

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490612** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.05.07

(51) Int. Cl. **C07K 14/65** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.09.09

(54) **АДАПТАЦИЯ КЛЕТОК-ХОЗЯЕВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ С ПЛАТФОРМОЙ, К СРЕДЕ IGF**

(31) **63/242,623**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.09.10**

**Дарис Кристин Мэри, Ле Хуонг Тхи
Нгок, Джайлэсон Эрик, Манро Трент
Филлип (US)**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/076158**

(87) **WO 2023/039502 2023.03.16**

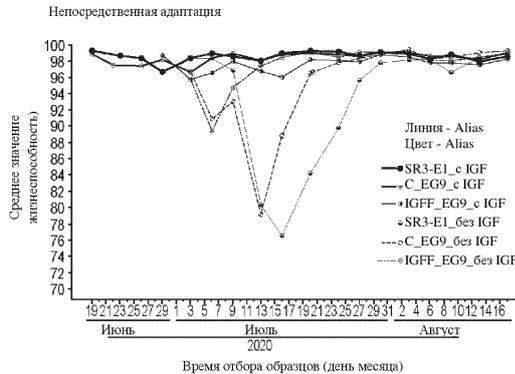
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Представлены способы получения представляющего интерес рекомбинантного белка в культуре клеток млекопитающего в среде, не содержащей IGF-1. Также представлены способы получения клеток млекопитающего, способных расти в среде, не содержащей IGF-1.



202490612 A1

202490612 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580553EA/042

АДАПТАЦИЯ КЛЕТОК-ХОЗЯЕВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ С ПЛАТФОРМОЙ, К СРЕДЕ IGF⁻

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[1] Настоящее изобретение относится к в целом к способам адаптации линий клеток млекопитающего к среде для культивирования клеток, имеющей пониженные количества инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), и к применению этих клеток для получения рекомбинантных белков.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] Благодаря их широкой применимости биопрепараты применяют во всем мире в самых разных областях применения, как, например, в качестве средств терапии и средств диагностики. Линии клеток млекопитающего являются преобладающими системами экспрессии для этих биопрепаратов, причем клетки яичника китайского хомячка (CHO) являются преобладающей клеточной фабрикой. См. Lalonde *et al.*, 2017, *J Biotechnol* 251:128-140. Особенно с появлением биоаналогов скорость выхода на рынок и эффективность затрат сегодня важны как никогда.

[3] Стоимость производства биопрепаратов является высокой из-за сложности их получения с использованием многоэтапного процесса, включающего выбор оптимальных линий клеток, культивирование клеток, полученных в результате продуцирования, в больших количествах и очистку требуемого биопрепарата из собранных клеток. Несмотря на то, что их стоимость снижается благодаря усовершенствованиям всех аспектов получения, их стоимость все еще может быть чрезмерно высокой для широкого применения в качестве терапевтических средств первой линии.

[4] Для того чтобы сделать биологические терапевтические средства более доступными для пациентов, привлекательным предложением является снижение себестоимости материалов для процесса производства. Одной областью, требующей значительных затрат, является среда для культивирования клеток, используемая в процессе получения лекарственного средства. IGF-1 представляет собой важную белковую добавку, поддерживающую рост клеток посредством передачи сигнала по пути инсулиноподобного фактора роста/инсулинового рецептора (IGFR/IR), однако она составляет значительную часть затрат на сырьевой материал для среды.

[5] Таким образом, существует потребность в снижении затрат, ассоциированных с получением рекомбинантных белков из клеток-хозяев. Одним из путей достижения этой цели является снижение себестоимости материалов путем уменьшения или устранения необходимости в некоторых добавках к среде для культивирования клеток, таких как IGF-1. Усиленная экспрессия рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1R) наблюдалась в мезенхимальных стволовых клетках при добавлении в среду для культивирования клеток тромбоцитарного фактора роста ВВ. См. публикацию заявки на патент США № US20200245388. Конститутивная экспрессия IGF-1R также применяется с

использованием векторов экспрессии. См. предварительную заявку на патент США № 63/108084. Постепенная адаптация линий клеток-хозяев была использована для адаптации клеток к среде без белка и без липидов. См. патент США № 9340814.

[6] Все еще существует потребность в линиях клеток-хозяев со сниженными или отсутствующими требованиями к добавке IGF-1, которые продуцируют рекомбинантные белки с минимальным влиянием на рост и производительность. Такие линии клеток будут полезны при разработке способов получения биопрепаратов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] Настоящее изобретение предусматривает способ получения представляющего интерес белка из культуры клеток млекопитающего, включающий (а) культивирование клетки млекопитающего во второй среде для культивирования клеток, имеющей 0,05 мг/л или меньше инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), для экспрессии представляющего интерес белка, где клетка млекопитающего была непосредственно адаптирована для роста в первой среде для культивирования клеток, имеющей 0,035 мг/л или меньше IGF-1, и содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес белок; и (б) извлечение представляющего интерес белка, продуцируемого клеткой млекопитающего.

[8] В определенных вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток содержит 0,03 мг/л или меньше IGF-1. В определенных вариантах осуществления первая среда для культивирования клеток не содержит IGF-1. В определенных вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток не содержит IGF-1.

[9] В определенных вариантах осуществления клетка млекопитающего, которая была непосредственно адаптирована, имеет скорость роста, сравнимую с таковой клетки млекопитающего той же линии, которая не была непосредственно адаптирована. Например, непосредственно адаптированная клетка млекопитающего может характеризоваться временем удвоения, составляющим менее 30 часов, например, от 20 до 30 часов.

[10] В определенных вариантах осуществления при использовании способов, описанных в данном документе, титр экспрессируемого представляющего интерес белка составляет по меньшей мере 50 мг/л в день 10 культивирования.

[11] В определенных вариантах осуществления представляющего интерес белок представляет собой антигенсвязывающий белок. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из моноклональных антител, биспецифических привлекающих Т-клетки молекул, иммуноглобулинов, слитых белков на основе Fc и пептител.

[12] В определенных вариантах осуществления в процессе культивирования клеток млекопитающего используют процесс периодического культивирования с подпиткой, процесс перфузионного культивирования или их комбинации.

[13] В определенных вариантах осуществления культуру клеток млекопитающего создают путем инокуляции в биореакторе объемом по меньшей мере 100 л от по меньшей

мере $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ клеток/мл в бессывороточную культуральную среду с 0,03 мг/л или меньше IGF-1. В определенных аспектах этого варианта осуществления объем биореактора составляет по меньшей мере 500 л или по меньшей мере 2000 л.

[14] В определенных вариантах осуществления клетки млекопитающего представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO). В определенных вариантах осуществления клетки CHO характеризуются дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR⁻) или являются нокаутными по глутаминсинтетазе (GSKO).

[15] В определенных вариантах осуществления извлеченный представляющий интерес белок очищают и составляют в фармацевтически приемлемом составе.

[16] В настоящем изобретении также предусмотрен очищенный составленный представляющий интерес белок, полученный с использованием способов, описанных в данном документе.

[17] В настоящем изобретении также предусмотрен способ непосредственной адаптации клетки млекопитающего к среде IGF⁻, включающий а) культивирование популяции клеток млекопитающего в среде для культивирования клеток, содержащей 0,03 мг/л или меньше IGF-1; б) получение отдельных клеток из популяции клеток млекопитающего путем клонирования одной клетки; в) размножение и пересев отдельных клеток до достижения восстановления жизнеспособности до 90% или больше и времени удвоения, составляющего менее 30 часов.

[18] В определенных вариантах осуществления среда для культивирования клеток не содержит IGF-1.

[19] В определенных вариантах осуществления клетки млекопитающего представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO). В определенных вариантах осуществления клетки CHO характеризуются дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR⁻) или нокаутом по глутаминсинтетазе (GSKO).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[20] На фигурах 1А-В изображены А) постепенная адаптация линий клеток-хозяев GSKO к проприетарной среде для культивирования клеток без Long R3 IGF-1 в течение длительного периода 110 уровней удвоения популяции (PDL); и В) непосредственная адаптация клеток-хозяев GSKO к проприетарной среде для культивирования клеток без Long R3 IGF-1 в течение 1,5-месячного периода времени.

[21] На фигурах 2А-В показаны значения времени удвоения клонированных из адаптированной к IGF⁻ одной клетки хозяев GSKO по сравнению с контролями GSKO. Клонированные из одной клетки линии клеток-хозяев GSKO размножали и пересевали до восстановления > 90% и времени удвоения ~24 ч.

[22] На фигуре 3 показаны графики восстановления с помощью 25 мкМ MSX восстановленных клонированных из адаптированной к IGF⁻ одной клетки хозяев GSKO после трансфекции моноклональным антителом. Линии адаптированных к IGF⁻ клеток, выделенные серым цветом, восстанавливаются за такой же период времени, как и

контроль, обозначенный черной линией.

[23] Фигуры 4A-D: клонированные из одной клетки линии клеток-хозяев GSKO, трансфицированные моноклональным антителом, инокулировали при $1 \cdot 10^6$ или $3 \cdot 10^6$ клеток/мл и оценивали при получении путем 15D (15-суточного) периодического культивирования с подпиткой. Различные оттенки серого и черного цветов представляют исходные пулы хозяев, из которых были получены клонированные из одной клетки хозяева. Формы отличают отдельные клеточные линии. Трансфицированные линии клеток демонстрировали различные уровни роста и продуктивности, при этом некоторые из них попадали в диапазон линий клеток GSKO с IGF-1. А) Графики плотности жизнеспособных клеток для клонированных из одной клетки трансфицированных линий клеток GSKO при получении путем 15D периодического культивирования с подпиткой (FB). В) Графики жизнеспособности для клонированных из одной клетки трансфицированных линий клеток GSKO при получении путем 15D FB. С) Графики титров для клонированных из одной клетки трансфицированных линий клеток GSKO при получении путем 15D FB. D) Графики Qp (объемной удельной продуктивности) для клонированных из одной клетки трансфицированных линий клеток GSKO при получении путем 15D FB.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[24] Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что клетки-хозяева CHO могут быть непосредственно адаптированы для выращивания в среде IGF⁻ (среде, не содержащей IGF-1), что устраняет необходимость в добавлении высоких уровней инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) в среду. Хозяев CHO GSKO, непосредственно адаптировали к среде платформы без IGF-1 и клонировали из одной клетки для создания устойчивой линий клеток-хозяев, которые сохраняют или превосходят показатели роста и продуктивности исходных линий клеток-хозяев, выращенных в среде для культивирования клеток, содержащей IGF-1. Настоящее изобретение возникло, в частности, из стремления снизить затраты на один грамм лекарственного вещества, поскольку IGF-1, белковая добавка, которая поддерживает рост клеток за счет передачи сигнала по пути IGF-1R, составляет до ~30% от затраты на среду. Непосредственно адаптированные клетки CHO, которые могут выживать и расти без добавки IGF-1, могут снизить высокие затраты на IGF-1 при крупномасштабном получении рекомбинантных белков. Пулы адаптированных к IGF⁻ клеток-хозяев и впоследствии клонированные из одной клетки хозяева без IGF⁻ показали сходную производительность с хозяевами CHO из платформы без необходимости в дополнительных добавках.

[25] Непосредственно адаптированные клетки, раскрытые в данном документе, демонстрируют скорость пролиферации, которая является такой же или большей, чем скорость пролиферации исходных клеток CHO. Кроме того, непосредственно адаптированные клетки демонстрируют эффективность продуцирования рекомбинантного белка, которая является такой же или большей, чем у исходных клеток CHO. При использовании непосредственно адаптированной линии клеток по настоящему

изобретению биофармацевтические препараты могут быть получены с помощью менее дорогостоящего и более стабильного способа.

[26] Настоящее изобретение находит применимость особенно для коммерческого получения представляющих интерес белков в средах для культивирования клеток, не содержащих IGF-1. В способах, описанных в данном документе, можно использовать среду, не содержащую IGF-1, которая является менее дорогостоящей при сохранении аналогичного уровня получения.

[27] Линии клеток (также называемые "клетки-хозяева"), используемые в настоящем изобретении, непосредственно адаптированы к росту в среде для культивирования клеток в отсутствие IGF-1 или при содержании IGF-1 0,03 мг/л или меньше, и размножают, пересевают и отбирают отдельные клоны, которые обладают требуемыми свойствами. В определенных вариантах осуществления линии клеток также экспрессируют белок, представляющий коммерческий или научный интерес. Клеточные линии как правило получают из линии, происходящей от первичной культуры, которую можно поддерживать в культуре в течение неограниченного времени. Генетическое конструирование линии клеток включает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток рекомбинантной полинуклеотидной молекулой таким образом, чтобы обеспечить экспрессию клеткой-хозяином представляющего интерес белка. Способы и векторы, предназначенные для генетического конструирования клеток и/или линий клеток с обеспечением экспрессии, например, представляющего интерес белка, хорошо известны специалистам в данной области техники; например, различные методики проиллюстрированы в Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, и ежеквартальные уточненные варианты); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69.

Определения

[28] Хотя терминология, используемая в данной заявке, является стандартной в данной области техники, в данном документе представлены определения некоторых терминов для обеспечения ясности и определенности смысла формулы изобретения. Единицы измерения, приставки и символы могут быть обозначены в их форме, принятой в SI (Международной системе единиц). Упоминаемые в данном документе числовые диапазоны включают числа, определяющие границы диапазона, и включают и поддерживают каждое целое число в пределах заданного диапазона. Способы и методики, описанные в данном документе, в целом осуществляются в соответствии с традиционными способами, общеизвестными в данной области техники и описанными в различных общих и более специализированных литературных источниках, которые цитируются и обсуждаются на протяжении всей настоящей заявки, если не указано иное. См., например, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), и Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane,

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

[29] Используемые в данном документе термины в единственном числе означают "один или несколько", если специально не указано иное. Кроме того, если контекст не предусматривает иное, термины в единственном числе будут включать их формы во множественном числе, а термины во множественном числе будут включать их формы в единственном числе. В целом, номенклатура, применяемая в рамках культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации и связанные с ними методики, описанные в данном документе, являются общеизвестными и общепринятыми в данной области техники.

[30] Все документы или части документов, цитируемые в данной заявке, включая без ограничения патенты, заявки на патенты, статьи, книги и трактаты, настоящим явно включены посредством ссылки. Описываемое в варианте осуществления настоящего изобретения можно объединять с другими вариантами осуществления настоящего изобретения.

[31] Настоящее изобретение предусматривает способы экспрессии "представляющего интерес белка". "Представляющий интерес белок" включает встречающиеся в природе белки, рекомбинантные белки и сконструированные белки (например, белки, которые не встречаются в природе и которые были разработаны и/или созданы людьми). Представляющий интерес белок может быть, но не обязательно, белком, который известен или предполагается как терапевтически значимый.

[32] Используемые в данном документе термины "полипептид" и "белок" (например, как используется в контексте представляющего интерес белка или представляющего интерес полипептида) применяют в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Данные термины также применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой аналог или миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе полимерам из аминокислот. Термины также могут охватывать полимеры из аминокислот, которые были модифицированы, например, посредством добавления углеводных остатков с образованием гликопротеинов, или фосфорилированы. Полипептиды и белки могут быть продуцированы встречающейся в природе и нерекомбинантной клеткой, или полипептиды и белки продуцированы генетически сконструированной или рекомбинантной клеткой. Полипептиды и белки могут включать молекулы, имеющие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, имеющие делеции, добавления и/или замены одной или нескольких аминокислот нативной последовательности.

