объем изобретения.

Все публикации, упоминаемые в тексте этого изобретения, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Примеры

Следующие примеры приведены исключительно в иллюстративных целях и не подразумевают ограничения объема изобретения.

Методология культивирования с периодической подпиткой.

Как описано в данном документе, отработку периодической подпитки проводят с помощью автоматизированной 24-полосной системы параллельных биореакторов AMBR250. Высокопроизводительная рабочая станция AMBR250 обеспечивает интегрированный параллельный контроль 24 одноразовых биореакторов. Конкретнее, AMBR250 (24-полосная) представляет собой полностью интегрированную высокопроизводительную систему, которая состоит из 24 биореакторов, каждый с максимальным рабочим объемом 250 мл, с полностью автоматизированным контролем и параллельным проведением процессов клеточного культивирования. Обеспечивается индивидуальный непрерывный контроль и мониторинг для каждого сосуда биореактора, включая температуру, скорость импеллера, pH, растворенный кислород (РК), анализ отработанного газа. Эта система обеспечивает полностью автоматизированные наполнение, инокуляцию, отбор проб и подпитку. В системе используются биореакторы с импеллерами, газоподачей через распределитель или свободное верхнее пространство, зондами pH и РК и до четырех линий подпитки.

При осуществлении разработанной стратегии подпитки по настоящему изобретению биореакторы AMBR250 (Sartorius Stedim) используют с рабочим объемом до 250 мл. Используют собственные химически определенные базовые и подпиточные среды. Подпиточные среды и стратегии подпитки отличаются между клеточными линиями. Подпитку глюкозой осуществляют ежедневно и контролируют уровни на основании целей. Биореакторы инокулируют клеточной культурой. Уровень кислорода поддерживают посредством контроля, при этом во время исследований чистый кислород добавляют через распределитель при разной скорости потока. Аналогично, pH поддерживают посредством контроля с барботированием CO₂ для верхней полосы pH с отсутствием контролируемой нижней полосы pH. Плотность клеток при инокуляции, растворенный кислород, температуру, pH и полосу нечувствительности поддерживают постоянными. Скорость перемешивания и потока для воздуха и кислорода меняют в зависимости от масштаба.

Если не указано иное, во всех примерах используют клеточную линию CHO 1 с высоким потреблением аспарагина, экспрессирующую типовой полипептид А.

Измерение внеклеточных аминокислот.

Как описано в данном документе, можно проводить измерения внеклеточных уровней аминокислот. В определенных вариантах осуществления такие уровни измеряют в соответствии со следующей процедурой. Образцы отработанной клеточной культуральной среды дериватизировали и получали, используя протокол способа Waters AccQ-Tag и набор реагентов Waters AccQ-Tag (Waters, Milford, MA). Образцы разводили 10× и вносили 100 мг/л внутреннего стандарта саркозина перед дериватизацией (Millipore Sigma, Burlington, MA). Разделение дериватизированных аминокислот и последующее измерение проводили, используя систему УВЭЖХ, оснащенную кольчаткой AccQ-Tag Ultra C18 (1,7 мкм, 2,1×10 мм), данные получали на длине волны 260 нм. Подвижные фазы и градиент соответствовали протоколу способа Waters AccQ-Tag.

Измерение внутриклеточных аминокислот.

Как описано в данном документе, можно проводить измерения внутриклеточных уровней аминокислот. В определенных вариантах осуществления такие уровни измеряют в соответствии со следующей процедурой. Клетки собирают из биореакторов и центрифугируют при комнатной температуре, супернатант отделяют от клеточного осадка. Клеточный осадок промывают 1X ФСБ, центрифугируют. ФСБ удаляют, а клеточный осадок подвергают холодному гашению жидким азотом. В образцы для исследования добавляют стабильно меченные внутренние стандарты, экстрагируют и подвергают белковой преципитации органическим растворителем. После центрифугирования аликвоту супернатанта разводят и вводят в ЖХМС/МС систему Agilent 1290/AB Sciex QTrap 5500, оснащенную обращенной-фазовой УВЭЖХ-колоной C18. Масс-спектрометр работает в положительном режиме с использованием ионизации электрораспылением (ИЭР). Площади пиков отдельных родительских ионов анализируют в сравнении с площадями пиков родительских ионов соответствующих внутренних стандартов в псевдо-MRM режиме. Количественную оценку проводят, используя регрессионный анализ методом взвешенных наименьших квадратов, сгенерированный по усиленным калибровочным стандартам, приготовленным непосредственно перед каждым экспериментом. Исходные данные ЖХМС/МС получают и обрабатывают, используя программное обеспечение AB SCIEX Analyst 1.6.2. Уменьшение объема данных проводят, используя Microsoft Excel для Office 365 v.16.

Анализ вариантов по последовательности аспарагина.

Как описано в данном документе, можно проводить измерение вариантов по последовательности аспарагина представляющего интерес полипептида. Хотя можно использовать любой подходящий способ измерения таких вариантов по последовательности, количественный анализ вариантов по последовательности аспарагина можно определить следующим образом. Быстрый и чувствительный анализ на основе ЖХМС, сфокусированный на трех пептидах из ~50 возможных пептидов, можно использовать в качестве инструмента скрининга для идентификации случаев замен и для получения количественной оценки степени замещения. Представляющий интерес полипептид можно очищать в небольшом масштабе, используя соответствующую методологию очистки. Затем представляющий интерес полипептид можно восстанавливать и денатурировать с последующим ферментативным расщеплением. Таким образом можно создавать типичные карты представляющих интерес полипептидов и анализировать белковые последовательности для определения того, существует ли какое-либо отклонение от ожидаемых последовательностей. После этого можно проводить градиентное разделение методом ВЭЖХ и анализировать отдельные пептиды с помощью систему К-ВП МС. Конкретные пептиды можно подробно анализировать методом масс-спектрометрии. Можно анализировать изменения в пептидной последовательности. Например, для замены аспарагина серином наблюдается 27 Да сдвиг.

Пример 1. Влияние аспарагина на клеточную культуру и разработку стратегии подпитки.

Производительность клеточной культуры с периодической подпиткой и стратегию подпитки оценивали, используя типовые клеточные линии СНО и разное количество добавляемого аспарагина. Оценку производительности клеточной культуры с периодической подпиткой и стратегии подпитки можно проводить, используя систему биореакторов AMBR250 и измерения аминокислот, как описано в данном документе.

Как показано на фиг. 3А-3С, в определенных аспектах было обнаружено, что увеличение количества аспарагина на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой приводит к повышению клеточного роста и не оказывает негативного влияния на продуктивность культуры при соблюдении баланса с другими потребностями клеток в питательных веществах. Фиг. 3А иллюстрирует ряд добавлений аспарагина на ранней стадии культивирования с периодической подпиткой с низким, средним и высоким количеством добавок (в диапазоне, например, от около 1,8 до около 5,4 мМ аргинина на подпитку), но такое добавление аспарагина не предотвращает истощение аспарагина на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой. Фиг. 3В иллюстрирует увеличение роста клеточной культуры при увеличении количества добавок аспарагина, тогда как фиг. 3С иллюстрирует повышение титра в клеточной культуре при увеличении количества добавляемого аспарагина до достижения плато в результате истощения некоторых незаменимых аминокислот.

Как показано на фиг. 4А-4С, также было обнаружено, что увеличение количества аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, хотя и повышает образование

побочных продуктов, таких как аммоний, существенно не влияет на продуктивность клеточной культуры. Конкретнее, фиг. 4А иллюстрирует добавление низкого и высокого количества аспарагина во время подпитки на поздних стадиях (в диапазоне от около 1,8 до около 7,2 мМ на подпитку), но такое добавление аспарагина не предотвращает истощение аспарагина на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой. Хотя негативное влияние на общую продуктивность клеточного культивирования отсутствует (фиг. 4С), более высокие количества добавляемого аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой могут приводить к избыточному образованию побочных продуктов (фиг. 4В), что позволяет предположить, что при необходимости клеточную культуру можно подпитывать большим количеством аспарагина, но истощение все еще сложно предотвратить.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения была разработана улучшенная стратегия подпитки путем добавления аспарагина (т.е. "новая платформа подпитки" с 3X аспарагина при ранней периодической подпитке и 1,5X аспарагина при поздней периодической подпитке), которая предотвращает истощение незаменимых аминокислот и аспарагина на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и обеспечивает повышение производительности клеточного культивирования в целом. Как показано на фиг. 5А-5D, добавление аспарагина на ранней стадии культивирования с периодической подпиткой предотвращало истощение аспарагина на ранней стадии культивирования с периодической подпиткой и повышало рост клеточной культуры. Кроме того, как показано, связанное с аспарагином повышение роста клеточной культуры с устранением истощения незаменимых аминокислот улучшало продуктивность клеточного культивирования, при этом было увеличено продуктивное время культивирования с периодической подпиткой, что приводило к более высокому титру. При этом добавление более высокого количества аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой все еще не может предотвратить истощение аспарагина на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой. Как показано на фиг. 5Е-5G, титр клеток, число жизнеспособных клеток и жизнеспособность клеток были улучшены при добавлении более высокого количества аспарагина в другой типовой клеточной линии.

Как показано на фиг. 6А, добавление различных количеств аспарагина на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой приводит к истощению в аналогичные моменты времени. При этом увеличение количества добавляемого аспарагина повышает скорость потребления аспарагина (смотрите фиг. 7), что позволяет предположить, что клетки не используют аспарагин эффективно. Как показано на фиг. 6В, добавление увеличенного количества аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой не предотвращает истощение аспарагина на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой, может приводить к избыточному образованию побочных продуктов, что снова позволяет предположить, что клетки не используют аспарагин эффективно.