[33] Термины "полипептид" и "белок" охватывают молекулы, включающие только встречающиеся в природе аминокислоты, а также молекулы, состоящие из не встречающихся в природе аминокислот. Примеры не встречающихся в природе

аминокислот (которыми можно заменить любую встречающуюся в природе аминокислоту, находящуюся в любой последовательности, раскрытой в данном документе, по необходимости) включают: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В системе обозначений полипептидов, используемой в данном документе, левое направление представляет собой направление в сторону аминоконца, а правое направление представляет собой направление в сторону карбоксильного конца в соответствии со стандартной практикой и правилами.

[34] Неограничивающий перечень примеров не встречающихся в природе аминокислот, которые могут быть вставлены в белковую или полипептидную последовательность или которыми можно заменить остаток дикого типа в полипептидной последовательности, включают β -аминокислоты, гомоаминокислоты, циклические аминокислоты и аминокислоты с дериватизированными боковыми цепями. Примеры включают (в L-форме или D-форме; сокращенно, как в скобках) цитруллин (Cit), гомоцитруллин (hCit), N α -метилцитруллин (NMeCit), N α -метилгомоцитруллин (N α -MeHoCit), орнитин (Orn), N α -метилорнитин (N α -MeOrn или NMeOrn), саркозин (Sar), гомолизин (hLys или hK), гомоаргинин (hArg или hR), гомоглутамин (hQ), N α -метиларгинин (NMeR), N α -метиллейцин (N α -MeL или NMeL), N-метилгомолизин (NMeHoK), N α -метилглутамин (NMeQ), норлейцин (Nle), норвалин (Nva), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), октагидроиндол-2-карбоновую кислоту (Oic), 3-(1-нафтил)аланин (1-Nal), 3-(2-нафтил)аланин (2-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), 2-инданилглицин (Igl), пара-йодфенилаланин (pI-Phe), пара-аминофенилаланин (4AmP или 4-Amino-Phe), 4-гуанидинофенилаланин (Guf), глициллизин (сокращенно "K(N ϵ -глицил)" или "K(глицил)" или "K(gly)"), нитрофенилаланин (nitrophe), аминофенилаланин (aminophe или амино-Phe), бензилфенилаланин (benzylphe), γ -карбоксиглутаминовую кислоту (γ -carboxyglu), гидроксипролин (hydroхурро), пара-карбоксилфенилаланин (Cpa), α -аминоадипиновую кислоту (Aad), N α -метилвалин (NMeVal), N- α -метиллейцин (NMeLeu), N α -метилнорлейцин (NMeNle), циклопентилглицин (Cpg), циклогексилглицин (Chg), ацетиларгинин (acetylarg), α,β -диаминопропионовую кислоту (Dpr), α,γ -диаминомасляную кислоту (Dab), диаминопропионовую кислоту (Dap), циклогексилаланин (Cha), 4-метилфенилаланин (MePhe), β,β -дифенилаланин (BiPhA), аминокислоту (Abu), 4-фенилфенилаланин (или бифенилаланин; 4Bip), α -аминоизомасляную кислоту (Aib), бета-аланин, бета-аминопропионовую кислоту, пиперидиновую кислоту, аминокaproновую кислоту, аминокептановую кислоту, аминокимелиновую кислоту, десмозин, диаминокимелиновую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксизин, аллогидроксизин, изодесмозин, аллоизолейцин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, N-метилвалин, 4-гидроксипролин (Hур), γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-

ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, ω -метиларгинин, 4-амино-о-фталевую кислоту (4АРА) и другие подобные аминокислоты и дериватизированные формы любого из конкретно перечисленных.

[35] Используемый в данном документе термин “гетерологичный”, используемый в связи с нуклеиновой кислотой, означает наличие нуклеиновой кислоты, не встречающейся в природе в клетке-хозяине. Он может включать мутированные последовательности, например, последовательности, отличающиеся от встречающейся в природе последовательности. Он может включать последовательности из других видов. Он также может включать наличие последовательности в другом положении в геноме, чем та, что встречается в природе в клетке-хозяине. Он, как правило, не включает естественные мутации, которые могут происходить в клетке-хозяине. Клетка, уже содержащая гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес белок, например, путем стабильной интеграции кассеты экспрессии, будет считаться содержащей гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты. Для ясности, клетка СНО или ее производное (например, нокаутная по DHFR или GS), имеющая нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок, будет считаться имеющей гетерологичную нуклеиновую кислоту.

[36] В настоящем изобретении рассматривают оба следующих варианта: (1) клетки-хозяева (например, клетки СНО), которые сначала непосредственно адаптируют к среде IGF⁻, как описано в данном документе, для создания, например, банка основных клеток или банка рабочих клеток, а затем дополнительно модифицируют для включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей, например, антитело; и (2) клетки, например, банки основных клеток или банки рабочих клеток, которые уже содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес гетерологичный белок, например, антитело, которые затем непосредственно адаптируют к среде IGF⁻, как описано в данном документе.

[37] Используемый в данном документе термин “биореактор” означает любой сосуд, применимый для выращивания культуры клеток. Культуры клеток по настоящему изобретению могут быть выращены в биореакторе, который может быть выбран на основании применения представляющего интерес белка, который продуцируется клетками, растущими в биореакторе. Биореактор может быть любого размера, при условии, что он является применим для культивирования клеток; обычно размер биореактора соответствует объему выращиваемой в нем культуры клеток. Как правило, биореактор будет иметь объем по меньшей мере 1 литр, и объем может составлять 2, 5, 10, 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 литров или больше, или может представлять собой любой объем между указанными значениями. Внутренние условия биореактора, включая без ограничения рН и температуру, можно контролировать в течение периода культивирования. Специалисты в данной области будут знать и смогут выбрать подходящие биореакторы для применения в раскрытых в данном документе способах, исходя из соответствующих соображений.

[38] Как используется в данном документе, "культура клеток" или "культура" означает рост и размножение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования для клеток млекопитающего известны из уровня техники. См., например, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающего можно культивировать в суспензии или при их прикреплении к твердому субстрату. Можно использовать биореакторы с псевдооживленным слоем, половолоконные биореакторы, роллерные флаконы, встряхиваемые колбы или резервуары биореакторов с перемешиванием, содержащие или не содержащие микроносители. В одном варианте осуществления используют биореакторы объемом от 500 л до 2000 л. В другом варианте осуществления используют биореакторы объемом от 1000 л до 2000 л.

[39] Термин "среда для культивирования клеток" (также называемая "питательная среда", "среда для культуры клеток", "среда для культуры тканей") относится к любому питательному раствору, применяемому для выращивания клеток, например, клеток животных или млекопитающего, и который обычно обеспечивает по меньшей мере один или несколько компонентов из следующего: источник энергии (обычно в форме углевода, такого как глюкоза); одну или несколько из всех незаменимых аминокислот и обычно двадцать основных аминокислот плюс цистеин; витамины и/или другие органические соединения, как правило, необходимые в низких концентрациях; липиды или свободные жирные кислоты и микроэлементы, например, неорганические соединения или встречающиеся в природе элементы, которые, как правило, требуются в очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне.

[40] В питательный раствор необязательно могут быть добавлены дополнительные необязательные компоненты для оптимизации роста клеток, такие как гормоны и другие факторы роста, например, трансферрин, эпидермальный фактор роста, сыворотка крови и тому подобное; соли, например, кальция, магния и фосфата, и буферы, например, HEPES; нуклеозиды и основания, например, аденозин, тимидин, гипоксантин; гидролизаты белков и тканей, например, гидролизованный животный или растительный белок (пептон или пептонные смеси, которые могут быть получены из побочных продуктов животного происхождения, очищенного желатина или растительного материала); антибиотики, например, гентамицин; средства для защиты клеток или поверхностно-активные вещества, такие как Pluronic[®] F68 (также называемый Lutrol[®] F68 и Kolliphor[®] P188; неионный триблок, состоящий из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли(пропиленоксида)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксид)); полиамины, например, путресцин, спермидин и спермин (см., например, публикацию международной патентной заявки № WO 2008/154014) и пируват (см., например, патент США № 8053238), в зависимости от требований подлежащих культивированию клеток и/или требуемых параметров культуры клеток.

[41] Среда для культивирования клеток включает среды, которые, как правило,

используют и/или известны для применения в любом способе культивирования клеток, таком как без ограничения периодическое, расширенное периодическое, периодическое с подпиткой и/или перфузионное или непрерывное культивирование клеток.

[42] “Базовая” (или периодическая) среда для культивирования клеток относится к среде для культивирования клеток, которая обычно используется для начала культивирования клеток и является достаточно полной для поддержания культуры клеток.

[43] “Периодическая культура с подпиткой” относится к форме суспензионной культуры и означает способ культивирования клеток, при котором наличие дополнительных компонентов обеспечивают в культуре в момент или моменты времени, следующие за началом процесса культивирования. Обеспечиваемые компоненты обычно включают питательные добавки для клеток, которые были истощены в процессе культивирования. В качестве дополнения или альтернативы, дополнительные компоненты могут включать компоненты добавки (например, соединение, ингибирующее клеточный цикл). Как правило, в определенный момент периодическое культивирование с подпиткой останавливают, и клетки и/или компоненты в среде собирают и необязательно очищают.

[44] “Ростовая” среда для культивирования клеток относится к среде для культивирования клеток, которая, как правило, используется в культурах клеток во время периода экспоненциального роста, “фазы роста”, и является в достаточной степени полной, чтобы поддерживать культуру клеток во время этой фазы. Ростовая среда для культивирования клеток также может содержать средства для отбора, которые обеспечивают устойчивость или выживаемость линии клеток-хозяев, с включенными в нее селектируемыми маркерами. Такие средства для отбора включают без ограничения генетицин (G418), неомицин, гигромицин В, пурамицин, зеоцин, метионинсульфоксимин, метотрексат, среду для культивирования клеток, не содержащую глутамин, среду для культивирования клеток, в которой отсутствует глицин, гипоксантин и тимидин или только тимидин.

[45] “Перфузионная” среда для культивирования клеток относится к среде для культивирования клеток, которая, как правило, используется в культурах клеток, которые поддерживаются за счет перфузии или способов непрерывного культивирования, и является в достаточной степени полной, чтобы поддерживать культуру клеток во время данного процесса. Составы перфузионной среды для культивирования клеток могут быть богаче или более концентрированными, чем составы базовых сред для культивирования клеток, чтобы соответствовать способу, используемому для удаления истощенной среды. Перфузионную среду для культивирования клеток можно применять как в фазе роста, так и в фазе продуцирования.

[46] Среда культивирования “продуцирующих” клеток относится к среде для культивирования клеток, которая обычно используется в культурах клеток во время перехода, когда экспоненциальный рост заканчивается и начинается продуцирование белка, фазы “перехода” и/или “продукта”, и является достаточно полной для поддержания желаемой плотности клеток, жизнеспособности и/или титра продукта во время этой фазы.

[47] Концентрированная среда для культивирования клеток может содержать некоторые или все питательные вещества, необходимые для поддержания клеточной культуры; в частности, концентрированная среда может содержать питательные вещества, идентифицированные или известные как потребляемые в ходе фазы продуцирования клеточной культуры. Концентрированная среда может быть основана практически на любом составе среды для культивирования клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать некоторые или все компоненты среды для культивирования клеток, например, в количестве приблизительно 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X или даже приблизительно 1000X от их нормального количества.

[48] Компоненты, используемые для получения среды для культивирования клеток, могут быть полностью измельчены в состав порошковой среды; частично измельчены с добавлением жидких добавок в среду для культивирования клеток по мере необходимости или добавлены в культуру клеток в полностью жидкой форме.

[49] Клеточные культуры также могут быть дополнены независимыми концентрированными подпитками определенных питательных веществ, которые может быть трудно составлять или которые быстро истощаются в клеточных культурах. Такими питательными веществами могут быть аминокислоты, такие как тирозин, цистеин и/или цистин (см., например, публикацию международной патентной заявки № WO2012/145682). Например, концентрированный раствор тирозина может быть независимо подан в культуру клеток, выращенную в среде для культивирования клеток, содержащей тирозин, так, чтобы концентрация тирозина в культуре клеток не превышала 8 мМ. В другом примере концентрированный раствор тирозина и цистина независимо подается в культуру клеток, выращиваемую в среде для культивирования клеток, не содержащей тирозин, цистин или цистеин. Независимые подпитки могут начинаться до или в начале фазы продуцирования. Независимые подпитки можно осуществлять путем периодической подпитки в среду для культивирования клеток в те же или другие дни, что и концентрированная питательная среда. Независимые подкормки также можно перфузировать в те же или разные дни, что и перфузируемую среду.

[50] "Бессывороточная" относится к среде для культивирования клеток, которая не содержит сыворотки животных, например, фетальной бычьей сыворотки. Различные среды для культивирования тканей, включая определенные среды для культивирования, являются коммерчески доступными, например, можно использовать любую из следующих сред для культивирования клеток или их комбинацию: среда RPMI-1640, среда RPMI-1641, модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM), минимальная необходимая среда Игла, среда F-12K, среда Хэма F12, модифицированная по Искову среда Дульбекко, среда МакКоя 5A, среда Лейбовица L-15 и бессывороточные среды, такие как серии EX-CELL™ 300 (JRH Biosciences, Ленекса, Канзас), MCDB 302 (Sigma Aldrich Corp., Сент-Луис, Миссури), среди прочих. Также доступны бессывороточные версии таких культуральных сред. Среда для культивирования клеток может быть дополнена

дополнительными или повышенными концентрациями таких компонентов, как аминокислоты, соли, сахара, витамины, гормоны, факторы роста, буферы, антибиотики, липиды, микроэлементы и т. п., в зависимости от требований подлежащих культивированию клеток и/или желаемых параметров культуры клеток. Также можно использовать индивидуальные среды для культивирования клеток.

[51] "Плотность клеток" относится к количеству клеток в данном объеме культуральной среды. "Плотность жизнеспособных клеток" относится к количеству живых клеток в данном объеме культуральной среды, как определено с помощью стандартных анализов жизнеспособности (например, с помощью способа вытеснения трипанового синего).

[52] "Жизнеспособность клеток" означает способность клеток в культуре выживать при заданном наборе условий культивирования или экспериментальных вариаций. Этот термин также относится к той части клеток, которые являются живыми в определенное время по отношению к общему количеству клеток, живых и мертвых, в культуре в это время.

[53] "Остановка роста", которая также может называться "остановка роста клеток", представляет собой момент, когда клетки перестают увеличиваться в количестве, или когда клеточный цикл больше не прогрессирует. Остановку роста можно отслеживать путем определения плотности жизнеспособных клеток в культуре клеток. Некоторые клетки в состоянии остановки роста могут увеличиваться в размере, но не в количестве, поэтому объем осажденных клеток в культуре, находящейся в состоянии остановки роста, может увеличиваться. Остановку роста можно в определенной степени обратить, если клетки не находятся в состоянии ухудшения здоровья, путем изменения на обратные условий, которые приводят к остановке роста.

[54] "Объем осажденных клеток" (PCV), также называемый "процент объема осажденных клеток" (% PCV), представляет собой отношение объема, занимаемого клетками, к общему объему клеточной культуры, выраженное в процентах (см. Stettler *et al.*, 2006, *Biotechnol Bioeng. Dec 20:95(6):1228-33*). Объем осажденных клеток является функцией плотности и диаметра клеток; увеличение объема осажденных клеток может быть вызвано увеличением либо плотности клеток, либо диаметра клеток, либо и того, и другого. Объем осажденных клеток представляет собой меру содержания твердых частиц в культуре клеток. Твердые частицы удаляют во время сбора и последующей очистки. Более твердые частицы означают больше усилий для отделения твердого материала от требуемого продукта во время сбора и последующей очистки. Кроме того, требуемый продукт может застрять в твердых частицах и утратиться в процессе сбора, что приводит к снижению выхода продукта. Поскольку клетки-хозяева различаются по размеру, а клеточные культуры также содержат мертвые и отмирающие клетки и другие клеточные остатки, объем осажденных клеток является более точным способом описания твердого содержимого в культуре клеток, чем плотность клеток или плотность жизнеспособных клеток. Например, культура объемом 2000 л с плотностью клеток 50×10^6 клеток/мл будет

иметь значительно отличающийся объем осажженных клеток в зависимости от их размера. Кроме того, некоторые клетки, находящиеся в состоянии остановки роста, будут увеличиваться в размерах, поэтому объем осажженных клеток до остановки роста и после остановки роста, вероятно, будет отличаться из-за увеличения биомассы в результате увеличения размера клеток.

[55] "Титр" означает общее количество представляющего интерес полипептида или белка (который может быть встречающимся в природе или рекомбинантным представляющим интерес белком), продуцируемого культурой клеток в данном объеме среды. Титр может быть выражен в единицах миллиграммов или микрограммов полипептида или белка на миллилитр (или другую меру объема) среды. "Кумулятивный титр" представляет собой титр, продуцируемый клетками в течение всего периода культивирования, и может быть определен, например, путем измерения ежедневных титров и использования этих значений для расчета кумулятивного титра.

[56] Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" означает клетку, которая была генетически сконструирована для экспрессии представляющего интерес полипептида. Генетическая инженерия клетки предусматривает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клетки нуклеиновой кислотой, кодирующей рекомбинантную полинуклеотидную молекулу ("представляющий интерес ген"), и/или иное изменение (например, путем гомологичной рекомбинации и активации гена или слияния рекомбинантной клетки с нерекомбинантной клеткой), для экспрессии клеткой-хозяином необходимого рекомбинантного полипептида. Способы и векторы для генетического конструирования клеток и/или линий клеток для экспрессии представляющего интерес полипептида хорошо известны специалистам в данной области техники; например, различные методики проиллюстрированы в *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel *et al.*, eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, и ежеквартальные уточненные варианты); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69. Данный термин охватывает потомство родительской клетки вне зависимости от того, идентично ли данное потомство по морфологии или по генетической структуре исходной родительской клетке или нет, при условии, что присутствует представляющий интерес ген. Культура клеток может содержать одну или несколько клеток-хозяев.

[57] IGF-1 представляет собой полипептидный белковый гормон, сходный по молекулярной структуре с инсулином. Кроме того, IGF-1 играет важную роль в росте и анаболизме взрослых млекопитающего.

[58] IGF-1R имеет сайт связывания с АТФ, который используется для обеспечения фосфатов для аутофосфорилирования. Структуры комплексов аутофосфорилирования остатков тирозина 1165 и 1166 были идентифицированы в кристаллах киназного домена IGF1R. См. Xu *et al.*, 2015, *Science Signaling* 8(405):rs13. В ответ на связывание лиганда α -цепи индуцируют тирозиновое аутофосфорилирование β -цепи. Это событие запускает каскад внутриклеточной передачи сигнала, который, хотя и является специфическим по

отношению к типу клеток, часто способствует выживанию клеток и пролиферации клеток. См. Jones *et al.*, 1995, *Endocrine Reviews* 16(1):3-34, и LeRoith *et al.*, 1995, *Endocrine Reviews* 16(2):143-63. Именно этот эффект на пролиферацию клеток делает добавление IGF-1 в среду для культивирования клеток общепринятым при крупномасштабном получении рекомбинантных белков.

[59] IGF-1 является коммерчески доступным и обычно используется в качестве добавки в среду для культивирования клеток в концентрации приблизительно 0,1 мг/л. Существуют по меньшей мере три коммерчески доступные формы IGF-1, которые могут быть включены в среду культивирования клеток, включая нативный IGF-1 (70 аминокислот, 7,6 кДа, доступен, например, от R&D Systems) Long R3 IGF-1 (83 аминокислоты, 9,1 кДа, доступен, например, от MilliporeSigma и Repligen) и Short TM AE-IGF-1 (72 аминокислоты, 7,9 кДа, доступен, например, от CellRx).

Способ непосредственной адаптации клеток млекопитающего к среде IGF⁻

[60] Путем непосредственной адаптации клетки млекопитающего к среде IGF⁻ (среде, не содержащей IGF-1), было обнаружено, что IGF-1 может быть уменьшен в количестве или исключен в крупномасштабном производстве рекомбинантных белков при сохранении аналогичных скорости роста и производительности. Непосредственная адаптация клетки млекопитающего к среде IGF⁻ означает использование культуры клеток, которая была выращена или ранее была выращена (и впоследствии заморожена) в среде для культивирования клеток, содержащей IGF-1, включая IGF-1, имеющийся в сыворотке крови, и культивирование этих клеток непосредственно в среде для культивирования клеток, не содержащей IGF-1. При непосредственной адаптации клетки адаптируют только к одной среде для культивирования клеток, имеющей концентрацию IGF-1, которая может включать отсутствие IGF-1. Это отличается от постепенной адаптации, которая включает последовательное снижение количества IGF-1, присутствующего в среде для культивирования клеток, и позволяет клеткам восстановиться на каждом этапе снижения концентрации IGF-1.

[61] Настоящее изобретение предусматривает способ непосредственной адаптации клетки млекопитающего к среде IGF⁻, включающий а) культивирование популяции клеток млекопитающего в среде для культивирования клеток, содержащей 0,03 мг/л или меньше IGF-1; б) получение отдельных клеток из популяции клеток млекопитающего путем клонирования одной клетки и с) размножение и пересев отдельных клеток до достижения восстановления до 90% или больше и времени удвоения, составляющего менее 30 часов. Лучшие клоны отбирают на основании таких характеристик как жизнеспособность, рост и трансфицируемость.

[62] Среда для культивирования клеток, не содержащая IGF-1, обычно означает, что среда для культивирования клеток содержит пониженный уровень IGF-1 по сравнению со стандартными условиями культивирования клеток. Например, среда для культивирования клеток для непосредственной адаптации (иногда упоминаемая в данном документе как первая среда для культивирования клеток) может содержать 0,03 мг/л или

меньше, 0,02 мг/л или меньше, 0,01 мг/л или меньше IGF-1 или может не содержать его. Среда IGF⁻ относится к среде для культивирования клеток, не содержащей IGF-1.

[63] В способах, раскрытых в данном документе, может быть использована любая линия клеток млекопитающего. Самые разнообразные линии клеток млекопитающего, подходящие для выращивания в культуре, доступны от Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния, США) и у коммерческих поставщиков. Примеры линий клеток, обычно применяемых в промышленности, включают линию клеток почек обезьяны CV1, трансформированную с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию эмбриональных клеток почек человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham *et al.*, 1977, *J. Gen Virol.* 36, 59); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.* 23:243-251); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки гепатомы человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки линии TRI (Mather *et al.*, 1982, *Annals N.Y Acad. Sci.* 383:44-68); клетки MRC 5 или клетки FS4; клетки миеломы млекопитающего и целый ряд других линий клеток, а также клетки яичников китайского хомячка (CHO).

[64] Крупномасштабное получение белков для коммерческих применений обычно осуществляют в суспензионной культуре. Поэтому клетки-хозяева млекопитающего, используемые для создания рекомбинантных клеток млекопитающего, описанных в данном документе, могут быть, но не обязательно, адаптированы к росту в суспензионной культуре. Известны различные клетки-хозяева, адаптированные к росту в суспензионной культуре, включая клетки NS0 миеломы мыши и клетки CHO из линий клеток CHO-S, DG44 и DXB11. Другие подходящие линии клеток включают клетки SP2/0 миеломы мыши, клетки ВНК-21 почки новорожденного хомяка, клетки PER.C6[®] человека, клетки почки эмбриона человека НЕК-293, а также линии клеток, полученные из любой из линий клеток, раскрытых в данном документе, или сконструированные на их основе.

[65] Клетки CHO широко применяются для продуцирования сложных рекомбинантных белков, в том числе клетки CHOK1 (ATCC CCL61). Мутантные линии клеток, дефицитные по дигидрофолатредуктазе (DHFR) (Urlaub *et al.*, 1980, *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4216-4220), DXB11 и DG-44, являются предпочтительными линиями клеток-хозяев CHO, поскольку эффективная система экспрессии селективируемого и амплифицируемого гена DHFR обеспечивает высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка в этих клетках (Kaufman R. J., 1990, *Meth Enzymol* 185:537-566). Также включены линии клеток CHOK1SV, нокаутные по глутаминсинтазе (GS), которые позволяют использовать отбор на основе глутаминсинтазы (GS) с использованием метионинсульфоксимины (MSX). Другие подходящие клетки-хозяева CHO могут

включать без ограничения следующие (номера доступа в ECACC в скобках): CHO (85050302), CHO (без белка) (00102307), CHO-K1 (85051005), CHO-K1/SF (93061607), CHO/DHFR-(94060607), CHO/без DHFR-AC (05011002), RR-CHOKI (92052129).

[66] Для непосредственной адаптации используют культуру клеток линии клеток млекопитающего в среде для культивирования клеток, содержащей ее обычные и предпочтительные компоненты. Как правило эта среда для культивирования клеток включает сыворотку крови с IGF-1. Клетки предпочтительно культивируют и необязательно замораживают в фазе экспоненциального роста.

[67] Клетки млекопитающего пересевают в среду для культивирования клеток, не содержащую IGF-1. В определенных вариантах осуществления концентрация IGF-1 составляет 0,03 мг/л или меньше. В определенных вариантах осуществления концентрация IGF-1 составляет 0 мг/л. Предпочтительно, отдельные клетки клонируют, например, с помощью прибора Berkley Lights (BLI) Beacon Instrument. Клетки размножают и пересевают до тех пор, пока они не адаптируются к среде IGF⁻, например, пока их жизнеспособность не будет составлять 90% или больше, и пока они не будут способны пролиферировать с нормальной скоростью роста, например, с временем удвоения, составляющим 30 часов или меньше.

[68] Описанные в данном документе способы и линии клеток с использованием непосредственной адаптации к IGF⁻ позволяют снизить количества IGF-1 в среде для культивирования клеток, используемой для производства представляющего интерес белка. Как правило, концентрация IGF-1 в среде для культивирования клеток составляет 0,1 мг/л. В способах, раскрытых в данном документе, концентрация IGF-1 в среде для культивирования клеток может быть снижена до менее чем равной 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 или 0,01 мг/л. В некоторых вариантах осуществления в среде для культивирования клеток нет необходимости в IGF-1, т. е. концентрация IGF-1 в среде для культивирования клеток составляет 0 мг/л.

[69] В описанных в данном документе способах клетки имеют скорость роста, сравнимую со скоростью роста клеток той же линии без адаптации к IGF⁻. В определенных вариантах осуществления скорость роста составляет 0,015-0,04 л/час в течение первых 5 суток получения. В определенных вариантах осуществления скорость роста составляет 0,022-0,025 л/час в посевном материале. В определенных вариантах осуществления время удвоения клеток составляет 20-30 или 23-35 часов.

[70] В описанных в данном документе способах клетки продуцируют представляющий интерес рекомбинантный белок при титре, сопоставимом с титром клеток той же линии, которые не были адаптированы к среде для культивирования клеток без IGF-1. В определенных вариантах осуществления титр представляющего интерес белка составляет по меньшей мере 50 мг/л, 100 мг/л, 150 мг/л, 200 мг/л, 250 мг/л, 300 мг/л, 350 мг/л, 400 мг/л, 450 мг/л, 500 мг/л, 550 мг/л или 600 мг/л после дня 10 культивирования.

Получение клеток-хозяев млекопитающего, экспрессирующих

представляющий интерес белок

[71] Экспрессия представляющего интерес белка в клетке может быть достигнута хорошо известными способами, как транзientной, так и стабильной экспрессии (Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001).

[72] Способы стабильной интеграции хорошо известны в уровне техники. Вкратце, стабильной интеграции обычно достигают путем транзientного введения гетерологичного полинуклеотида или вектора, содержащего гетерологичный полинуклеотид, в клетку-хозяина, что способствует стабильной интеграции указанного гетерологичного полинуклеотида в геном клетки. Как правило, гетерологичный полинуклеотид фланкируется гомологичными плечами, т. е. последовательностями, гомологичными области выше и ниже сайта интеграции. Перед введением в клетку-хозяина млекопитающего кольцевые векторы могут быть линеаризованы для облегчения интеграции в геном клетки. Способы введения векторов в клетки хорошо известны в уровне техники и включают трансфекцию биологическими способами, такими как вирусная доставка, химическими способами, такими как использование катионных полимеров, фосфата кальция, катионных липидов или катионных аминокислот; физическими способами, такими как электропорация или микроинъекция; или смешанными подходами, такими как слияние протопластов.

[73] Известно, что для осуществления стабильной трансфекции клеток млекопитающего, в зависимости от применяемых вектора экспрессии и методики трансфекции, только небольшая доля клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном. Для идентификации и отбора этих интегрантов в клетки-хозяева вместе с геном, представляющим интерес, обычно вводят ген, который кодирует селективируемый маркер (например, обеспечивающий устойчивость к антибиотикам). Предпочтительные селективируемые маркеры включают маркеры, которые придают устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин и метотрексат. Клетки, стабильно трансфицированные с помощью введенной нуклеиновой кислоты можно идентифицировать с помощью отбора по чувствительности к лекарственному препарату (например, клетки, в которые введен ген селективируемого маркера, выживут, в то время как другие клетки погибнут), в числе других способов.

[74] В конкретном способе стабильной интеграции применяют опосредованный рекомбиназой обмен кассетами (RMCE; Vode and Baer, 2001, Curr Opin Biotechnol. 12:473-80, и Vode *et al.*, 2000, Biol. Chem. 381:801-813) для сайт-специфической интеграции в геном (также называемой "направленной интеграцией"). Сайт-специфические рекомбиназы, такие как Flp и Cre, опосредуют рекомбинацию между двумя копиями их целевой последовательности, обозначаемыми FRT и loxP, соответственно. Применение двух несовместимых целевых последовательностей, например, FRT в комбинации с F3 (Schlake and Vode, 1994, Biochemistry, 33:12746-51), а также инвертированных сайтов

распознавания мишени (Feng et al., 1999, J. Mol. Biol. 292:779-85) позволяет вставлять сегменты ДНК в заранее определенный хромосомный локус, несущий целевые последовательности в подобной конфигурации. См. также патент EP № EP1781796B1 и публикацию патентной заявки EP № EP2789691A1.

[75] Вставка RMCE в определенный сайт генома может быть опосредована нуклеазами (например, белком с цинковыми пальцами (ZFP), эффекторной нуклеазой, подобной активатору транскрипции (TALEN), кластеризованными регулярно перемежающимися короткими палиндромными повторами (CRISPR)/CRISPR-ассоциированным белком 9 (Cas9)), которые могут быть сконструированы для создания одно- и двухнитевых разрывов (SSB/DSB) в геноме. Существует два основных и разных пути восстановления DSB - гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов (NHEJ). Гомологичная рекомбинация требует наличия гомологичной последовательности в качестве матрицы (например, "донора", содержащего RMCE), чтобы направлять процесс клеточной репарации, и результаты репарации являются безошибочными и предсказуемыми. В отсутствие матричной (или "донорной") последовательности для гомологичной рекомбинации клетка обычно пытается восстановить DSB с помощью непредсказуемого и подверженного ошибкам процесса негомологичного соединения концов (NHEJ).