В связи с этим фиг. 7 иллюстрирует уровни потребления аспарагина для диапазона стратегий подпитки аспарагином для типовой клеточной линии с высоким потреблением. Как показано, новая платформа стратегии подпитки по изобретению приводит к получению клеточной культуры с периодической подпиткой, которая потребляет меньшее количество аспарагина в течение клеточного культивирования по сравнению с предшествующей известной платформой стратегии подпитки. Кроме того, как показано, стратегия подпитки большим количеством аспарагина приводит к повышению скорости потребления аспарагина по сравнению со стратегиями подпитки меньшим количеством аспарагина. Эти данные позволяют предположить, что новая платформа стратегии подпитки по изобретению обеспечивает наиболее эффективное использование аспарагина.

В целом, было определено, что истощение аспарагина происходит в клеточных линиях с высоким потреблением. Добавление на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой влияет на производительность клеточного культивирования. Добавление на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой повышает выработку побочных продуктов, например, аммония. Неожиданно было обнаружено, что сбалансированная стратегия подпитки аспарагином, которая предотвращает истощение незаменимых аминокислот, позволяет преодолеть проблему истощения аспарагина на ранней стадии культивирования с периодической подпиткой и минимизирует влияние аммония, а также приводит к повышению продуктивности клеточного культивирования.

Пример 2. Влияние аспарагина в клеточной культуре с периодической подпиткой на связанные с аспарагином аминокислоты.

Взаимосвязь между аспарагином и заменимыми аминокислотами, связанными с аспарагином путями метаболизма, можно исследовать, используя систему биореакторов AMBR250 и измерения аминокислот, как описано в данном документе.

Как показано на фиг. 8, если необходим аспарагин, клетки могут увеличивать потребление аспартата и глутамата для синтеза добавочного количества аспарагина. Повышенные внутриклеточные/внеклеточные концентрации аспартата, глутамата и глутамината могут свидетельствовать о том, что клетки имеют достаточное количество внутриклеточного аспарагина для поддержания клеточных потребностей. При этом снижение концентраций аспартата, глутамата и глутамината может свидетельствовать о недостатке аспарагина.

На фиг. 9А-9D проиллюстрирован эффект уровней аспарагина на поздней стадии клеточного куль-

тивирования с периодической подпиткой типовой клеточной линии 1 с высоким потреблением. Как показано, низкий уровень аспарагина влияет на внутриклеточный профиль связанных заменимых аминокислот (снижение внутриклеточного глутамата при низком уровне аспарагина).

На фиг. 10A-10D проиллюстрирован эффект уровней аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой типовой клеточной линии 2 с высоким потреблением. Как показано, низкий уровень аспарагина влияет на внутриклеточный профиль связанных заменимых аминокислот (снижение внутриклеточного глутамата при низком уровне аспарагина), при этом, в меньшей степени, чем наблюдается для типовой клеточной линии 1 с высоким потреблением.

На фиг. 11A-11D проиллюстрирован эффект уровней аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой типовой клеточной линии с низким потреблением. Как показано, низкий уровень аспарагина не влияет на внеклеточные или внутриклеточные профили связанных заменимых аминокислот для этой типовой клеточной линии (внутриклеточные профили для глутамата не снижаются при низком уровне аспарагина). Как показано, в конце цикла с периодической подпиткой наблюдаются высокие уровни внутриклеточного аспарагина и глутамата.

И наконец на фиг. 12A-12F показан эффект высокого (3X ранняя стадия, 1,5X поздняя стадия) и очень высокого уровня (6X ранняя стадия, 3X поздняя стадия), который демонстрирует, что повышение внеклеточного аспарагина может повышать уровни связанных с аспарагином аминокислот, но также может влиять на титр и уровни аммония. Как показано, более высокие уровни добавляемого аспарагина (фиг. 12A) могут приводить к повышению уровней связанных с аспарагином аминокислот (фиг. 12B, 12D и 12E), но повышение в результате этого образования нежелательных побочных продуктов клеточного культивирования (т.е. фиг. 12F, аммония) может приводить к снижению производительности клеточного культивирования (т.е. фиг. 12C, титра).

Вместе фиг. 9A-9D, фиг. 10A-10D, фиг. 11A-11D и фиг. 12A-12F иллюстрируют, что профили связанных с аспарагином аминокислот и производительность клеточного культивирования для разных уровней подпитки аспарагином варьируются в зависимости от клеточной линии, что позволяет предположить, что требования к подпитке аспарагином могут быть направлены на конкретные потребности клеточной линии.

В целом, внутриклеточные концентрации связанных с аспарагином аминокислот позволяют предположить наличие конкретных требований в отношении аспарагина для конкретной клеточной линии. Конкретнее, влияние добавления аспарагина на внеклеточные и внутриклеточные профили связанных аминокислот может быть направлено на конкретные потребности клеточной линии.

Пример 3. Преодоление проблемы истощения аспарагина.

Улучшенные стратегии подпитки аспарагином и платформы, оптимизированные для преодоления проблемы истощения аспарагина, с сохранением при этом производительности клеточного культивирования можно разрабатывать, используя систему биореакторов AMBR250 и измерения аминокислот, как описано в данном документе.

В таблице проиллюстрированы типовые исследованные стратегии подпитки аспарагином.

| Способ подпитки | Общая подпитка | Подпитка Asn |
|--|----------------|-----------------------------|
| Стандартное культивирование с периодической подпиткой (боллос) | Боллос | Боллос |
| Непрерывная отдельная подпитка Asn | Боллос | Непрерывно |
| Непрерывная общая подпитка+подпитка Asn | Непрерывно | Непрерывно |
| Гибридная подпитка | Боллос | Боллос (1) + непрерывно (1) |

Как показано в табл. 1, стандартную периодическую боллосную подпитку аспарагином сравнивали с несколькими стратегиями подпитки аспарагином, т.е. подпиткой с непрерывным добавлением аспарагина (отдельно от боллосной общей подпитки клеточной культуры), непрерывной комбинированной общей подпиткой плюс подпитка аспарагином и гибридной стратегией подпитки с использованием как боллосной подпитки аспарагином, так и подпитки с непрерывным добавлением аспарагина (отдельно от боллосной общей подпитки клеточной культуры), так, чтобы в клеточную культуру поступало удвоенное общее количество добавляемого аспарагина.

Как показано на фиг. 13A-13D, было обнаружено, что боллосная и непрерывная подпитка аспарагином характеризуются сравнимой производительностью клеточного культивирования (число жизнеспособных клеток проиллюстрировано на фиг. 13A, продуктивность культуры проиллюстрирована на фиг. 13B) для одинакового общего количества добавляемого аспарагина. Кроме того, образование побочных продуктов клеточного культивирования (фиг. 13C иллюстрирует образование аммония, фиг. 13D иллюстрирует образование аланина) остается относительно постоянным при боллосной и непрерывной подпитке аспарагином. При этом, как показано на фиг. 13E-13G непрерывное добавление аспарагина замедляет истощение внеклеточного аспарагина (фиг. 13E), аспартата (фиг. 13F) и глутамата (фиг. 13G) по сравнению с боллосным добавлением аспарагина, характеризующимся таким же самым общим количеством добавляемого аспарагина. В соответствии с аспектами изобретения было неожиданно обнаружено, что одинаковое общее количество добавляемого аспарагина при непрерывной подпитке снижает ско-

рость потребления аспарагина, аспартата и глутамата. В связи с этим улучшенные профили истощения аминокислот со сравнимой производительностью клеточного культивирования позволяют предположить более эффективное потребление аспарагина клеточной культурой.

Как показано на фиг. 14A-14D, было обнаружено, что добавление аспарагина посредством непрерывной подпитки аспарагином (отдельно от болюсной общей подпитки) по сравнению с непрерывным добавлением аспарагина посредством непрерывной общей подпитки и стандартного болюсного добавления не предотвращает истощение внеклеточного аспарагина для такого же общего количества добавляемого аспарагина (фиг. 14A), но снижает образование побочных продуктов клеточного культивирования (фиг. 14D) и модулирует скорость потребления связанных с аспарагином метаболитов (фиг. 14B и фиг. 14C). Все проиллюстрированные стратегии подпитки имеют сравнимую производительность клеточного культивирования.

Было обнаружено, что подход гибридной подпитки (непрерывная подпитка путем добавления аспарагина в комбинации с болюсной подпиткой путем добавления аспарагина) замедляет истощение аминокислот, но повышает образование побочных продуктов в нескольких типовых клеточных линиях по сравнению с болюсным добавлением аспарагина.

Как показано на фиг. 15A-15G, в первой типовой клеточной линии было обнаружено, что подход гибридной подпитки замедляет истощение аспарагина и связанных метаболитов (фиг. 15A иллюстрирует внеклеточный аспарагин, фиг. 15B иллюстрирует внеклеточный аспартат и фиг. 15C иллюстрирует внеклеточный глутамат) и приводит к сравнимой производительности клеточного культивирования (число жизнеспособных клеток проиллюстрировано на фиг. 15D, продуктивность культуры проиллюстрирована на фиг. 15E), но также повышает образование побочных продуктов (фиг. 15F иллюстрирует образование аммония, фиг. 15G иллюстрирует образование аланина).

Как показано на фиг. 16A-16E, во второй типовой клеточной линии было обнаружено, что подход гибридной подпитки замедляет истощение аспарагина (фиг. 16A иллюстрирует внеклеточный аспарагин), но приводит к снижению производительности клеточного культивирования (число жизнеспособных клеток проиллюстрировано на фиг. 16B, продуктивность культуры проиллюстрирована на фиг. 16C). Также было обнаружено, что подход гибридной подпитки повышает образование побочных продуктов (фиг. 16D иллюстрирует образование аммония, фиг. 16E иллюстрирует образование аланина).

В целом, влияние истощения внеклеточного аспарагина на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой можно разрешить путем определения новых стратегий подпитки путем добавления аспарагина. Неожиданно было обнаружено, что непрерывное добавление аспарагина является более эффективной платформой для подпитки аспарагином. Непрерывное добавление аспарагина, в частности в виде независимой отдельной подпитки аспарагином, снижает скорость потребления аспарагина и связанных метаболитов.

Пример 4. Уменьшение количества и контроль вариантов по последовательности аспарагина в клеточной культуре с периодической подпиткой и применение связанных с аспарагином аминокислот как суррогатных маркеров вариантов по последовательности аспарагина.

Применение добавления аспарагина для уменьшения количества вариантов по последовательности аспарагина и применение связанных с аспарагином аминокислот как суррогатных маркеров вариантов по последовательности аспарагина в представляющем интерес полипептиде можно исследовать, используя систему биореакторов AMBR250 и измерения аминокислот, как описано в данном документе.

Как было показано на фиг. 10A-10D, иллюстрирующих эффект уровней аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой типовой клеточной линии 2 с высоким потреблением, варианты по последовательности аспарагина анализировали методом масс-спектрометрии в последний день клеточного культивирования с периодической подпиткой. Было обнаружено, что клеточная культура с низким количеством добавляемого аспарагина имеет 0,30% вариантов по последовательности аспарагина, а клеточная культура с высоким количеством добавляемого аспарагина имеет 0,24% вариантов по последовательности аспарагина. Эти значения ВП являются относительно низкими и согласуются в более высокими уровнями внутриклеточного глутамата, наблюдаемыми в клеточной культуре, как проиллюстрировано на фиг. 10D.

Аналогично, как показано на фиг. 11A-11D, иллюстрирующих эффект уровней аспарагина на поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой типовой клеточной линии с низким потреблением, варианты по последовательности аспарагина анализировали методом масс-спектрометрии в последний день клеточного культивирования с периодической подпиткой. Было обнаружено, что клеточная культура с низким количеством добавляемого аспарагина имеет 0,11% вариантов по последовательности аспарагина, а клеточная культура с высоким количеством добавляемого аспарагина имеет 0,04% вариантов по последовательности аспарагина. Снова, эти значения ВП являются относительно низкими и согласуются в более высокими уровнями внутриклеточного глутамата, наблюдаемыми в клеточной культуре, как проиллюстрировано на фиг. 11D.

Как показано на фиг. 17A-17B, было обнаружено, что истощение внеклеточного аспарагина на ранней стадии культивирования с периодической подпиткой может служить показателем образования варианта по последовательности аспарагина Asn→Ser. Как показано на фиг. 17A, стратегии с подпиткой вы-

соким количеством аспарагина (3X ранняя стадия при 10,8 мМ, 1,5X поздняя стадия), которые поддерживают уровни внеклеточного аспарагина выше предела истощения 0,1 мМ (15 мг/мл) по меньшей мере до дня 4 ранней стадии клеточного культивирования (например, до подпитки 2), способны уменьшать образование вариантов по последовательности аспарагина до уровня ниже, чем около 0,20% ВП (фиг. 17B).

Как показано на фиг. 18A, было обнаружено, что более низкие уровни аспарагина при поздней подпитке повышают количество вариантов по последовательности аспарагина Asn→Ser, в частности, после пиковой концентрации жизнеспособных клеток. В эксперименте, изображенном на фиг. 18A, уровни аспарагина при ранних подпитках были одинаковыми. Фиг. 18B иллюстрирует внутриклеточные уровни глутамата (Glu) для стратегии подпитки высоким количеством аспарагина на поздней стадии по сравнению с подпиткой низким количеством аспарагина на поздней стадии. Кроме того, неожиданно было обнаружено, что добавление Gln в клеточную культуральную среду дополнительно снижает образование вариантов по последовательности аспарагина (фиг. 18C).

Как показано, внутриклеточные концентрации глутамата обратно пропорционально коррелируют с наличием вариантов по последовательности аспарагина. Более высокие внутриклеточные уровни глутамата обнаружены в клеточных культурах с меньшей встречаемостью вариантов по последовательности аспарагина, а более низкие внутриклеточные уровни глутамата обнаружены в клеточных культурах с большей встречаемостью вариантов по последовательности аспарагина. Таким образом, внутриклеточный глутамат можно использовать как суррогатный маркер количества вариантов по последовательности аспарагина в представляющем интерес полипептиде.

Фиг. 19A-19G иллюстрируют корреляцию между аспарагином, связанными с аспарагином аминокислотами и вариантами по последовательности аспарагина для типовой клеточной линии 1. Фиг. 19B-19D иллюстрирует внеклеточный аспарагин (фиг. 19B), аспартат (фиг. 19C) и глутамат (фиг. 19D), тогда как фиг. 19E-19G иллюстрируют типовой внутриклеточный аспарагин (фиг. 19E), аспартата (фиг. 19F) и глутамат (фиг. 19G). Фиг. 19G иллюстрирует, что внутриклеточный глутамат (Glu) на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой может служить как суррогатный маркер вариантов по последовательности аспарагина для полипептида, получаемого с использованием стратегий с подпиткой высоким и низким количеством аспарагина с фиг. 19A. Как показано, подпитка с добавлением высокого количества аспарагина приводит к высокому уровню внутриклеточного глутамата на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой и низкому количеству вариантов по последовательности аспарагина. Подпитка с добавлением низкого количества аспарагина приводит к низкому уровню внутриклеточного глутамата и большому количеству вариантов по последовательности аспарагина. Измерения суррогатного внутриклеточного глутамата согласуются с масс-спектрометрическим анализом вариантов по последовательности аспарагина. При этом отсутствует четкая тенденция в отношении внеклеточного или внутриклеточного аспарагина или аспартата, или внеклеточного глутамата для этой конкретной клеточной линии.

Фиг. 20A-20D иллюстрируют аналогичную корреляцию между аспарагином, связанными с аспарагином аминокислотами и вариантами по последовательности аспарагина для другой типовой клеточной линии (клеточной линии с высоким потреблением). Фиг. 20B-20D иллюстрируют внеклеточный аспарагин (фиг. 20B), внутриклеточный аспартат (фиг. 20C) и внутриклеточный глутамат (фиг. 20D). Фиг. 20C и 20D иллюстрируют, что внутриклеточный аспартат и внутриклеточный глутамат на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой оба могут служить как суррогатные маркеры вариантов по последовательности аспарагина для полипептида, получаемого с использованием стратегий с подпиткой высокими и низкими уровнями аспарагина с фиг. 20A. Как показано, подпитка с добавлением высокого количества аспарагина приводит к высокому уровню внутриклеточного аспартата на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой и высокому уровню внутриклеточного глутамата на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой, а также низкому количеству вариантов по последовательности аспарагина. Подпитка с добавлением низкого количества аспарагина приводит к низкому уровню внутриклеточного аспартата на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой и низкому уровню внутриклеточного глутамата на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой, а также более высокому количеству вариантов по последовательности аспарагина. Измерения суррогатного внутриклеточного аспартата и внутриклеточного глутамата согласуются с масс-спектрометрическим анализом вариантов по последовательности аспарагина.

Фиг. 21A-21F иллюстрируют, что тенденции для вариантов по последовательности аспарагина для типовой клеточной линии 1 согласуются с тенденциями для внутриклеточного глутамата, показывая, что внутриклеточные связанные с аспарагином аминокислоты можно использовать как суррогаты вариантов по последовательности аспарагина. Фиг. 21A и 21C иллюстрируют стратегию ранней подпитки высоким количеством аспарагина (фиг. 21A, количества вариантов по последовательности, определенные методом масс-спектрометрии, фиг. 21C, концентрации внутриклеточного глутамата). Фиг. 21B и 21D иллюстрируют стратегию ранней подпитки низким количеством аспарагина (фиг. 21B, количества вариантов по последовательности, определенные методом масс-спектрометрии, фиг. 21D, концентрации внутриклеточного глутамата). Фиг. 21E иллюстрирует внутриклеточные уровни глутамата для типовой клеточной

линии 4, коррелирующие с более высокой встречаемостью и более низкой встречаемостью вариантов по последовательности аспарагина, при этом на фиг. 21F показан аналогичный внутриклеточный профиль глутамата для другой типовой клеточной линии 5.

Фиг. 22А-22Н иллюстрируют корреляцию между аспарагином, связанными с аспарагином аминокислотами и вариантами по последовательности аспарагина для типовых клеточных линий. Фиг. 22А-22D иллюстрируют внеклеточный аспарагин (фиг. 22А), внеклеточный аспарат (фиг. 22В), внеклеточный глутамат (фиг. 22С) и внеклеточный глутамин (фиг. 22D) для типовой клеточной линии 1 для стратегии подпитки высоким и низким количеством аспарагина. Как показано, отсутствует четкая тенденция, наблюдаемая для внеклеточного аспарагина, аспартата или глутамата и образования вариантов по последовательности аспарагина. При этом существует корреляция между внеклеточным глутамином на поздней стадии культивирования с периодической подпиткой и образованием вариантов по последовательности аспарагина (в частности, с учетом добавления аспарагина выше предела истощения на ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой). Аналогичная тенденция показана на фиг. 22Е-22Н для типовой клеточной линии 4, иллюстрирующих внеклеточный аспарагин (фиг. 22Е), внеклеточный аспарат (фиг. 22F), внеклеточный глутамат (фиг. 22G) и внеклеточный глутамин (фиг. 22Н) для стратегии подпитки высоким и низким количеством аспарагина.