[76] Вектор может представлять собой любую молекулу или любой элемент (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг, транспозон, космиду, хромосому, вирус, вирусный капсид, вирион, депротеинизированную ДНК, образующую комплекс ДНК и т. п.), которые подходят для применения в переносе и/или транспортировке информации, кодирующей белок, в клетку-хозяина и/или в специфическое местоположение и/или компартмент в клетке-хозяине. Векторы могут включать вирусные и невирусные векторы, неэписомные векторы млекопитающего. Векторы зачастую называют векторами экспрессии, например рекомбинантными векторами экспрессии и клонирующими векторами. Вектор может быть введен в клетку-хозяина для обеспечения репликации вектора самого по себе, и за счет этого обеспечения амплификации копий полинуклеотида, содержащегося в нем. Клонированные векторы могут содержать компоненты последовательности, обычно включающие без ограничения точку начала репликации, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. При необходимости эти элементы могут быть выбраны специалистом средней квалификации в данной области.

[77] Векторы применимы для трансформации клетки-хозяина и содержат последовательности нуклеиновой кислоты, которые направляют и/или регулируют (вместе с клеткой-хозяином) экспрессию одной или нескольких гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ними. Конструкция экспрессии может включать без ограничения последовательности, которые приводят к транскрипции, трансляции или регулируют их и, в случае присутствия интронов, приводят к сплайсингу

РНК кодирующей области, функционально связанной с ними. "Функционально связанный" означает, что компоненты, в отношении которых используется данный термин, находятся во взаимосвязи, которая позволяет им выполнять присущие им функции. Например, регуляторная последовательность, например промотор, в векторе, которая "функционально связана" с кодирующей последовательностью для белка, организована так, чтобы нормальная активность регуляторной последовательности приводила к транскрипции кодирующей последовательности для белка, что приводит к рекомбинантной экспрессии кодируемого белка.

[78] Вектор можно выбрать таким образом, чтобы он был функциональным в конкретной используемой клетке-хозяине (т. е. вектор является совместимым с синтетическим аппаратом клетки-хозяина, что может обеспечивать осуществление амплификации и/или экспрессии гена). В некоторых вариантах осуществления применяют векторы, которые используются в структурных анализах комплементации фрагментов белка с применением белков-репортеров, таких как дигидрофолатредуктаза (см., например, патент США № 6270964). Подходящие векторы экспрессии известны в данной области техники, а также являются коммерчески доступными.

[79] Как правило, векторы, применяемые в клетках-хозяевах, будут содержать последовательности для поддержания плазмид, а также для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. Как правило, такие последовательности будут включать одну или несколько из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или несколько энхансерных последовательностей, точку начала репликации, последовательности регуляции транскрипции и трансляции, последовательность терминации транскрипции, полную последовательность интрона, содержащую донорный и акцепторный сайты сплайсинга, различные пре- или пропоследовательности для улучшения гликозилирования или выхода, природную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид) для секреции полипептида, сайт связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, последовательности внутреннего участка посадки рибосомы (IRES), элемент увеличивающей экспрессию последовательности (EASE), РНК трехсоставной лидерной последовательности (ТРА) и гена VA из аденовируса 2, полилинкерную область для вставки полинуклеотида, кодирующего подлежащий экспрессии полипептид и элемент селективируемого маркера. Векторы могут быть собраны из начального вектора, такого как коммерчески доступный вектор, при этом дополнительные элементы можно получить отдельно и лигировать в вектор. Способы, применяемые для получения каждого из компонентов хорошо известны специалисту в данной области техники.

[80] Компоненты вектора могут быть гомологичными (т. е. происходить от того же вида и/или штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичными (например, происходить от вида, отличного от вида или штамма клетки-хозяина), гибридными (т. е. являются комбинацией фланкирующих последовательностей из более чем одного источника),

синтетическими или природными. Последовательности компонентов, применимых в векторах, можно получить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, как, например, последовательности, ранее идентифицированные посредством картирования и/или посредством рестрикционной эндонуклеазы. Кроме того, их можно получить с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или путем скрининга геномной библиотеки с помощью подходящих зондов.

[81] Сайт связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции мРНК, и для него характерно наличие последовательности Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательности Козак (эукариоты). Как правило, этот элемент расположен в направлении 3'-конца относительно промотора и в направлении 5'-конца относительно кодирующей последовательности полипептида, подлежащего экспрессии.

[82] Точка начала репликации содействует амплификации вектора в клетке-хозяине. Они могут входить в состав коммерчески доступных прокариотических векторов, а также их можно синтезировать химически на основе известной последовательности и лигировать в вектор. Для клонирования векторов в клетках млекопитающего могут быть применимы различные вирусные точки начала репликации (например, происходящие из SV40, вируса полиомы, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусов, таких как HPV или BPV).

[83] Последовательности регуляции транскрипции и трансляции для векторов экспрессии в клетках-хозяевах, являющихся клетками млекопитающего, можно вырезать из вирусных геномов. Обычно применяемые промоторные и энхансерные последовательности получают из вируса полиомы, аденовируса 2, обезьяньего вируса 40 (SV40) и цитомегаловируса человека (CMV). Например, можно применять промотор/энхансер CMV человека немедленно-раннего гена 1. См., например, Patterson *et al.*, 1994, Applied Microbiol. Biotechnol. 40:691-98. Последовательности ДНК, полученные из генома вируса SV40, например, точка начала репликации SV40, ранний и поздний промотор, энхансер, сайты сплайсинга и полиаденилирования, можно применять для обеспечения других генетических элементов, предназначенных для экспрессии последовательности структурного гена в клетке-хозяине, являющейся клеткой млекопитающего. Особенно применимы вирусные ранний и поздний промоторы, поскольку оба легко получить из вирусного генома в виде фрагмента, который также может содержать вирусную точку начала репликации (Fiers *et al.*, 1978, Nature 273:113; Kaufman, 1990, Meth. in Enzymol. 185:487-511). Также можно применять меньшие или большие фрагменты SV40 при условии, что включена последовательность длиной приблизительно 250 п. о., продолжающаяся от сайта Hind III в направлении сайта BglII, расположенного в точке начала репликации вируса SV40.

[84] Как правило, последовательность терминации транскрипции расположена в направлении 3'-конца относительно конца кодирующей области для полипептида, и она служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой фрагмент с высоким

содержанием G-C, за которым следует последовательность поли-Т. Хотя данную последовательность легко клонировать из библиотеки или даже приобрести в коммерческих источниках в качестве части вектора, ее также можно легко синтезировать с применением способов синтеза нуклеиновых кислот, известный специалистам в данной области техники.

[85] Ген селективируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, выращиваемой в селективной среде для культивирования. Типичные гены маркеров отбора кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, тетрациклину или канамицину в случае прокариотических клеток-хозяев; (b) восполняют ауксотрофные недостаточности у клетки; или (с) обеспечивают необходимые питательные вещества, не доступные из комплексной или определенной среды. Специфические селективируемые маркеры представляют собой ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Для отбора как прокариотических, так и эукариотических клеток-хозяев можно также с успехом применять ген устойчивости к неомицину.

[86] Для амплификации гена, который будет экспрессироваться, можно применять другие селективируемые гены. Амплификация представляет собой процесс, при котором гены, которые требуются для продуцирования белка, крайне важного для роста или выживания клеток, многократно повторяются в тандеме в хромосомах последовательных поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающего включают гены глутаминсинтазы (GS), дигидрофолатредуктазы (DHFR) и тимидинкиназы, не содержащие промоторов. Трансформантов, являющихся клетками млекопитающего, помещают в условия давления отбора, в которых только лишь трансформанты являются единственными адаптированными для выживания вследствие присутствия в векторе селективируемого гена. Давление отбора создают за счет культивирования трансформированных клеток в условиях, при которых концентрацию средства отбора в среде постепенно увеличивают, за счет чего обеспечивается амплификация как селективируемого гена, так и ДНК, которая кодирует представляющий интерес белок. В результате этого с амплифицированной ДНК синтезируются повышенные количества представляющего интерес полипептида.

[87] В некоторых случаях, например, если в системе экспрессии на основе эукариотической клетки-хозяина требуется гликозилирование, можно манипулировать с различными пре- или пропоследовательностями для улучшения гликозилирования или выхода. Например, можно изменять сайт расщепления пептидазой конкретного сигнального пептида или добавлять пропоследовательности, которые также могут воздействовать на гликозилирование. В положении -1 (относительно первой аминокислоты зрелого белка) конечного белкового продукта может находиться одна или несколько дополнительных аминокислот, образуемых в ходе экспрессии, которые могли быть не полностью удалены. Например, к аминоконцу конечного белкового продукта

могут быть прикреплены один или два аминокислотных остатка, находящиеся в сайте расщепления пептидазой. В качестве альтернативы применение некоторых сайтов расщепления ферментами может приводить к получению слегка усеченной формы требуемого полипептида, если фермент осуществляет разрез в такой области в пределах зрелого полипептида.

[88] Как правило, экспрессия и клонирование будут предусматривать промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, которая кодирует представляющий интерес белок. Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше (т. е. в направлении 5'-конца) относительно стартового кодона структурного гена (обычно в пределах приблизительно 100-1000 п. о.), которые регулируют транскрипцию структурного гена. Традиционно промоторы подразделяют на два класса: индуцируемые промоторы и конститутивные промоторы. Индуцируемые промоторы запускают повышенные уровни транскрипции с ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторое изменение в условиях культивирования, как, например, присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. С другой стороны, конститутивные промоторы приводят к постоянной транскрипции гена, с которым они функционально связаны, то есть осуществляют незначительный контроль над экспрессии гена или такой контроль отсутствует. Хорошо известно большое число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами.

[89] Подходящие промоторы для применения с клетками-хозяевами, являющимися клетками млекопитающего, хорошо известны, и они включают без ограничения промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы для клеток млекопитающего включают гетерологичные промоторы для клеток млекопитающего, например, промоторы генов белков теплового шока и промотор гена актина.

[90] Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают без ограничения: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, содержащийся в 3'-концевом длинном повторе вируса саркомы Рауса (Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797); промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH); промоторные и регуляторные последовательности из гена металлотионина (Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42) и прокариотические промоторы, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); или промотор *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Также представляют интерес следующие области транскрипционного контроля животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы в трансгенных

животных: регуляторная область гена эластазы I, активная в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift *et al.*, 1984, Cell 38:639-646; Ornitz *et al.*, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515; регуляторная область гена инсулина, активная в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); регуляторная область гена иммуноглобулина, активная в лимфоидных клетках (Grosschedl *et al.*, 1984, Cell 38:647-658; Adames *et al.*, 1985, Nature 318:533-538; Alexander *et al.*, 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); регуляторная область вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в клетках яичка, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder *et al.*, 1986, Cell 45:485-495); регуляторная область гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1:268-276); регуляторная область гена альфа-фетопротейна, которая активна в печени (Krumlauf *et al.*, 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, Science 253:53-58); регуляторная область гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1:161-171); регуляторная область гена бета-глобина, активная в миелоидных клетках (Mogam *et al.*, 1985, Nature 315:338-340; Kollias *et al.*, 1986, Cell 46:89-94); регуляторная область гена основного белка миелина, активная в олигодендроцитах в головном мозге (Readhead *et al.*, 1987, Cell 48:703-712); регуляторная область гена легкой цепи-2 миозина, активная в скелетных мышцах (Sani, 1985, Nature 314:283-286); и регуляторная область гена гонадотропного рилизинг-гормона, активная в гипоталамусе (Mason *et al.*, 1986, Science 234:1372-1378).

[91] Эхансерную последовательность можно вставлять в вектор для повышения транскрипции ДНК у высших эукариот. Эхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК длиной обычно приблизительно 10-300 п. о., которые воздействуют на промотор для повышения транскрипции. Эхансеры являются относительно независимыми от ориентации и положения, они были обнаружены в положениях в направлении как 5'-конца, так и 3'-конца относительно транскрипционной единицы. Известны некоторые эхансерные последовательности, полученные из генов млекопитающего (например, генов глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротейна и инсулина). Как правило, обычно применяют эхансер из вируса. Известные из уровня техники эхансер SV40, эхансер раннего промотора цитомегаловируса, эхансер вируса полиомы и эхансеры аденовируса представляют собой иллюстративные эхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Хотя эхансер может находиться в векторе как в направлении 5'-, так и 3'-конца относительно кодирующей последовательности, как правило, он расположен в 5'-сайте относительно промотора.

[92] Последовательность, кодирующая соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), может быть встроена в вектор экспрессии для содействия внеклеточной секреции представляющего интерес белка. Выбор сигнального пептида или лидерной последовательности зависит от типа клеток-хозяев, в которых должен продуцироваться представляющий интерес белок, а гетерологичная сигнальная

последовательность может замещать нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов, которые являются функциональными в клетках-хозяевах, являющихся клетками млекопитающего, включают следующее: сигнальную последовательность интерлейкина-7, описанную в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность рецептора интерлейкина-2, описанную в Cosman *et al.*, 1984, *Nature* 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в Европейском патенте № 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в Европейском патенте № 0460846.

[93] Дополнительные регуляторные последовательности, для которых было показано, что они улучшают экспрессию гетерологичных генов с векторов экспрессии для клеток млекопитающего, включают такие элементы, как увеличивающий экспрессию элемент последовательности (EASE), полученный из клеток CHO (Morris *et al.*, in *Animal Cell Technology*, pp. 529-534 (1997); патенты США №№ 6312951 B1, 6027915 и 6309841 B1) и РНК трехсоставной лидерной последовательности (TPL) и гена VA из аденовируса 2 (Gingeras *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:13475-13491). Последовательности внутреннего участка посадки рибосомы (IRES) вирусного происхождения обеспечивают эффективную трансляцию бицистронных мРНК (Oh and Sarnow, 1993, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:295-300; Ramesh *et al.*, 1996, *Nucleic Acids Research* 24:2697-2700).

[94] После сборки один или несколько векторов можно вводить в подходящую клетку для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформацию вектора экспрессии в выбранную клетку можно осуществлять хорошо известными способами, включая трансфекцию, инфекцию, совместное осаждение с фосфатом кальция, электропорацию, нуклеофекцию, микроинъекцию, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, доставку, опосредованную катионными липидами, трансфекцию, опосредованную липосомами, бомбардировку микрочастицами, доставку гена, опосредованную рецептором, доставку, опосредованную полилизинном, гистонном, хитозаном и пептидами. Выбранный способ отчасти будет зависеть от применяемого типа клетки-хозяина. Эти способы и другие подходящие способы хорошо известны специалисту в данной области техники и изложены в руководствах и других технических публикациях, например, в Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).

[95] Термин "трансформация" относится к изменению генетических характеристик клетки, и при этом клетка была трансформирована, в случае если она была модифицирована с тем, чтобы она содержала новую ДНК или РНК. Например, клетка является трансформированной, когда она генетически модифицирована по сравнению с ее нативным состоянием путем введения нового генетического материала посредством трансфекции, трансдукции или других методик. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может подвергаться рекомбинации с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки, или может временно сохраняться в виде

эписомального элемента без репликации, или может реплицироваться независимо в качестве плазмиды. Считается, что клетка была подвергнута "стабильной трансформации", если трансформирующая ДНК реплицируется при делении клетки.

[96] Термин "трансфекция" относится к поглощению клеткой чужеродной или экзогенной ДНК. Целый ряд методик трансфекции хорошо известен из уровня техники и раскрыт в данном документе. См., например, Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, выше; Davis *et al.*, 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197.