Фиг. 23А-23С дополнительно иллюстрируют, что внеклеточный глутамин может служить суррогатом вариантов по последовательности аспарагина на поздних стадиях клеточного культивирования с периодической подпиткой. Фиг. 23А показывает, что при применении стратегий подпитки высоким количеством аспарагина в типовой клеточной линии 1 может вырабатываться достаточно глутамин (например, выше предела истощения глутамин). Аналогично, фиг. 23В показывает, что при применении стратегий подпитки высоким количеством аспарагина в типовой клеточной линии 1 может вырабатываться достаточно глутамин, что коррелирует с вариантами осуществления, в которых методом масс-спектрометрии не было выявлено вариантов по последовательности аспарагина. И наконец, фиг. 23С показывает, что при отсутствии подпитки аспарагином в день 6 и 8 выявляют варианты по последовательности аспарагина, а внеклеточный уровень глутамин падает ниже пределов истощения (т.е. вырабатывается недостаточно глутамин с помощью стратегий с подпиткой аспарагином). При этом, когда при применении стратегий подпитки высоким количеством аспарагина вырабатываться достаточно глутамин, внеклеточный глутамин коррелирует с образованием вариантов по последовательности аспарагина.

Все публикации и заявки на патент, цитируемые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

Хотя изобретение было описано с отсылкой на типовые варианты осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что можно проводить различные изменения и замену его элементов эквивалентами, не выходя за пределы объема изобретения. Кроме того, для адаптации конкретной ситуации или материала к изложенным принципам можно осуществлять многие модификации, не выходя за рамки их основного объема. Следовательно, подразумевается, что изобретение не ограничено конкретным вариантом осуществления, приведенным в качестве наилучшего способа реализации изобретения, но при этом изобретение включает все варианты осуществления, входящие в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ культивирования клеток млекопитающих для улучшения производительности клеточного культивирования, включающий:

размножение или поддержание клеток млекопитающих в определенной клеточной культуральной среде;

при этом в определенную клеточную культуральную среду добавляют аспарагин в количестве от около 3,6 до около 43,2 мМ во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и от около 3,6 до около 21,6 мМ во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, где количество аспарагина, добавленного во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, больше, чем количество аспарагина, добавленного во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, добавление начинают на 1 день или позже ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой, и добавление осуществляют с интервалами приблизительно в 2 дня; и

поддержание указанных клеток в указанной дополненной аспарагином клеточной культуральной среде в течение по меньшей мере части ранней и поздней стадий клеточного культивирования с периодической подпиткой;

при этом за счет добавления аспарагина происходит улучшение по меньшей мере одного параметра производительности клеточного культивирования по сравнению с аналогичным способом с добавлением меньшего количества аспарагина или без добавления аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что добавление аспарагина проводят как часть общей подпитки или как отдельную подпитку путем добавления аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что добавление аспарагина проводят непрерывно или в виде болуса на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что в определенную клеточную культуральную среду добавляют аспарагин в количестве от около 7,2 до около 21,6 мМ во время ранней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой и от около 3,6 до около 10,8 мМ во время поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий экспрессию представляющего интерес рекомбинантного белка из эукариотических клеток во время клеточного культивирования с периодической подпиткой.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что по меньшей мере один параметр производительности клеточного культивирования выбран из группы, состоящей из повышенной жизнеспособности клеток, повышенной скорости роста клеток, повышенной плотности клеток, повышенного титра представляющего интерес рекомбинантного белка, повышенного выхода представляющего интерес рекомбинантного белка, уменьшения истощения незаменимых аминокислот по меньшей мере в части клеточной культуры, уменьшения образования по меньшей мере одного побочного продукта клеточного культивирования по меньшей мере части в клеточной культуре и улучшения по меньшей мере показателя качества белка.

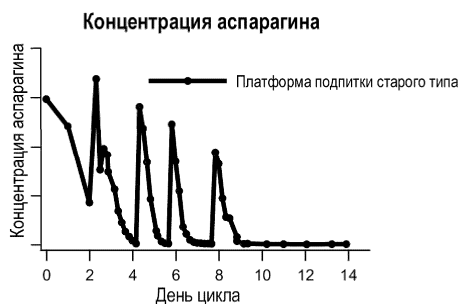
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что по меньшей мере один побочный продукт клеточного культивирования выбран из группы, состоящей из ионов аммония и аланина.

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что по меньшей мере один показатель качества белка представляет собой уменьшение количества вариантов по последовательности белка.

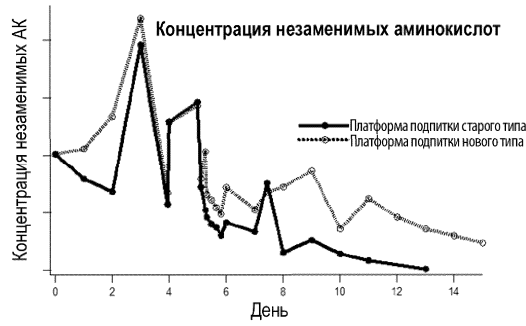
9. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что в клеточной культуре происходит замедление истощения внеклеточных аминокислот аспарагина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты по меньшей мере на 1 день, по меньшей мере на 2 дня, по меньшей мере на 3 дня или по меньшей мере на 4 дня по сравнению с аналогичным способом с проведением добавления аспарагина на ранней и/или поздней стадии клеточного культивирования с периодической подпиткой в виде болусной подпитки.



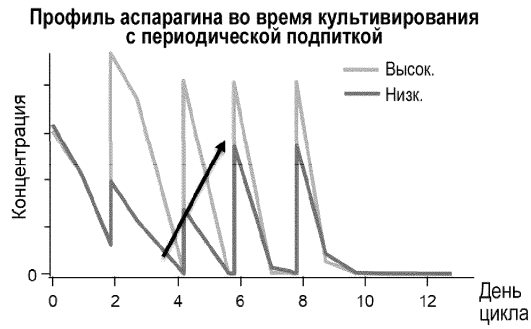
Фиг. 1А



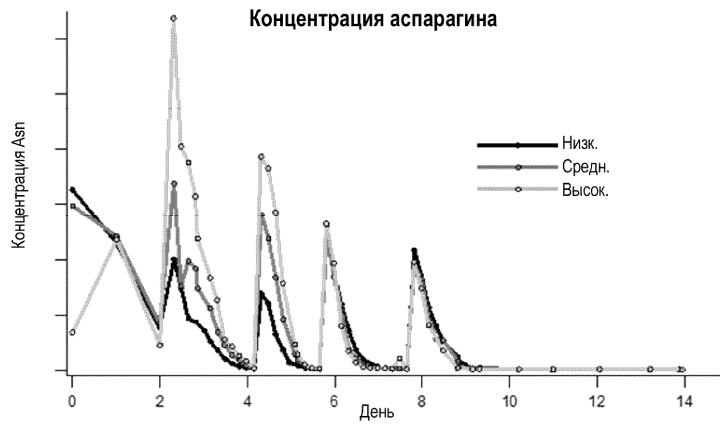
Фиг. 1В



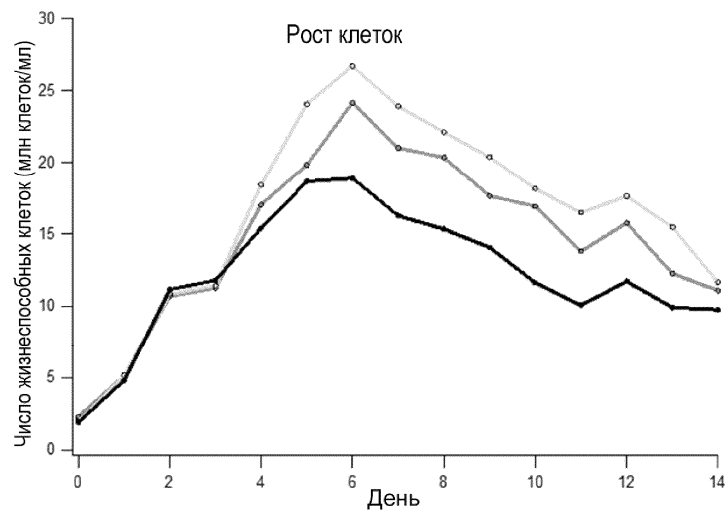
Фиг. 2А



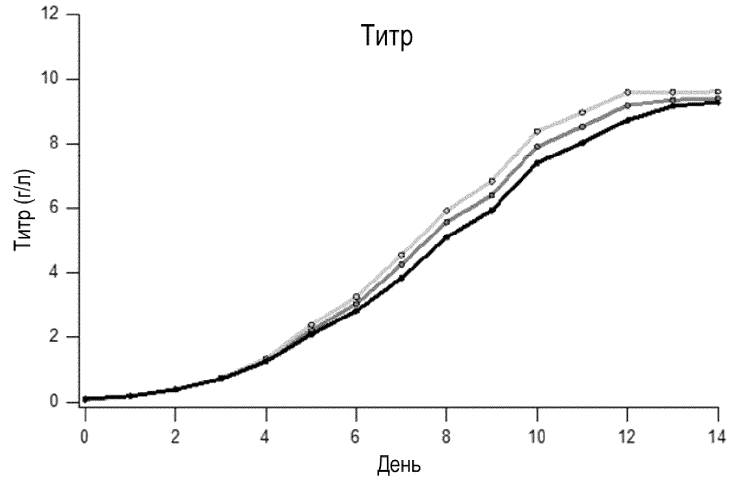
Фиг. 2В



Фиг. 3А



Фиг. 3В



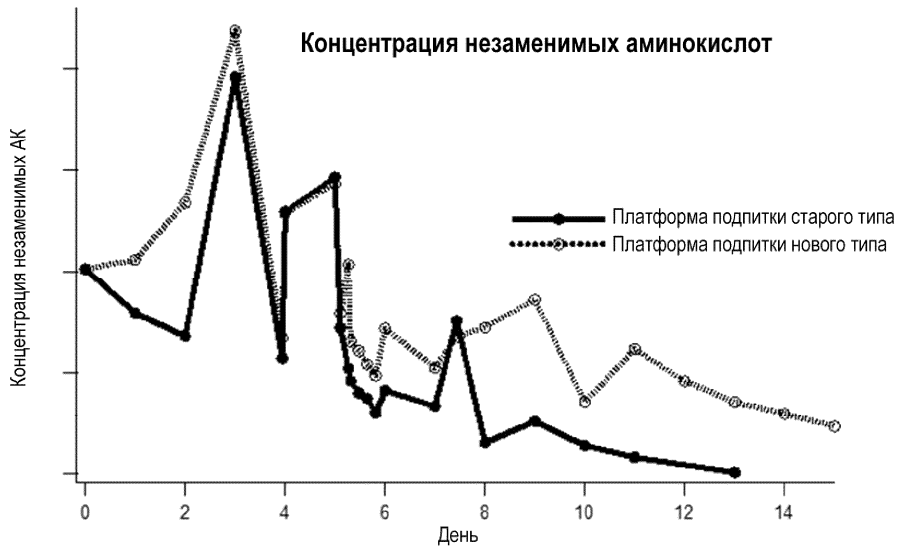
Фиг. 3С



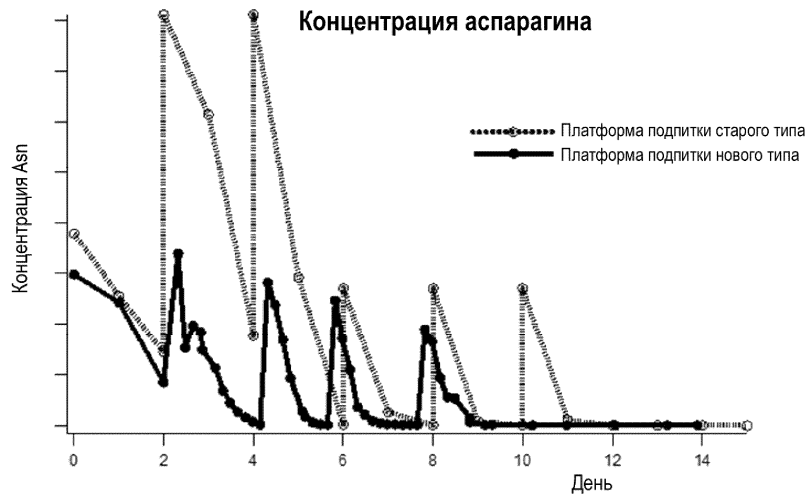
Фиг. 4А

Фиг. 4В

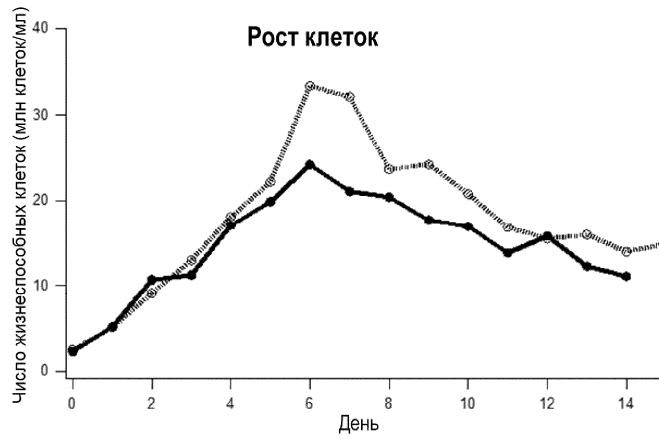
Фиг. 4С



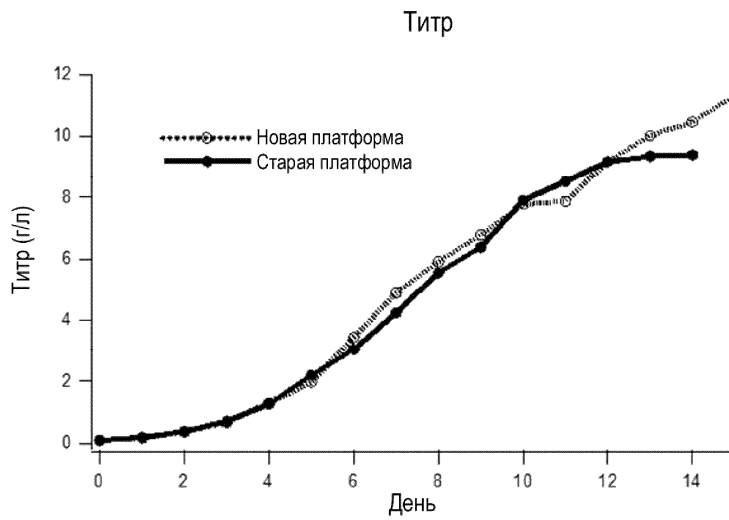
Фиг. 5А



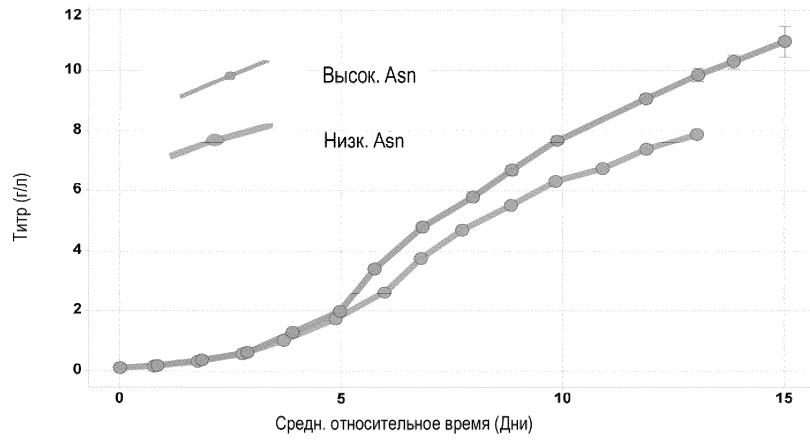
Фиг. 5B



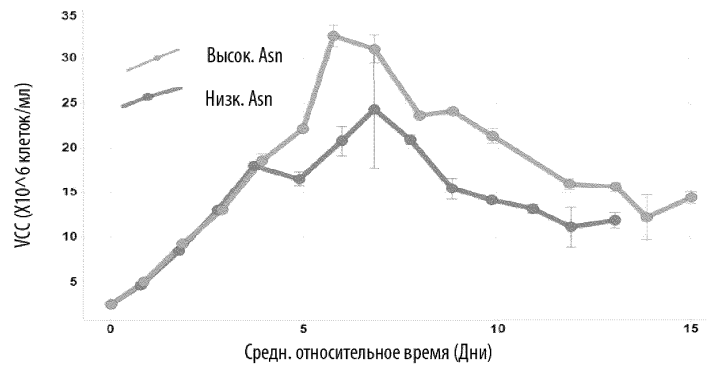
Фиг. 5C



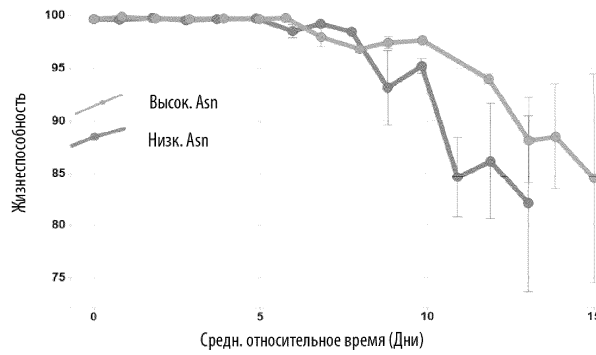
Фиг. 5D



Фиг. 5E

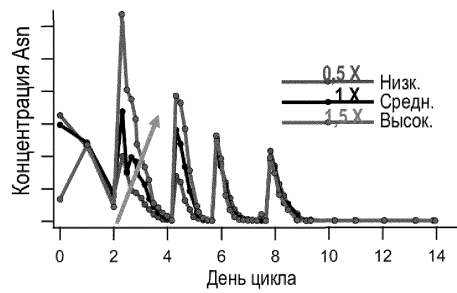


Фиг. 5F



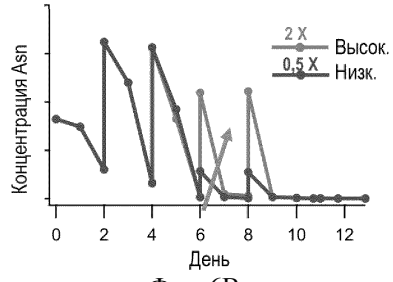
Фиг. 5G

Концентрация аспарагина при ранних подпитках

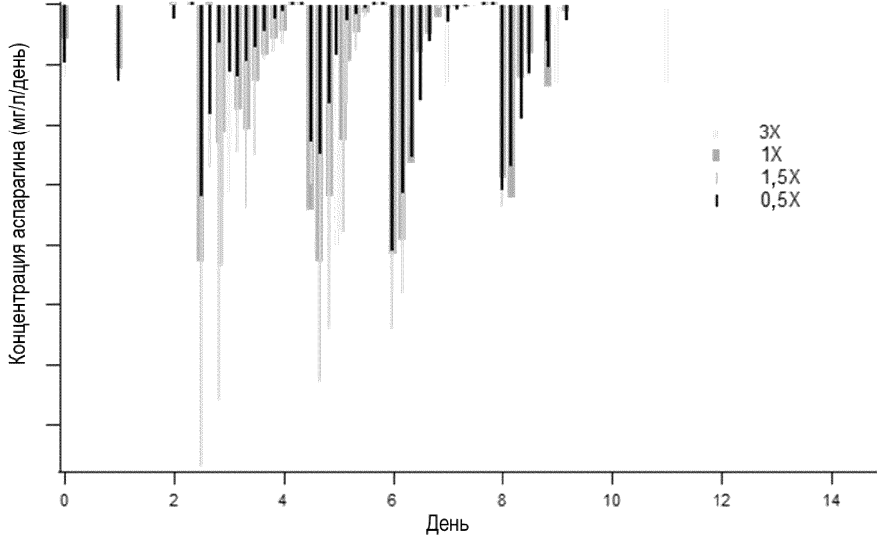


Фиг. 6A

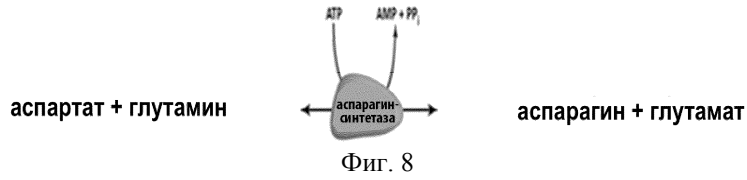
Концентрация аспарагина при поздних подпитках