[97] Термин "трансдукция" относится к способу, при котором чужеродную ДНК вводят в клетку посредством вирусного вектора. См. Jones *et al.*, (1998). *Genetics: principles and analysis*. Boston: Jones & Bartlett Publ.

Описание процесса культивирования клеток

[98] В описанных в данном документе способах применение уменьшенных количеств IGF-1 или отсутствие IGF-1 можно осуществлять на любой стадии или на всех стадиях цикла производства. Иногда среда для культивирования клеток, используемая для продуцирования, упоминается в данном документе как вторая среда для культивирования клеток. Эта вторая среда для культивирования клеток не обязательно должна иметь ту же концентрацию IGF-1, что и первая среда для культивирования клеток. Вторая среда для культивирования клеток может иметь концентрацию IGF-1 0,05 мг/л или меньше, 0,03 мг/л или меньше, 0,02 мг/л или меньше, 0,01 мг/л или меньше или может не иметь IGF-1. Например, уровень IGF-1 может быть снижен до 0,03 мг/л или меньше в посевном масштабе, в производственном масштабе (N) или в любом промежуточном (например, N-1, N-2 и т. д.). В производственном масштабе уровень IGF-1 может быть снижен в исходной среде для культивирования клеток и/или перфузионной среде или среде для периодического культивирования с подпиткой, в зависимости от ситуации.

[99] Раскрытые способы применимы к адгезивной культуре или суспензионным культурам, выращенным в реакторах с перемешиванием (включая традиционные клеточные культуры периодического культивирования и периодического культивирования с подпиткой, которые могут, но не обязательно, предусматривать центробежный фильтр), перфузионных системах (включая культуры с переменным тангенциальным потоком ("ATF"), акустические перфузионные системы, перфузионные системы с глубинным фильтром и другие системы), волоконных биореакторах (HFB, которые в некоторых случаях могут быть использованы в перфузионных процессах), а также с помощью различных других способов культивирования клеток (см., например, Tao *et al.*, 2003, *Biotechnol. Bioeng.* 82:751-65; Kuystermans & Al-Rubeai, (2011) "Bioreactor Systems for Producing Antibody from Mammalian Cells" в Antibody Expression and Production, Cell Engineering 7:25-52, Al-Rubeai (ed) Springer; Catapano *et al.*, (2009) "Bioreactor Design and Scale-Up" в Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice, Eibl *et al.* (eds) Springer-Verlag, включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте).

[100] При продуцировании рекомбинантных белков требуется наличие контролируемой системы, в которой клетки выращивают до требуемой плотности, а затем физиологическое состояние клеток изменяют на состояние остановки роста, состояние высокой продуктивности, в котором клетки используют энергию и субстраты для продуцирования представляющего интерес рекомбинантного белка вместо того, чтобы обеспечивать большее количество клеток. Существуют различные способы достижения этой цели, включающие температурные сдвиги и аминокислотное голодание, а также применение ингибитора клеточного цикла или другой молекулы, которая может остановить рост клеток, не вызывая клеточной гибели.

[101] Получение рекомбинантного белка начинают с создания культуры продуцирующих клеток млекопитающего, которые экспрессируют белок, в планшете для культивирования, колбе, пробирке, биореакторе или другом подходящем сосуде. Обычно используют производственные биореакторы меньшего объема, в одном варианте осуществления биореакторы имеют объем от 500 л до 2000 л. В другом варианте осуществления используют биореакторы объемом от 1000 л до 2000 л. Плотность высеваемых клеток, используемых для инокуляции биореактора, может оказывать положительное влияние на уровень продуцируемого рекомбинантного белка. В одном варианте осуществления биореактор инокулируют от по меньшей мере $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ и более жизнеспособных клеток/мл в бессывороточной среде для культивирования. В другом варианте осуществления инокуляция составляет $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

[102] Затем клетки млекопитающего переходят в фазу экспоненциального роста. Культуру клеток можно поддерживать без дополнительной подпитки до достижения желаемой плотности клеток. В одном варианте осуществления культуру клеток поддерживают в течение трех дней с дополнительной подпиткой или без таковой. В другом варианте осуществления культура может быть инокулирована при требуемой плотности клеток для начала фазы продуцирования без короткой фазы роста. В любом из приведенных в данном документе вариантов осуществления переход от фазы роста к фазе продуцирования также может быть инициирован с помощью любого из вышеупомянутых способов.

[103] При переходе от фазы роста к фазе продуцирования и в ходе фазы продуцирования процентный объем осажденных клеток (% PCV) может быть равен 35% или меньше. Например, требуемый объем осажденных клеток, поддерживаемый во время фазы продуцирования, равен 35% или меньше, равен 30% или меньше, равен 20% или меньше, равен 15% или меньше или равен 10% или меньше.

[104] Требуемая плотность жизнеспособных клеток при переходе от фазы роста к фазе продуцирования и поддерживаемая в ходе фазы продуцирования может быть различной в зависимости от проектов. Она может быть определена на основании эквивалентного объема осажденных клеток из ранее полученных данных. Например, плотность жизнеспособных клеток может составлять от по меньшей мере приблизительно

10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от по меньшей мере приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 70×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от по меньшей мере приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 60×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от по меньшей мере приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 50×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от по меньшей мере приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 40×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от по меньшей мере приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от по меньшей мере приблизительно 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от по меньшей мере приблизительно 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл, от по меньшей мере приблизительно 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл до по меньшей мере приблизительно 25×10^6 жизнеспособных клеток/мл или по меньшей мере приблизительно 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

[105] Более низкий объем осажденных клеток в фазе продуцирования помогает смягчить проблемы, связанные с барботированием растворенным кислородом, которые могут препятствовать перфузионным культурам с более высокой плотностью клеток. Более низкий объем осажденных клеток также позволяет использовать меньший объем среды, что позволяет использовать меньшие сосуды для хранения среды и может сочетаться с более медленными скоростями потока. Более низкий объем осажденных клеток также оказывает меньшее влияние на сбор и последующую обработку по сравнению с культурами с большей биомассой клеток. Все это снижает затраты, ассоциированные с производством рекомбинантных белковых терапевтических средств.

[106] В коммерческих процессах получения рекомбинантных белков с помощью культуры клеток млекопитающего обычно используют три способа: периодическое культивирование, периодическое культивирование с подпиткой и перфузионное культивирование. Периодическое культивирование представляет собой прерывистый способ, при котором клетки выращивают в фиксированном объеме среды для культивирования в течение короткого периода времени с последующим полным сбором. В культурах, выращенных с использованием способа периодического культивирования, происходит увеличение плотности клеток до достижения максимальной плотности клеток, после чего происходит снижение плотности жизнеспособных клеток по мере расходования компонентов среды и накопления уровней побочных продуктов метаболизма (таких как лактат и аммиак). Сбор обычно происходит в момент достижения максимальной плотности клеток (например, 5×10^6 клеток/мл или больше, в зависимости от состава среды, линии клеток и т. д.). Периодический процесс является самым простым способом культивирования, однако плотность жизнеспособных клеток ограничивается доступностью питательных веществ, и как только клетки достигают максимальной плотности, культура уменьшается и продуцирование снижается. Нет возможности продлить фазу продуцирования, поскольку накопление продуктов жизнедеятельности и истощение питательных веществ быстро приводят к уменьшению культуры (обычно от

около 3 до 7 дней).

[107] Периодическое культивирование с подпиткой улучшает процесс периодического культивирования за счет обеспечения болюсных или непрерывных подпиток среды для восполнения тех компонентов среды, которые были потреблены. Поскольку периодические культуры с подпиткой получают дополнительные питательные вещества в течение всего цикла, они могут достигать более высоких плотностей клеток (от > 10 до 30×10^6 клеток/мл, в зависимости от состава среды, линии клеток и т. д.) и повышенных титров продукта по сравнению со способом периодического культивирования. В отличие от процесса периодического культивирования, двухфазную культуру можно создавать и поддерживать путем манипулирования стратегиями подпитки и составами сред для разделения периода пролиферации клеток для достижения требуемой плотности клеток (фаза роста) и периода приостановленного или медленного роста клеток (фаза продуцирования). Таким образом, периодические культуры с подпиткой могут достигать более высоких титров продукта по сравнению с периодическими культурами. Как правило, используют способ периодического культивирования в ходе фазы роста, а в ходе фазы продуцирования используют способ периодического культивирования с подпиткой, но стратегия периодического культивирования с подпиткой может быть использована на протяжении всего процесса. Однако, в отличие от процесса периодического культивирования, объем биореактора является лимитирующим фактором, который ограничивает количество подпитки. Кроме того, как и со способом периодического культивирования, накопление побочных продуктов метаболизма приводит к уменьшению культуры, что ограничивает продолжительность фазы продуцирования до приблизительно 10-21 дня. Периодические культуры с подпиткой являются прерывистыми, и сбор обычно осуществляют, когда уровни побочных продуктов метаболизма или жизнеспособность культуры достигают заранее установленных уровней. По сравнению с периодической культурой, в которой не осуществляют подпитку, периодическая культура с подпиткой может продуцировать большие количества рекомбинантного белка. См., например, патент США № 5672502.

[108] Перфузионные способы предлагают потенциальное улучшение по сравнению со способами периодического культивирования и периодического культивирования с подпиткой за счет добавления свежей среды и одновременного удаления отработанной среды. Типичные стратегии крупномасштабного коммерческого культивирования клеток направлены на достижение высоких плотностей клеток, $60-90(+)\times 10^6$ клеток/мл, при этом от почти трети до больше половины объема реактора составляет биомасса. С перфузионной культурой были достигнуты экстремальные значения плотности клеток $> 1 \times 10^8$ клеток/мл, и прогнозируют еще более высокие значения плотности. Типичные перфузионные культуры начинаются с запуска периодической культуры в течение одного-двух дней с последующим непрерывным, ступенчатым и/или прерывистым добавлением свежей питательной среды в культуру и одновременным удалением отработанной среды с сохранением клеток и дополнительных высокомолекулярных соединений, таких как белки

(на основании порога отсечения по молекулярной массе фильтра), на протяжении фаз роста и продуцирования культуры. Различные способы, такие как седиментация, центрифугирование или фильтрация, можно использовать для удаления отработанной среды при сохранении плотности клеток. Сообщали о значениях скорости перфузионного потока от доли рабочего объема в день до множества рабочих объемов в день.

[109] Преимущество перфузионного процесса заключается в том, что продуцирующую культуру можно поддерживать в течение более длительных периодов времени по сравнению со способами периодического культивирования или периодического культивирования с подпиткой. Однако необходимы более интенсивная подготовка, использование, хранение и утилизация сред для поддержания долговременной перфузионной культуры, особенно культур с высокими значениями плотности клеток, которым также требуется еще больше питательных веществ, и все это приводит к еще большему увеличению производственных затрат по сравнению со способами периодического культивирования или периодического культивирования с подпиткой. Кроме того, более высокие значения плотности клеток могут вызвать проблемы в процессе получения, такие как поддержание уровней растворенного кислорода и проблемы с повышенным газообразованием, включая подачу большего количества кислорода и удаление большего количества углекислого газа, что приведет к усилению пенообразования и необходимости внесения изменений в стратегии, которые предусматривают применение пеногасителя; а также во время сбора и последующей обработки, когда усилия, необходимые для удаления избыточного клеточного материала, могут привести к потере продукта, сводя на нет преимущества увеличения титра за счет увеличения массы клеток.

[110] Также представлена стратегия крупномасштабного культивирования клеток, которая сочетает подпитку периодического культивирования с подпиткой в ходе фазы роста с последующей непрерывной перфузией в ходе фазы продуцирования. Способ нацелен на фазу продуцирования, когда культуру клеток поддерживают при объеме осажденных клеток равном 35% или меньше.

[111] В одном варианте осуществления периодическую культуру с подпиткой и болюсные подпитки используют для поддержания клеточной культуры в ходе фазы роста. Перфузионную подпитку можно использовать в ходе фазы продуцирования. В одном варианте осуществления перфузию начинают, когда клетки достигают фазы продуцирования. В другом варианте осуществления перфузия начинается с приблизительно дня 3 до приблизительно дня 9 культивирования клеток. В другом варианте осуществления перфузия начинается с приблизительно дня 5 до приблизительно дня 7 культивирования клеток.

[112] Использование болюсной подпитки в ходе фазы роста позволяет клеткам перейти в фазу продуцирования, что приводит к меньшей зависимости от температурного сдвига как средства инициирования и контроля фазы продуцирования, однако между фазой роста и фазой продуцирования может происходить температурный сдвиг от

приблизительно 36°C до приблизительно 31°C. В одном варианте осуществления сдвиг составляет от 36°C до 32°C.

[113] Как описано в данном документе, биореактор может быть инокулирован от по меньшей мере $0,5 \times 10^6$ и до $3,0 \times 10^6$ и более жизнеспособных клеток/мл в бессывороточной среде культивирования, например, $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

[114] Перфузионная культура представляет собой культуру, в отношении которой в клеточную культуру вносят свежую перфузионную питательную среду с одновременным удалением истощенной среды. Перфузия может быть непрерывной, ступенчатой, прерывистой или представлять собой комбинацию любого или всех из перечисленного. Значения скорости перфузии могут составлять меньше рабочего объема для множества рабочих объемов в день. Клетки остаются в культуре, и истощенная среда, которую удаляют, по существу не содержит клеток или содержит значительно меньше клеток, чем культура. Рекомбинантные белки, экспрессированные культурой клеток, также могут быть сохранены в культуре. Перфузия может быть осуществлена с помощью ряда способов, включая центрифугирование, седиментацию или фильтрацию, см., например, Voisard *et al.*, 2003, *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. Примером способа фильтрации является фильтрация с попеременным тангенциальным потоком. Попеременный тангенциальный поток поддерживается за счет перекачивания среды через модули половолоконных фильтров. См., например, патент США № 6544424; Furey, 2002, *Gen. Eng. News*. 22 (7):62-63.

[115] "Скорость перфузионного потока" представляет собой количество среды, которое проходит (добавляется и удаляется) через биореактор, обычно выраженное в виде некоторой части рабочего объема или множества рабочих объемов за определенное время. "Рабочий объем" относится к объему биореактора, используемому для культивирования клеток. В одном варианте осуществления скорость перфузионного потока составляет один рабочий объем или меньше в день. Перфузионная питательная среда может быть составлена таким образом, чтобы максимизировать концентрацию питательных веществ для перфузии и минимизировать скорость перфузии.

[116] Культуры клеток могут быть дополнены концентрированной питательной средой, содержащей компоненты, такие как питательные вещества и аминокислоты, которые потребляются в ходе фазы продуцирования в культуре клеток.

[117] Концентрированная питательная среда может быть основана практически на любом составе среды для культивирования клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать большинство компонентов среды для культивирования клеток, например, в количестве приблизительно 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X или даже приблизительно 1000X от их нормального количества. Концентрированные питательные среды часто используют в процессах периодического культивирования с подпиткой.

[118] Способ по настоящему изобретению может быть использован для улучшения продуцирования рекомбинантных белков в процессах многофазного культивирования. В

многостадийном процессе клетки культивируют в двух или более различных фазах. Например, клетки можно культивировать сначала в одной или нескольких фазах роста, в условиях окружающей среды, обеспечивающих максимальную пролиферацию и жизнеспособность клеток, а затем переводить в фазу продуцирования в условиях, обеспечивающих максимальное продуцирование белка. В коммерческом процессе продуцирования белка клетками млекопитающего обычно имеется несколько, например, по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фаз роста, которые происходят в различных культуральных сосудах, предшествующих конечной продуцирующей культуре.