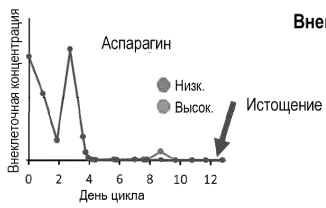
Фиг. 6В



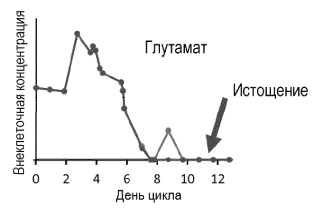
Фиг. 7



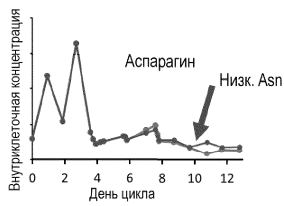
Фиг. 8



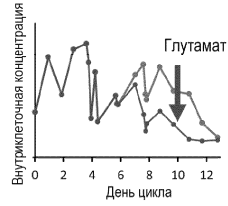
Фиг. 9А



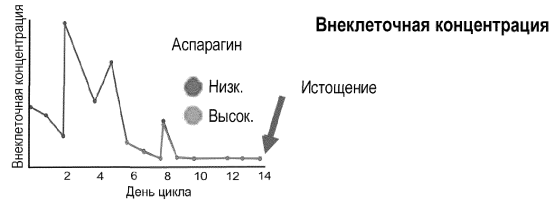
Фиг. 9В



Фиг. 9С



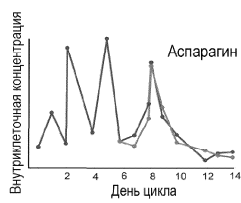
Фиг. 9D



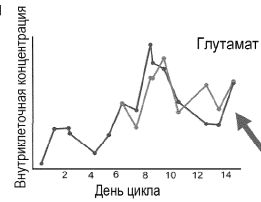
Фиг. 10А



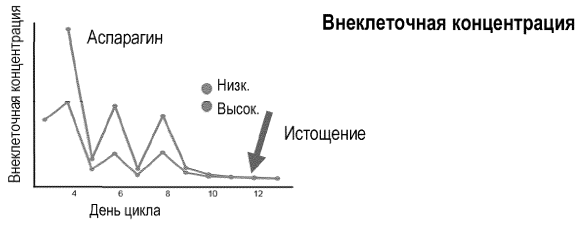
Фиг. 10В



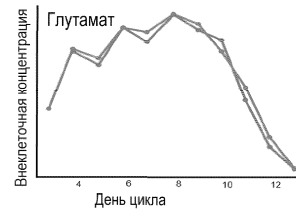
Фиг. 10С



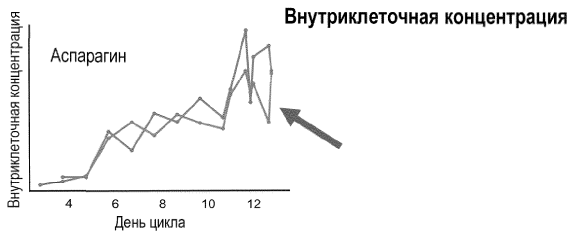
Фиг. 10D



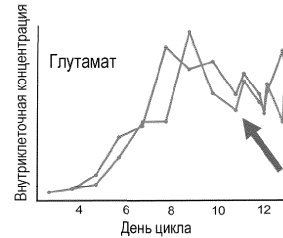
Фиг. 11А



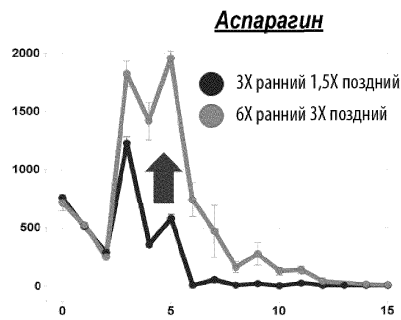
Фиг. 11В



Фиг. 11С

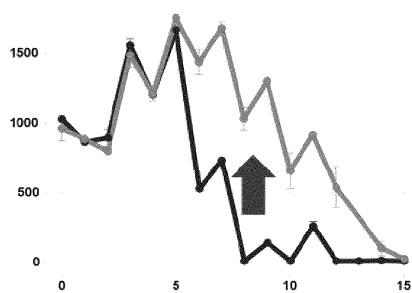


Фиг. 11D



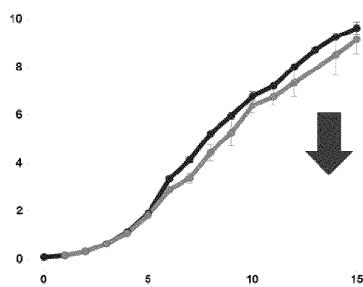
Фиг. 12А

Аспартат



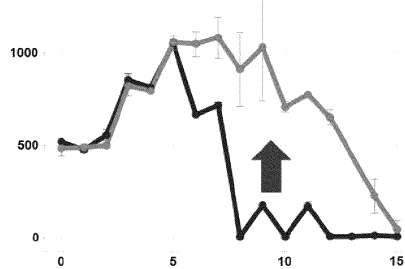
Фиг. 12В

Тур



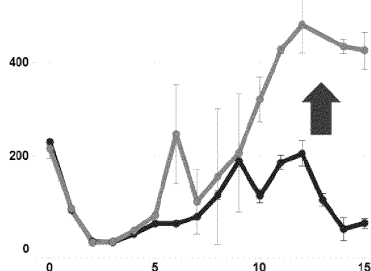
Фиг. 12С

Глутамат



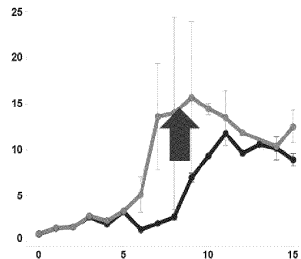
Фиг. 12D

Глутамин