[119] Фазам роста и продуцирования могут предшествовать одна или несколько переходных фаз или эти фазы могут быть разделены ими. В многофазных процессах способ по настоящему изобретению можно применять по меньшей мере в ходе фазы роста и продуцирования конечной фазы продуцирования коммерческой культуры клеток, хотя его также можно применять на предшествующей фазе роста. Фазу продуцирования можно проводить в крупном масштабе. Крупномасштабный процесс можно проводить в объеме по меньшей мере приблизительно 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10000, 15000, 20000 литров. В одном варианте осуществления получение осуществляют в биореакторах объемом 500 л, 1000 л и/или 2000 л.

[120] Ростовая фаза может происходить при более высокой температуре, чем продуктивная фаза. Например, фаза роста может происходить при первой температуре от приблизительно 35°C до приблизительно 38°C, а фаза продуцирования может происходить при второй температуре от приблизительно 29°C до приблизительно 37°C, необязательно от приблизительно 30°C до приблизительно 36°C или от приблизительно 30°C до приблизительно 34°C. Кроме того, химические индукторы продуцирования белка, такие как, например, кофеин, бутират и гексаметилен-бисацетамид (НМВА), можно добавлять одновременно, до и/или после изменения температуры. Если индукторы добавляют после изменения температуры, их можно добавлять через промежуток времени от одного часа до пяти дней после изменения температуры, необязательно от одного до двух дней после изменения температуры. Культуры клеток можно поддерживать в течение нескольких дней или даже недель, пока клетки продуцируют требуемый(-ые) белок(-и).

[121] Образцы клеточной культуры можно контролировать и оценивать с использованием любых аналитических методик, известных в уровне техники. На протяжении культивирования можно контролировать ряд параметров, включая качество и характеристики рекомбинантного белка и среды. Образцы можно отбирать и контролировать периодически с требуемой частотой, включая непрерывный мониторинг, в режиме реального или близкого к реальному времени.

[122] Как правило, культуры клеток, предшествующие конечной продуцирующей культуре (N-x - N-1), используют для создания высеваемых клеток, которые будут использовать для инокуляции в производственном биореакторе, культуры N-1. Плотность

высеваемых клеток может оказывать положительное влияние на уровень продуцируемого рекомбинантного белка. Уровни продукта, как правило, повышаются с увеличением плотности посевного материала. Повышение титра связано не только с более высокой плотностью посевного материала, но и, вероятно, зависит от состояния метаболизма и клеточного цикла клеток, которые используют при продуцировании.

[123] Высеваемые клетки могут быть получены с помощью любого способа культивирования. Одним из таких способов является перфузионное культивирование с использованием фильтрации с попеременным тангенциальным потоком. Биореактор N-1 может быть запущен с использованием фильтрации с попеременным тангенциальным потоком для обеспечения клеток с высокой плотностью для инокуляции в производственном биореакторе. Стадию N-1 можно использовать для выращивания клеток до плотности $> 90 \times 10^6$ клеток/мл. Биореактор N-1 можно использовать для создания болюсных высеваемых культур или можно использовать в качестве раскачиваемой высеваемой исходной культуры, которую можно поддерживать для посева в несколько производственных биореакторов при высокой плотности высеваемых клеток. Продолжительность стадии роста может находиться в диапазоне от 7 до 14 дней и может быть рассчитана таким образом, чтобы поддерживать клетки при экспоненциальном росте до инокуляции в производственном биореакторе. Значения скорости перфузии, состав среды и время оптимизируют для выращивания клеток и доставки их в производственный биореактор в состоянии, наиболее благоприятном для оптимизации их получения. Значений плотности высеваемых клеток $> 15 \times 10^6$ клеток/мл можно достигнуть при высеивании в производственных биореакторах. Более высокие значения плотности высеваемых клеток при инокуляции могут обеспечить уменьшение или даже устранение времени, необходимого для достижения требуемой плотности при продуцировании.

[124] В определенных вариантах осуществления клетки-хозяева млекопитающего и способы по настоящему изобретению можно использовать для получения высокого значения выхода представляющего интерес белка. Высокое значение выхода или высокой объемной продуктивности означают способность клеток продуцировать высокие уровни представляющего интерес белка. Конкретное значение выхода будет зависеть от представляющего интерес белка и может составлять по меньшей мере 0,05 г/л, по меньшей мере 0,1 г/л, по меньшей мере 0,15 г/л, по меньшей мере 0,2 г/л, по меньшей мере 0,25 г/л, по меньшей мере 0,3 г/л, по меньшей мере 0,35 г/л, по меньшей мере 0,4 г/л, по меньшей мере 0,45 г/л, по меньшей мере 0,5 г/л, по меньшей мере 0,6 г/л, по меньшей мере 0,7 г/л, по меньшей мере 0,8 г/л, по меньшей мере 0,9 г/л, по меньшей мере 1 г/л, по меньшей мере 1,5 г/л, по меньшей мере 2 г/л или больше в 10-дневной культуре, выращенной в условиях периодического культивирования с подпиткой или перфузии, с использованием питательной среды, подходящей для клетки-хозяина млекопитающего и содержащей аминокислоты, витамины или микроэлементы, при этом содержащей пониженные количества или не содержащей IGF-1. В конкретных вариантах осуществления клетки-хозяева и способы по настоящему изобретению обеспечивают

экспрессию представляющего интерес белка и способны обеспечивать продуцирование по меньшей мере 0,5 г/л, по меньшей мере 0,6 г/л, по меньшей мере 0,7 г/л, по меньшей мере 0,8 г/л, по меньшей мере 0,9 г/л, по меньшей мере 1 г/л, по меньшей мере 1,5 г/л, по меньшей мере 2 г/л или более предпочтительно до приблизительно 3 г/л, 4 г/л, 5 г/л или 10 г/л при росте в условиях культивирования, описанных выше.

[125] Выход также может быть измерен в отношении удельной продуктивности линии клеток, определяемой на основе количества белка, продуцируемого на клетку в день (выраженного в пг/клетка/день). Клетки-хозяева млекопитающего по настоящему изобретению способны продуцировать по меньшей мере 1 пг/клетка/день, по меньшей мере 2 пг/клетка/день, по меньшей мере 3 пг/клетка/день, по меньшей мере 4 пг/клетка/день, по меньшей мере 5 пг/клетка/день, по меньшей мере 6 пг/клетка/день, по меньшей мере 7 пг/клетка/день, по меньшей мере 8 пг/клетка/день, по меньшей мере 9 пг/клетка/день, по меньшей мере 10 пг/клетка/день, по меньшей мере 11 пг/клетка/день, по меньшей мере 12 пг/клетка/день, по меньшей мере 13 пг/клетка/день, по меньшей мере 14 пг/клетка/день, по меньшей мере 15 пг/клетка/день, по меньшей мере 20 пг/клетка/день, по меньшей мере 25 пг/клетка/день или больше, предпочтительно до 50 пг/клетка/день в 10-суточной культуре, выращенной в условиях периодического культивирования с подпиткой или перфузии, с использованием питательной среды, подходящей для клетки-хозяина млекопитающего и содержащей аминокислоты, витамины или микроэлементы, при этом содержащей пониженные количества или не содержащей IGF-1. В конкретных вариантах осуществления клетки-хозяева млекопитающего по настоящему изобретению экспрессируют представляющий интерес белок и имеют удельную продуктивность по меньшей мере 10 пг/клетка/день, по меньшей мере 11 пг/клетка/день, по меньшей мере 12 пг/клетка/день, по меньшей мере 13 пг/клетка/день, по меньшей мере 14 пг/клетка/день, по меньшей мере 15 пг/клетка/день, по меньшей мере 20 пг/клетка/день, по меньшей мере 25 пг/клетка/день или больше, предпочтительно до 50 пг/клетка/день в описанных выше условиях культивирования.

[126] Способы, описанные в данном документе, могут быть использованы для культивирования клеток, экспрессирующих представляющий интерес белок. Экспрессируемый белок можно секретировать в среду для культивирования, из которой он может быть извлечен и/или собран. Кроме того, белки могут быть очищены или частично очищены из такой культуры или компонента (например, из среды для культивирования) с помощью известных процессов и продуктов, доступных от коммерческих поставщиков. Очищенные белки могут быть затем "составлены", то есть подвергнуты замене буфера, стерилизованы, расфасованы и/или упакованы для конечного пользователя. Подходящие составы для фармацевтических композиций включают те, которые описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

Представляющие интерес белки

[127] Представляющие интерес полипептиды и белки могут представлять научный

и коммерческий интерес, в том числе в качестве средств терапии на основе белков. Среди прочего, представляющие интерес белки включают секретируемые белки, несекретируемые белки, внутриклеточные белки или мембраносвязанные белки. Представляющие интерес полипептиды и белки можно получить с помощью рекомбинантных линий клеток животных с использованием способов культивирования клеток и их можно называть “рекомбинантными белками”. Экспрессируемый белок(белки) может продуцироваться внутри клетки или секретироваться в культуральную среду, из которой он может извлекаться и/или собираться. Термин "выделенный белок" или "выделенный рекомбинантный белок" относится к представляющему интерес полипептиду или белку, который очищен от белков или полипептидов или других загрязняющих веществ, которые могли бы помешать его терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или другому применению. Представляющие интерес белки включают белки, оказывающие терапевтическое воздействие путем связывания с мишенью, в частности с мишенью из перечисленных ниже, в том числе с мишенями, полученными из них, мишенями, родственными им, и их модификациями.

[128] Представляющие интерес белки включают "антигенсвязывающие белки". "Антигенсвязывающий белок" относится к белкам или полипептидам, содержащим антигенсвязывающую область или антигенсвязывающую часть, которая характеризуется аффинностью к другой молекуле (антигену), с которой она связывается. Антигенсвязывающие белки включают антитела, пептитела, фрагменты антител, производные антител, аналоги антител, слитые белки (включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFvs), двухцепочечные (двухвалентные) scFvs и IgGscFv (см., например, Orcutt *et al.*, 2010, *Protein Eng Des Sel* 23:221-228), гетеро-IgG (см., например, Liu *et al.*, 2015, *J Biol Chem* 290:7535-7562), мутеины и XmAb[®] (Xencor, Inc., Монровия, Калифорния). Примеры антигенсвязывающих белков включают человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, рекомбинантное антитело, одноцепочечное антитело, диатело, триатело, тетратело, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4 и их фрагменты. Также включены биспецифические привлекающие Т-клетки молекулы (BiTE[®]), биспецифические привлекающие Т-клетки молекулы с добавочными элементами, такими как добавочные элементы, увеличивающие период полужизни, например, HLE BiTE, HeteroIg BiTE и другие, химерные антигенные рецепторы (CAR, CAR T) и Т-клеточные рецепторы (TCR).

[129] Используемый в данном документе термин “антигенсвязывающий белок” используют в самом широком смысле и он означает белок, включающий часть, которая связывается с антигеном или мишенью, и необязательно остов или каркасную часть, что позволяет антигенсвязывающей части принимать конформацию, способствующую связыванию антигенсвязывающего белка с антигеном. Антигенсвязывающий белок может содержать, например, альтернативный белковый остов или искусственный остов с

привитыми CDR или производными CDR. Такие остовы включают без ограничения остовы, полученные из антител, содержащие мутации, введенные, например, для стабилизации трехмерной структуры антигенсвязывающего белка, а также полностью синтетические остовы, содержащие, например, биосовместимый полимер. См., например, Korndorfer *et al.*, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1):121-129; Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Кроме того, можно применять пептидные миметики антител ("РАМ"), а также остовы на основе миметиков антител, в которых в качестве остова используют фибронектиновые компоненты.

[130] Антигенсвязывающий белок может иметь, например, структуру встречающегося в природе иммуноглобулина. "Имуноглобулин" представляет собой тетрамерную молекулу. Во встречающемся в природе иммуноглобулине каждый тетрамер состоит из двух одинаковых пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, в первую очередь отвечающих за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, которая в первую очередь отвечает за эффекторную функцию. Человеческие легкие цепи классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon-цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно.

[131] Цепи встречающегося в природе иммуноглобулина проявляют одинаковую общую структуру из относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями или CDR. От N-конца к С-концу как легкие, так и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому домену может быть выполнено в соответствии с определениями Kabat *et al.* в *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, (1991). При желании CDR также могут быть предварительно определены в соответствии с альтернативной номенклатурной схемой, например, схемой Chothia (см. Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342:878-883, или Honegger and Pluckthun, 2001, *J. Mol. Biol.* 309:657-670).

[132] В контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий белок считается "специфически связывающим" или "селективно связывающим" свой целевой антиген, если константа диссоциации (K_D) составляет $\leq 10^{-8}$ М. Антитело специфически связывает антиген с "высокой аффинностью", если K_D составляет $\leq 5 \times 10^{-9}$ М, и с "очень высокой аффинностью", если K_D составляет $\leq 5 \times 10^{-10}$ М.

[133] Термин "антитело" включает обозначение как гликозилированных, так и негликозилированных иммуноглобулинов любого изотипа или подкласса или их антигенсвязывающей области, конкурирующей за специфическое связывание с интактным

антителом, если не указано иное. Кроме того, термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину или к его антигенсвязывающей части, которые конкурируют с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное. Антигенсвязывающие части могут быть получены с помощью методик рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител и могут составлять элемент представляющего интерес белка. Если не указано иное, антитела включают человеческие, гуманизированные, химерные, мультиспецифические, моноклональные, поликлональные, гетеро-IgG, биспецифические и олигомерные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Антитела включают типы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Также включены белки, имеющие антигенсвязывающий фрагмент или область, такую как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, диатела, Fd, dAb, макситела, молекулы одноцепочечных антител, однодоменные V_HH, фрагменты, являющиеся определяющей комплементарность областью (CDR), scFv, диатела, триатела, тетратела и полипептиды, содержащие по меньшей мере часть иммуноглобулина, которой достаточно для придания антигенсвязывающую специфичность в отношении полипептида-мишени.

[134] Антигенсвязывающий белок может иметь один или несколько сайтов связывания. Если имеется более одного сайта связывания, сайты связывания могут быть идентичными друг другу или отличаться. Например, встречающийся в природе иммуноглобулин человека обычно имеет два идентичных сайта связывания, в то время как "биспецифическое" или "бифункциональное" антитело имеет два разных сайта связывания.

[135] Fab-фрагмент представляет собой одновалентный фрагмент, имеющий домены V_L, V_H, C_L и C_H1; а F(ab')₂-фрагмент представляет собой двухвалентный фрагмент, имеющий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент имеет домены V_H и C_H1; Fv-фрагмент имеет домены V_L и V_H одного плеча антитела; dAb-фрагмент имеет домен V_H, домен V_L или антигенсвязывающий фрагмент домена V_H или V_L (патенты США №№ 6846634, 6696245, публикации патентных заявок США №№ 2005/0202512, 2004/0202995, 2004/0038291, 2004/0009507, 2003/0039958, Ward *et al.*, 1989, *Nature* 341:544-546).

[136] Одноцепочечное антитело (scFv) представляет собой антитело, в котором область V_L и V_H соединены через линкер (например, синтетическую последовательность аминокислотных остатков) с образованием непрерывной белковой цепи, где линкер достаточно длинный, чтобы обеспечить для белковой цепи возможность самосворачивания и образования одновалентного антигенсвязывающего сайта (см., например, Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-26 and Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83), патенты США №№ 7741465 и 6319494, а также Eshhar *et al.*, 1997, *Cancer Immunol Immunotherapy* 45:131-136. ScFv сохраняет способность исходного антитела специфически взаимодействовать с антигеном-мишенью.