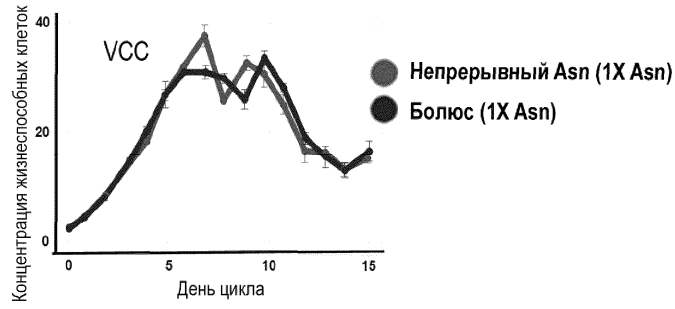


Фиг. 12E

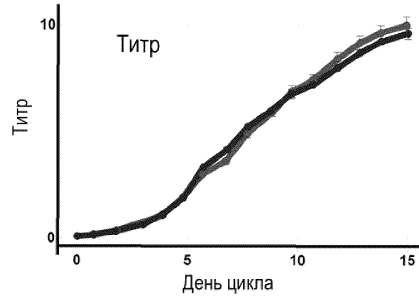
Аммоний



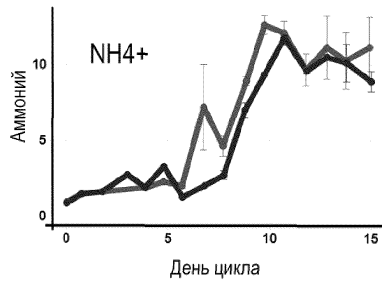
Фиг. 12F



Фиг. 13А



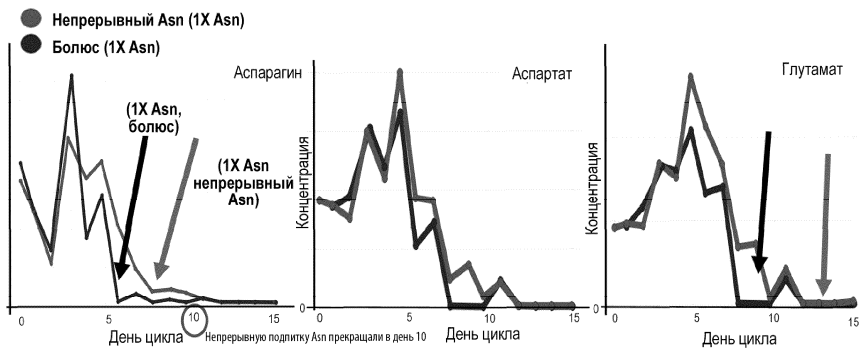
Фиг. 13В



Фиг. 13С



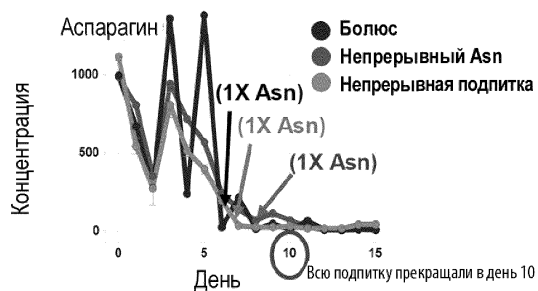
Фиг. 13D



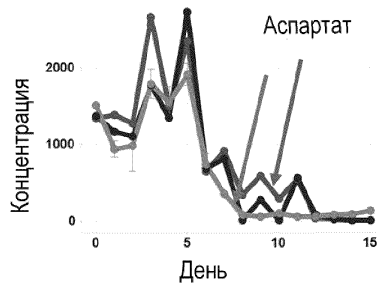
Фиг. 13Е

Фиг. 13F

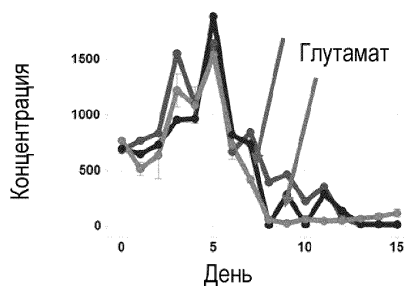
Фиг. 13G



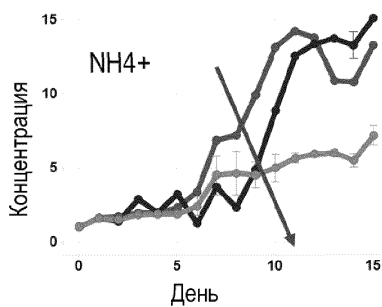
Фиг. 14А



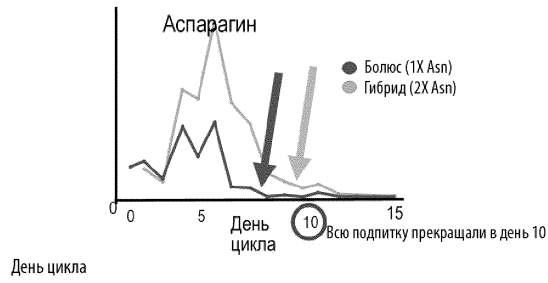
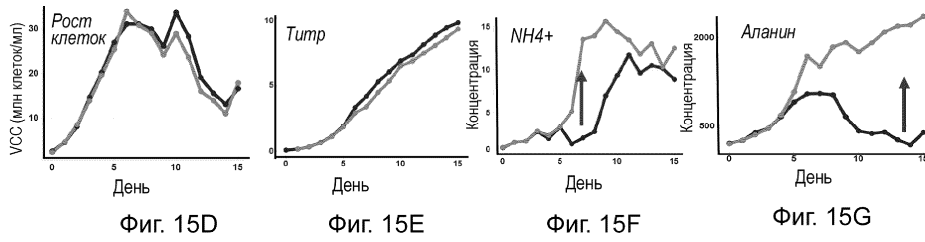
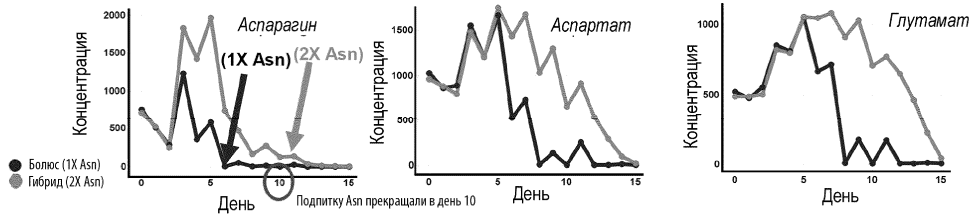
Фиг. 14В



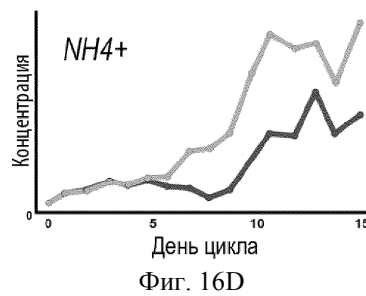
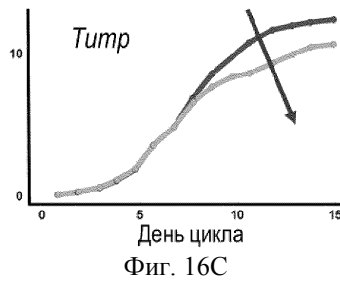
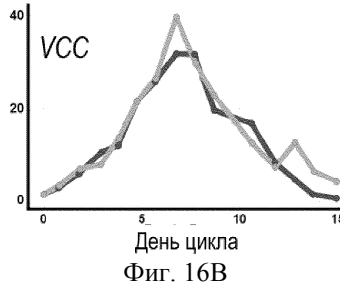
Фиг. 14С

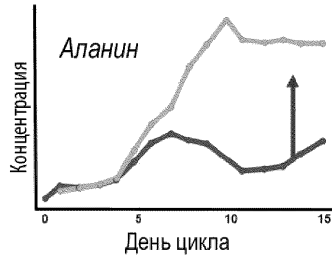


Фиг. 14D

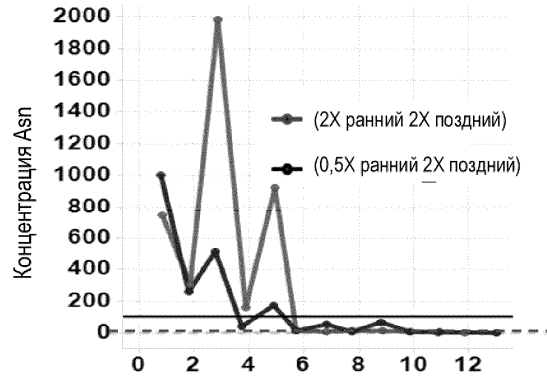


Фиг. 16А



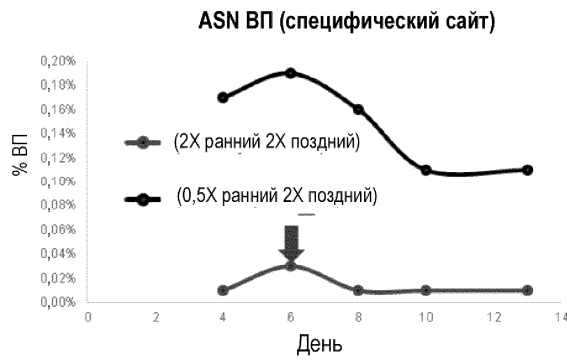


Фиг. 16Е



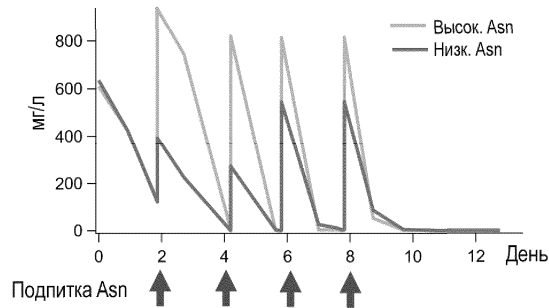
Преодоление истощения во время подпитки 2