[137] Диатела представляют собой двухвалентные антитела, включающие две полипептидных цепи, где каждая полипептидная цепь содержит домены V_H и V_L,

соединенные линкером, который слишком короткий, чтобы позволить образование пар между двумя доменами на одной цепи, что позволяет каждому домену образовывать пару с комплементарным доменом на другой полипептидной цепи (см., например, Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48; и Poljak *et al.*, 1994, *Structure* 2:1121-23). Если две полипептидные цепи диатела являются идентичными, то диатело, полученное в результате их спаривания, будет иметь два идентичных антигенсвязывающих сайта. Полипептидные цепи с разными последовательностями могут быть использованы для получения диатела с двумя разными антигенсвязывающими сайтами. Аналогичным образом, триатела и тетратела представляют собой антители, включающие три и четыре полипептидных цепи соответственно, и образующие три и четыре антигенсвязывающих сайта соответственно, которые могут быть одинаковыми или разными.

[138] Для ясности, как описано в данном документе, следует отметить, что антигенсвязывающий белок может, но не обязательно, быть человеческого происхождения (например, человеческое антители), и в некоторых случаях будет включать отличный от человеческого белок, например, крысиный или мышинный белок, и в других случаях антигенсвязывающий белок может включать гибрид человеческого и отличного от человеческого белков (например, гуманизированное антители).

[139] Представляющий интерес белок может включать человеческое антители. Термин "человеческое антители" включает все антители, имеющие одну или несколько переменных и константных областей, полученных из последовательностей иммуноглобулинов человека. В одном варианте осуществления все переменные и константные домены получены из последовательностей иммуноглобулинов человека (полностью человеческое антители). Такие антители могут быть получены различными путями, включая иммунизацию представляющим интерес антигеном мыши, генетически модифицированной для экспрессии антители, полученных из генов, кодирующих тяжелую и/или легкую цепи человека, например, мыши, полученной из системы Xenomouse[®], UltiMab[™] или Velocimmune[®], или крысы, полученной из UniRat[®]. Также можно использовать подходы на основе фагов.

[140] В качестве альтернативы, представляющий интерес белок может включать гуманизированное антители. "Гуманизированное антители" имеет последовательность, которая отличается от последовательности антителя, полученного от отличного от человека вида, одной или несколькими аминокислотными заменами, делециями и/или добавлениями, так что гуманизированное антители с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее выраженный иммунный ответ по сравнению с антителим отличного от человека вида при его введении субъекту-человеку. В одном варианте осуществления определенные аминокислоты в каркасных и константных доменах тяжелой и/или легкой цепей антителя отличного от человека вида подвергаются мутации с получением гуманизированного антителя. В другом варианте осуществления константный(-ые) домен(-ы) из человеческого антителя сливаются с переменным(-ыми) доменом(-ами) отличного от человека вида. Примеры получения гуманизированных

антител можно найти в патентах США №№ 6054297, 5886152 и 5877293.

[141] Также включены модифицированные белки, такие как белки, модифицированные химически с помощью нековалентной связи, ковалентной связи или как ковалентной, так и нековалентной связи. Также включены белки, дополнительно содержащие одну или несколько посттрансляционных модификаций, которые могут выполняться клеточными системами внесения модификаций, или модификаций, вносимых *ex vivo* с помощью ферментативных и/или химических способов или вносимых другими путями.

[142] Представляющие интерес белки также могут включать рекомбинантные слитые белки, содержащие, например, домен мультимеризации, такой как лейциновая застежка, суперспираль, Fc-часть иммуноглобулина и т. п. Также включены белки, содержащие все или часть аминокислотных последовательностей антигенов дифференцировки (называемых белками CD) или их лигандов, или белки, практически аналогичные одному из них.

[143] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес белки могут включать колониестимулирующие факторы, такие как колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF). Такие средства на основе G-CSF включают без ограничения Neupogen® (филграстим) и Neulasta® (пэгфилграстим). Также включены средства, стимулирующие эритропоэз (ESA), такие как Erogen® (эпоэтин альфа), Aranesp® (дарбэпоэтин альфа), Дунеро® (эпоэтин дельта), Mircera® (метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета), Hematide®, MRK-2578, INS-22, Retacrit® (эпоэтин дзета), Neorecormon® (эпоэтин бета), Silapo® (эпоэтин дзета), Binocrit® (эпоэтин альфа), эпоэтин альфа Hexal, Abseamed® (эпоэтин альфа), Ratioepo® (эпоэтин тета), Eporatio® (эпоэтин тета), Biopoin® (эпоэтин тета), эпоэтин альфа, эпоэтин бета, эпоэтин дзета, эпоэтин тета и эпоэтин дельта, эпоэтин омега, эпоэтин йота, тканевой активатор плазминогена, агонисты рецептора GLP-1, а также молекулы на их основе или их варианты или аналоги и биоаналоги любого из вышеперечисленного.

[144] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес белки могут включать белки, которые специфически связываются с одним или несколькими белками CD, белками семейства рецепторов HER, молекулами клеточной адгезии, факторами роста, факторами роста нервов, факторами роста фибробластов, трансформирующими факторами роста (TGF), инсулиноподобными факторами роста, остеоиндуктивными факторами, инсулином и родственными инсулину белками, белками коагуляции и связанными с коагуляцией белками, колониестимулирующими факторами (CSF), другими белками крови и сыворотки крови, антигенами групп крови; рецепторами, рецептор-ассоциированными белками, гормонами роста, рецепторами гормона роста, Т-клеточными рецепторами; нейротрофическими факторами, нейротрофинами, релаксинами, интерферонами, интерлейкинами, вирусными антигенами, липопротеинами, интегринами, ревматоидными факторами, иммунотоксинами, поверхностными мембранными белками, транспортными белками, "хоминг"-рецепторами, адресинами, регуляторными белками и

иммуноадгезинами.

[145] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес белки связываются с одним или несколькими из следующего, по отдельности или в любой комбинации: белков CD, в том числе без ограничения CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD70, CD123, CD133, CD138, CD171 и CD174, белков семейства рецепторов HER, в том числе, например, HER2, HER3, HER4 и рецептора EGF, EGFRvIII, молекул клеточной адгезии, например, LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM и интегрина альфа-V/бета-3, факторов роста, в том числе без ограничения, например, фактора роста эндотелия сосудов ("VEGF"); VEGFR2, гормона роста, тиреостимулирующего гормона, фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, рилизинг-фактора гормона роста, паратиреоидного гормона, мюллерова ингибирующего фактора, воспалительного белка макрофагов человека (MIP-1-альфа), эритропоэтина (EPO), фактора роста нервов, такого как NGF-бета, тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора роста фибробластов, в том числе, например, aFGF и bFGF, эпидермального фактора роста (EGF), Cripto, трансформирующих факторов роста (TGF), в том числе, помимо прочего, TGF- α и TGF- β , в том числе TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 или TGF- β 5, инсулиноподобных факторов роста I и -II (IGF-I и IGF-II), des(1-3)-IGF-I (мозгового IGF-I) и остеоиндуктивных факторов, инсулинов и родственных инсулину белков, в том числе без ограничения инсулина, А-цепи инсулина, В-цепи инсулина, проинсулина и белков, связывающих инсулиноподобные факторы роста; белков коагуляции и связанных с коагуляцией белков, таких как, среди прочего, фактор VIII, тканевой фактор, фактор фон Виллебранда, протеин С, альфа-1-антитрипсин, активаторы плазминогена, такие как урокиназа и тканевой активатор плазминогена ("t-PA"), бомбазин, тромбин, тромбopoэтин и рецептор тромбopoэтина, колониестимулирующих факторов (CSF), в том числе следующих, среди прочего: M-CSF, GM-CSF и G-CSF, других белков крови и сыворотки крови, в том числе без ограничения альбумина, IgE и антигенов групп крови, рецепторов и рецептор-ассоциированных белков, в том числе, например, рецептора flk2/flt3, рецептора ожирения (OB), рецепторов гормона роста и Т-клеточных рецепторов; нейротрофических факторов, в том числе без ограничения нейротрофического фактора костной ткани (BDNF) и нейротрофина-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT-6); А-цепи релаксина, В-цепи релаксина и прорелаксина, интерферонов, в том числе, например, интерферонов-альфа, -бета и -гамма, интерлейкинов (IL), например, IL-1 - IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-23, IL-12/IL-23, IL-2Ra, IL1-R1, рецептора IL-6, рецептора IL-4 и/или рецептора IL-13-IL-13RA2, или рецептора IL-17, IL-1RAP; вирусных антигенов, в том числе без ограничения оболочечного антигена вируса AIDS, липопротеинов, кальцитонина, глюкагона, предсердного натрийуретического фактора, легочного сурфактанта, факторов некроза опухоли альфа и бета, энкефалиназы, BCMA, каппа-цепи Ig, ROR-1, ERBB2, мезотелина, RANTES (белка, регулируемого при активации, экспрессируемого и секретируемого нормальными Т-клетками), мышинового гонадотропин-ассоциированного пептида, ДНКазы,

FR-альфа, ингибина и активина, интегрин, белка А или D, ревматоидных факторов, иммунотоксиков, костного морфогенетического белка (BMP), супероксиддисмутазы, поверхностных мембранных белков, фактора ускорения распада (DAF), оболочки вируса AIDS, транспортных белков, хоминг-рецепторов, MIC (MIC-A, MIC-B), ULBP 1-6, EPCAM, адрессинов, регуляторных белков, иммуноадгезинов, антигенсвязывающих белков, соматропина, CTGF, CTLA4, зотаксина-1, MUC1, CEA, c-MET, клаудина-18, GPC-3, EPHA2, FPA, LMP1, MG7, NY-ESO-1, PSCA, ганглиозида GD2, ганглиозида GM2, BAFF, OPGL (RANKL), миостатина, Dickkopf-1 (DKK-1), Ang2, NGF, рецептора IGF-1, фактора роста гепатоцитов (HGF), TRAIL-R2, c-Kit, B7RP-1, PSMA, NKG2D-1, белка 1 запрограммированной гибели клеток и его лиганда - PD1 и PDL1, комплекса маннозный рецептор/hCG β , вируса гепатита С, конъюгата мезотелина и (dsFv)PE38, **Legionella pneumophila (Ily)**, IFN-гамма, интерферон-гамма-индуцированного белка 10 (IP10), IFNAR, TALL-1, тимусного стромального лимфопоэтина (TSLP), пропротеинконвертазы субтилизин/кексин 9 типа (PCSK9), факторов стволовых клеток, Flt-3, пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP), OX40L, $\alpha\beta 7$, белка, специфичного к тромбоцитам (гликопротеину тромбоцитов IIb/IIIb) (PAC-1), трансформирующего фактора роста бета (TFG β), белка 3 блестящей оболочки, связывающего сперматозоиды (ZP-3), TWEAK, рецептора тромбоцитарного фактора роста альфа (PDGFR α), склеростина и биологически активных фрагментов или вариантов любых из вышеперечисленных, нейтрализуют их и/или взаимодействуют с ними.

[146] В другом варианте осуществления представляющие интерес белки включают абциксимаб, адалимумаб, адекатумумаб, афлиберцепт, алемтузумаб, алирокумаб, анакинру, атацицепт, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, биосозумаб, блинатумомаб, брентуксимаб ведотин, бродалумаб, кантузумаб мертанзин, канакинумаб, цетуксимаб, цертолизумаб пегол, конатумумаб, даклизумаб, деносумаб, экулизумаб, эдреколомаб, эфализумаб, эпратузумаб, этанерцепт, эволокумаб, галиксимаб, ганитумаб, гемтузумаб, голимумаб, ибритумомаб тиуксетан, инфликсимаб, ипилимумаб, лерделимумаб, люмиликсимаб, иксекизумаб, мапатумумаб, мотесаниб дифосфат, муромонаб-CD3, натализумаб, несиритид, нимотузумаб, ниволумаб, окрелизумаб, офатумумаб, омализумаб, опрелвекин, паливизумаб, панитумумаб, пембролизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, ранибизумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, ромиплостим, ромосозумаб, саргамостим, тоцилизумаб, тозитумомаб, трастузумаб, устекинумаб, ведолизумаб, визилизумаб, волоциксимаб, занолимумаб, залутумумаб и биоаналоги любого из вышеперечисленного.

[147] Представляющие интерес белки в соответствии с настоящим изобретением включают все из вышеперечисленных и дополнительно включают антитела, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 определяющих комплементарность областей (CDR) из любого из вышеупомянутых антител. Для получения антигенсвязывающего белка одна или несколько CDR могут быть включены в молекулу либо ковалентно, либо нековалентно. Антигенсвязывающий белок может включать CDR в виде части более длинной

полипептидной цепи, может ковалентно связывать CDR с другой полипептидной цепью или может включать CDR нековалентно. CDR позволяют антигенсвязывающему белку специфически связываться с конкретным представляющим интерес антигеном. Также включены варианты, содержащие область, которая на 70% или больше, в частности на 80% или больше, в частности на 90% или больше, еще более конкретно на 95% или больше, в частности на 97% или больше, в частности на 98% или больше, еще более конкретно на 99% или больше идентична по аминокислотной последовательности эталонной аминокислотной последовательности представляющего интерес белка. Для этого идентичность может определяться с использованием разнообразного хорошо известного и легкодоступного программного обеспечения для анализа аминокислотных последовательностей. Предпочтительное программное обеспечение включает программное обеспечение, в котором реализованы алгоритмы Смита-Уотермана, которые считаются удовлетворительным решением проблемы поиска и выравнивания последовательностей. Могут также использоваться другие алгоритмы, в частности тогда, когда важным критерием является скорость. Обычно используемые программы для выравнивания и определения гомологичного соответствия ДНК, РНК и полипептидов, которые можно использовать в этой связи, включают FASTA, TFASTA, BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN, PROSRCH, BLAZE и MPSRCH, причем последняя является реализацией алгоритма Смита-Уотермана для исполнения на массово-параллельных процессорах, изготавливаемых MasPar.

[148] Представляющие интерес белки могут также включать рецепторы, полученные методами генной инженерии, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR или CAR-T) и Т-клеточные рецепторы (TCR), а также другие белки, содержащие антигенсвязывающую молекулу, которая взаимодействует с таким антигеном-мишенью. CAR можно сконструировать так, чтобы они связывались с антигеном (таким как антиген клеточной поверхности), путем встраивания антигенсвязывающей молекулы, которая взаимодействует с таким антигеном-мишенью. Как правило, CAR включают антигенсвязывающий домен (такой как scFv) вместе с одним или несколькими костимулирующими ("сигнальными") доменами и одним или несколькими активирующими доменами.

[149] Предпочтительно, антигенсвязывающая молекула представляет собой фрагмент такого антитела и более предпочтительно один или несколько одноцепочечных фрагментов антитела ("scFv"). scFv являются предпочтительными для использования в химерных антигенных рецепторах, поскольку их можно конструировать так, чтобы они экспрессировались как часть единой цепи вместе с другими компонентами CAR. See Krause *et al.*, 1988, *J. Exp. Med.*, 188(4): 619-626; Finney *et al.*, 1998, *J Immunol* 161: 2791-2797.