Фиг. 17А

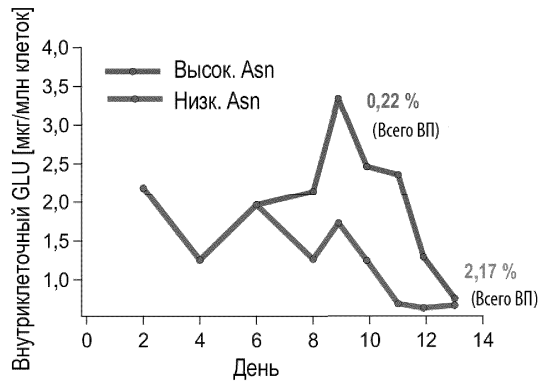


Фиг. 17В

Профиль Asn во время процесса с периодической подпиткой

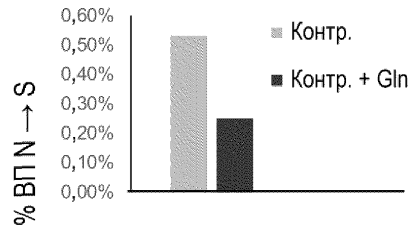


Фиг. 18А



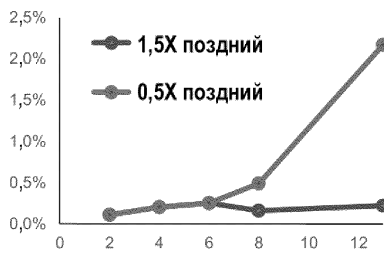
Фиг. 18В

Добавление Gln снижает Asp ВП



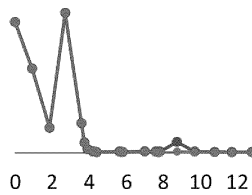
Фиг. 18С

Всего аспарагина ВП



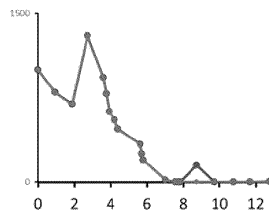
Фиг. 19А

Внеклеточный Asp



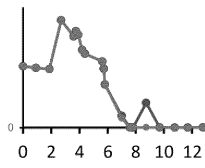
Фиг. 19В

Внеклеточный Asp



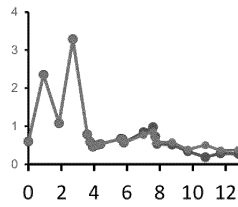
Фиг. 19С

Внеклеточный Glu



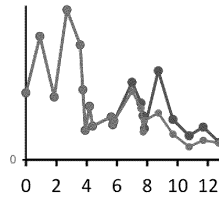
Фиг. 19D

Внутриклеточный Asp



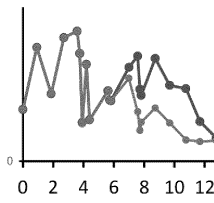
Фиг. 19E

Внутриклеточный Asp



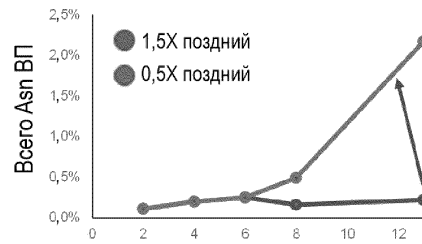
Фиг. 19F

Внутриклеточный Glu



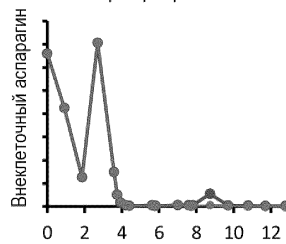
Фиг. 19G

Всего аспарагина ВП

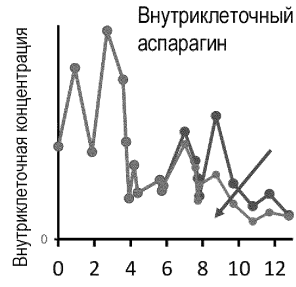


Фиг. 20А

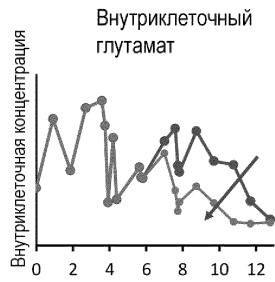
Внеклеточная концентрация



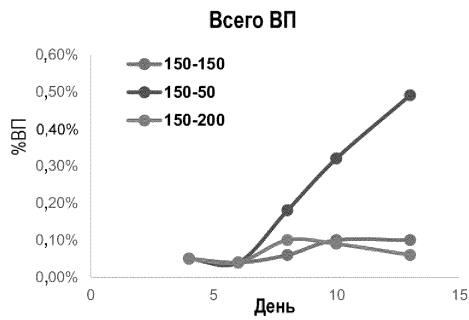
Фиг. 20В



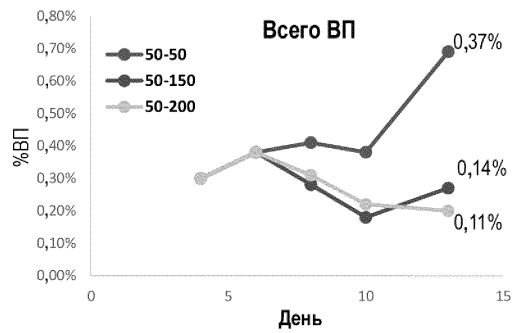
Фиг. 20С



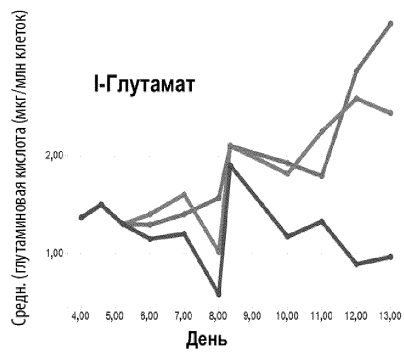
Фиг. 20D



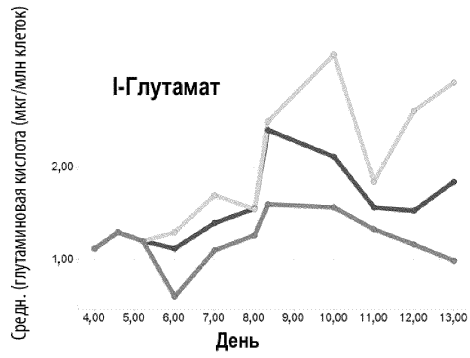
Фиг. 21А



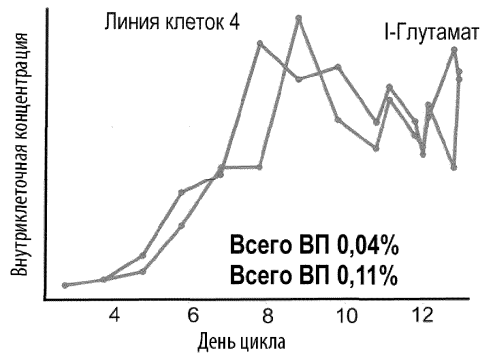
Фиг. 21В



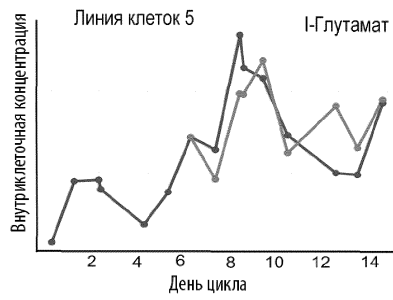
Фиг. 21С



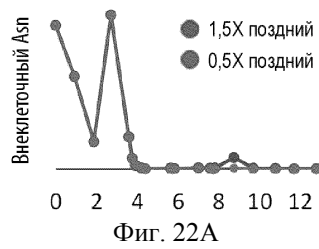
Фиг. 21D



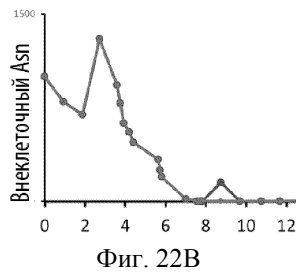
Фиг. 21E



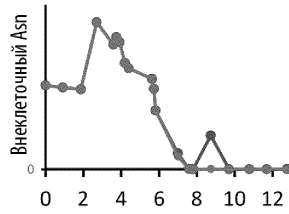
Фиг. 21F



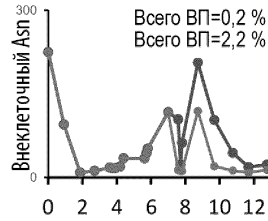
Фиг. 22А



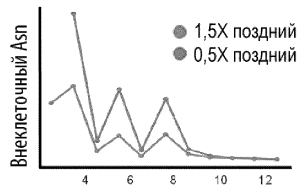
Фиг. 22В



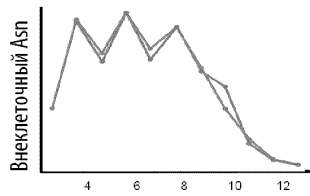
Фиг. 22С



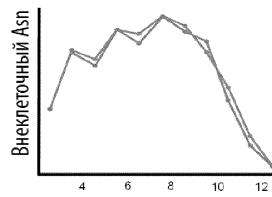
Фиг. 22D



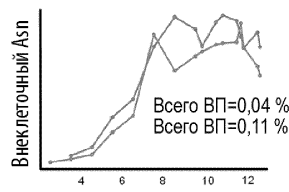
Фиг. 22Е



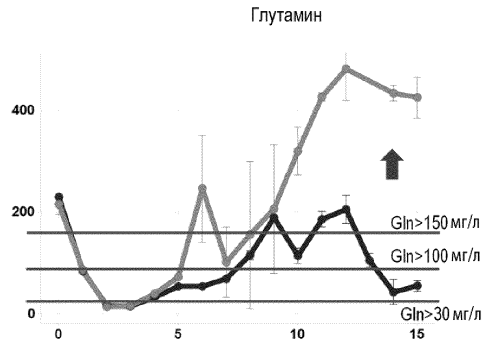
Фиг. 22F



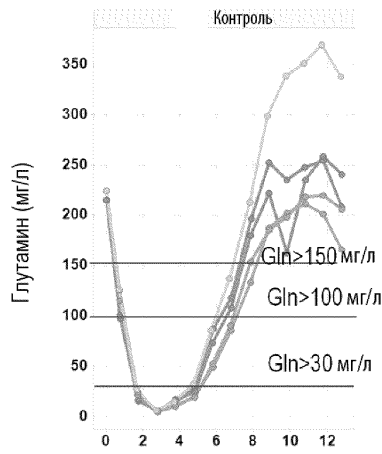
Фиг. 22G



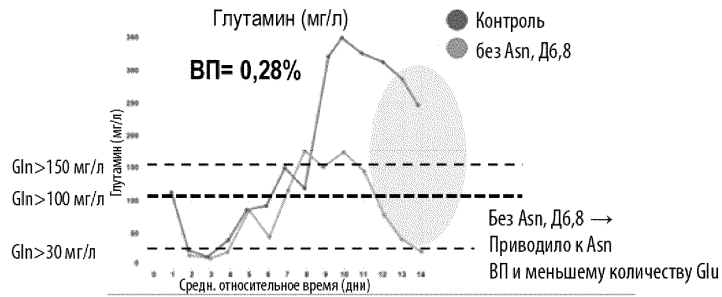
Фиг. 22H



Фиг. 23А



Фиг. 23В



Фиг. 23С