[150] Химерные антигенные рецепторы включают один или несколько костимулирующих (сигнальных) доменов для повышения их активности. См. патенты США №№ 7741465 и 6319494, а также Krause *et al.* и Finney *et al.* (выше), Song *et al.*, 2012,

Blood 119:696-706; Kalos *et al.*, 2011, *Sci Transl. Med.* 3:95; Porter *et al.*, 2011, *N. Engl. J. Med.* 365:725-33, и Gross *et al.*, 2016, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56:59-83. Подходящие костимулирующие домены могут быть получены, помимо других источников, из CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD 33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированного антигена-1 лимфоцитов (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член суперсемейства факторов некроза опухолей 14; TNFSF14), NKG2C, Ig-альфа (CD79a), DAP-10, Fc-гамма-рецептора, молекулы МНС класса I, TNF, TNFr, интегрин, сигнальной молекулы активации лимфоцитов, BTLA, рецептора лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL-2R-бета, IL-2R-гамма, IL-7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, 41-BB, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда CD83 или их фрагментов или комбинаций. Костимулирующий домен может содержать одну или несколько из внеклеточной части, трансмембранной части и внутриклеточной части.

[151] CAR также включают один или несколько активирующих доменов. CD3-дзета является элементом T-клеточного рецептора на нативных T-клетках, и было показано, что он является важным внутриклеточным активирующим элементом в CAR.

[152] CAR представляют собой трансмембранные белки, содержащие внеклеточный домен, как правило, содержащий антигенсвязывающий белок, который способен распознавать и связываться с представляющим интерес антигеном, а также включающий "шарнирную" область. Кроме того, есть трансмембранный домен и внутриклеточный (цитоплазматический) домен.

[153] Внеклеточный домен имеет значение для передачи сигналов и для эффективного ответа лимфоцитов на антиген из любого белка, описанного в данном документе, или любой их комбинации. Внеклеточный домен может быть получен либо из синтетического, либо из природного источника, такого как белки описанные в данном документе. Внеклеточные домены часто содержат шарнирную часть. Она представляет собой часть внеклеточного домена, иногда называемую "спейсерной" областью. Шарниры могут быть получены из белков, описанных в данном документе, в частности костимулирующих белков, описанных выше, а также последовательностей иммуноглобулинов (Ig) или других подходящих молекул для достижения требуемого специфического расстояния от клетки-мишени.

[154] Трансмембранный домен может быть слит с внеклеточным доменом CAR.

Аналогичным образом, он может быть слит со внутриклеточным доменом CAR. Трансмембранный домен может быть получен либо из синтетического, либо из природного источника, такого как белки, описанные в данном документе, в частности костимулирующие белки, описанные выше.

[155] Внутриклеточный (цитоплазматический) домен может быть слит с трансмембранным доменом и может обеспечивать активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки. Эффекторной функцией Т-клетки может быть, например, цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов. Внутриклеточные домены могут быть получены из белков, описанных в данном документе, в частности из CD3.

[156] "Fc"-область, как этот термин используется в данном документе, содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены C_H2 и C_H3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и посредством гидрофобных взаимодействий доменов C_H3. Представляющие интерес белки, включающие Fc-область, в том числе антигенсвязывающие белки и слитые белки на основе Fc, составляют еще один аспект настоящего изобретения.

[157] "Гемитело" представляет собой иммунологически функциональную иммуноглобулиновую конструкцию, включающую полную тяжелую цепь, полную легкую цепь и вторую Fc-область тяжелой цепи, образующую пару с Fc-областью полной тяжелой цепи. Для соединения Fc-области тяжелой цепи и второй Fc-областью тяжелой цепи можно, но не обязательно, использовать линкер. В конкретных вариантах осуществления гемитело представляет собой одновалентную форму антигенсвязывающего белка, раскрытого в данном документе. В других вариантах осуществления пары заряженных остатков можно использовать для связывания одной Fc-области со второй Fc-областью. Гемитело может быть представляющим интерес белком в контексте настоящего изобретения.

[158] Для получения полинуклеотидов, полипептидов, векторов, клеток-хозяев, иммунных клеток, композиций и т. п. в соответствии с настоящим изобретением можно использовать целый ряд известных методик.

[159] Настоящее изобретение не должно ограничиваться по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе, которые подразумеваются в качестве отдельных иллюстраций индивидуальных аспектов настоящего изобретения, и функционально эквивалентные способы и компоненты находятся в пределах объема настоящего изобретения. Безусловно, специалистам в данной области техники из предшествующего описания и сопроводительных графических материалов станут очевидны различные модификации настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе. Предусмотрено, что такие изменения попадают в объем приложенной формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

[160] Для стандартного культивирования клетки выращивали в суспензии на селективной среде. Культуры поддерживали в вентилируемых колбах Эрленмейера объемом 125 мл или 250 мл (Corning Life Sciences, Лоуэлл, Массачусетс), вентилируемых центрифужных пробирках объемом 50 мл (TPP, Тразединген, Швейцария) или планшетах с 24 глубокими лунками Axugen[®] (Axugen, Юнион-Сити, Калифорния) при 36°C, 5% CO₂ и 85% относительной влажности. Колбы Эрленмейера встряхивали при 120 об./мин. с диаметром орбиты 25 мм в автоматическом инкубаторе большой емкости с CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс), а центрифужные пробирки встряхивали при 225 об./мин. с диаметром орбиты 50 мм в инкубаторе ISF4-X большой емкости (Kuhner AG, Базель, Швейцария).

Адаптация клеток-хозяев CHO GSKO к среде без IGF-1

[161] Линии нокаутных по глутаминсинтетазе (GSKO) клеток-хозяев адаптировали к среде без IGF-1 (Long R3 IGF-1). Эти клетки-хозяева адаптировали с использованием двух разных способов. Первый способ заключался в постепенной адаптации к проприетарной среде без IGF-1 (Long R3 IGF-1). Эта среда не является стандартной неселективной средой для клеток-хозяев GSKO, поэтому сначала клетки адаптировали к другой проприетарной среде, содержащей 100% IGF-1 (Long R3 IGF-1), а затем постепенно убрали IGF-1 при следующих интервалах: 75%, 50%, 25%, 10% и, наконец, отсутствие IGF-1. Период адаптации занимал более 110 уровней удвоения популяции (PDL). См. фигуру 1А. Эти адаптированные линии клеток работали не так хорошо, как исходные хозяева с IGF-1 (данные не показаны), возможно, из-за разной осмолярности проприетарной среды. Таким образом, эти клетки переводили обратно на неселективную среду платформы для хозяев GSKO без IGF-1. Всех этих хозяев помещали в банк и клонировали из одной клетки с помощью прибора Berkeley Lights (BLI) Veacon. Всего получали 158 клонов.

[162] Второй способ представлял собой непосредственную адаптацию. Линии клеток-хозяев GSKO непосредственно адаптировали к проприетарной среде без IGF-1. Всех этих хозяев помещали в банк и клонировали из одной клетки с помощью прибора Berkeley Lights (BLI) Veacon. Полное восстановление заняло ~1,5 месяца. См. фигуру 1В. Всего получали 44 клон.

Клонирование из одной клетки с использованием процедуры Berkeley Lights

[163] Для получения банка клонально полученных клеток адаптированные к IGF⁻ линии клеток клонировали из одной клетки с использованием прибора Veacon (Berkeley Lights, Эмеривилл, Калифорния) в определенных условиях. Проприетарную среду без Long R3 IGF-1 использовали для клонирования из одной клетки и масштабирования для обоих хозяев. Прибор Veacon представляет собой миниатюризованную платформу для культивирования клеток, которая позволяет манипулировать отдельными клетками, культивировать клетки и анализировать производительность. На этом приборе клетки культивируют изолированно на наноструйном чипе, состоящем из более чем 1000 отдельных сосудов, называемых "наноручками", при контролируемой температуре,

стерильной окружающей среде и непрерывной перфузии ростовой среды. Ламинарный поток поддерживают в течение всего периода культивирования, чтобы исключить перекрестное загрязнение. Технология Opto-Electro Positioning (OEP) позволяет манипулировать клетками, используя активируемые светом поверхностные транзисторы для создания локализованного электрического заряда для отталкивания клеток. С помощью OEP отдельные клетки аккуратно вводят и выводят из наноручек. Встроенные возможности микроскопии позволяют проводить визуализацию живых клеток, загрузку отдельных клеток, визуализацию и экспорт культур, а также автоматизированы и контролируются с помощью программного обеспечения, что обеспечивает возможность отслеживания. Клонов отдельных клеток проверяли на происхождение из одной клетки с использованием повторной микроскопической визуализации на приборе. См. Le et al., 2020, *Biotech J* 15:1900247, и Le et al., 2018, *Biotechnol Prog* 34:1438-1446.

[164] Для линий клеток IGF⁻ на фоне GSKO пулы неклональных клеток импортировали в новый наноструйный чип и выделяли отдельные клетки в отдельные наноручки с использованием OEP. Интегрированную микроскопическую визуализацию использовали для идентификации наноручек, содержащих клетки, происходящие из одной клетки. Клоны культивировали в отдельных наноручках в течение 3 дней. Затем наноручки анализировали на предмет роста. Клеточные популяции проверяли на клональное происхождение и отбирали по различным профилям роста. Отобранные клоны независимо переносили с чипа в отдельные лунки 96-луночного микротитровального планшета. Стадии строгого контроля качества встроены в этот подход для обеспечения отсутствия перекрестного загрязнения. Статистическое определение клонального происхождения демонстрирует высокую гарантию выделения клонально полученной линии клеток. См. Le et al., 2020, *Biotech J* 15:1900247.

[165] После экспорта полученные из отдельных клеток линии клеток масштабировали с использованием проприетарной (+gln) неселективной ростовой среды без Long R3 IGF-1. Линии клеток пересеивали до достижения > 90% жизнеспособности и стабилизации роста. Затем линии клеток переводили в неселективную ростовую среду без Long R3 IGF-1 и DMSO и замораживали для длительного хранения при < -80°C.

[166] Время удвоения адаптированных полученных из одной клетки хозяев GSKO-IGF составляло 24 часа (фигура 3A-B). Полученных из одной клетки хозяев для дальнейшей оценки сначала отсеивали на основании результатов строгой оценки трансфекции/периодического культивирования с подпиткой, а затем дополнительно оценивали путем трансфекции с помощью удобного моноклонального антитела в качестве оценки в 10-15-суточном периодическом культивировании с подпиткой.

Пример 2

[167] Способность этих IGF⁻ адаптированных клеток-хозяев расти и экспрессировать терапевтические средства в отсутствие добавки IGF-1 тестировали в экспериментах по трансфекции и получения путем 10D - 15D FB (10-15-суточного периодического культивирования с подпиткой).

Трансфекция и восстановление молекул тестируемых моноклональных антител в клонированные из одной клетки IGF- адаптированных линий клеток на фоне CS9 GSKO

[168] IGF⁻ адаптированных хозяев GSKO тестировали путем трансфекции и оценки периодического культивирования с подпиткой в экспериментальной проверке концепции с благоприятными результатами до клонирования из одной клетки (данные не показаны). IGF⁻ клонированные из одной клетки адаптированные линии клеток на фоне GSKO трансфицировали кольцевой плазмидой pGS1.1PB для удобного моноклонального антитела в дополнение к плазмиде, содержащей проприетарную транспозазу ILT, с использованием протокола электропорации с длительной продолжительностью действия платформы. Трансфицированные линии клеток восстанавливали в проприетарной неселективной среде без Long R3 IGF-1 в течение 3 суток при 36°C и 5% CO₂. Трансфицированные клетки пересеивали каждые 3-4 суток в проприетарной среде+25 мкМ в селективной ростовой среде MSX (-глутамин) без Long R3 IGF-1 при 36°C и 5% CO₂ до восстановления > 90%. (Фигура 3). Затем эти линии IGF⁻ клеток GSKO оценивали в цикле 15D периодического культивирования с подпиткой.

Получение культуры клеток путем периодического культивирования с подпиткой

[169] Выполняли 15-дневное периодическое культивирование с подпиткой для оценки роста и продуктивности линий трансфицированных клеток, адаптированных к среде без Long R3 IGF-1 на фоне GSKO. Культуры высевали из расчета 3×10^6 клеток/мл (на основе GSKO) в базальную среду для продуцирования без Long R3 IGF-1 и подпитку дополнительными питательными веществами осуществляли в дни 3, 6, 8, 10 и 13 для культур GSKO. Культуры GSKO собирали в день 15, или когда жизнеспособность снижалась до 50-60% (фигуры 4A-D). Полученные надосадочные жидкости анализировали на титр (HPLC с белком A).

[170] Трансфицированные линии клеток демонстрировали различные уровни роста и продуктивности, при этом некоторые из них попадали в диапазон линий клеток GSKO с IGF-1.

Пример 3

[171] Способность этих IGF⁻ адаптированных клеток-хозяев расти и экспрессировать терапевтические средства различных способов воздействия в отсутствие добавления IGF-1 тестировали в экспериментах по трансфекции и получению путем 10D - 15D FB (10-15-суточного периодического культивирования с подпиткой) с использованием способов примера 2, за исключением использования других кольцевых совместимых ITR-содержащих векторов piggyBAC. Средние значения получали из экспериментов, проводимых в двух повторностях. NA означает, что культуры уже были собраны, поэтому данные отсутствуют.

[172] ViTE представляет собой биспецифическую привлекающую T-клетки молекулу.

[173] Слияние представляет собой слитый белок.

День 10	0,24	0,12	2,7	2,2	2,2	2,7	3,1	2,7	0,82	1,2
День 13	0,5	0,2	4,5	3,1	3,7	3,7	4,3	4,1	1,4	1,7
День 15	0,53	NA	2,5	4,8	4,4	2,6	NA	NA	1,6	1,5

[181] Таблица 4. Qp

	ViTE		Слияние		Гетеро-IgG		mAb		3- Цепочечное Ab	
	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF
День 13	4,3	1,7	41,5	36	32	46	40	44,3	11,7	27
День 15	4,25	NA	20,6	39	30	65	NA	NA	11,5	25,3

[182] Линии IGF- адаптированных клеток демонстрировали различные уровни роста и продуктивности, но были сопоставимы с линиями клеток GSKO с IGF-1.

Пример 4

[183] Линию IGF⁻ адаптированных трансфицированных клеток-хозяев тестировали в биореакторе производственного масштаба объемом 200 л с использованием вектора, экспрессирующего моноклональное антитело, в эксперименте по получению путем 15D FB (15-суточного периодического культивирования с подпиткой), как правило, как описано в примере 2.

[184] Рост и титр были сопоставимы с теми, которые наблюдались в аналогичных циклах получения с линиями клеток, не адаптированными к условиям IGF⁻.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения представляющего интерес белка из культуры клеток млекопитающего, включающий

(а) культивирование клетки млекопитающего, экспрессирующей представляющий интерес белок, во второй среде для культивирования клеток, имеющей 0,05 мг/л или меньше инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), для экспрессии представляющего интерес белка, где клетка млекопитающего была непосредственно адаптирована для роста в первой среде для культивирования клеток, имеющей 0,03 мг/л или меньше IGF-1, и содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес белок; и

(b) извлечение представляющего интерес белка, продуцируемого клеткой млекопитающего.

2. Способ по п. 1, где вторая среда для культивирования клеток содержит менее 0,03 мг/л IGF-1.

3. Способ по п. 2, где вторая среда для культивирования клеток не содержит IGF-1.

4. Способ по п. 1, где первая среда для культивирования клеток не содержит IGF-1.

5. Способ по любому из пп. 1-3, где клетка млекопитающего имеет скорость роста, сравнимую с таковой клетки млекопитающего той же линии, которая не была непосредственно адаптирована к среде, не содержащей IGF-1.

6. Способ по п. 5, где время удвоения клетки млекопитающего составляет менее 30 часов.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где титр экспрессируемого представляющего интерес белка составляет по меньшей мере 50 мг/л в день 10 культивирования.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где представляющий интерес белок представляет собой антигенсвязывающий белок.

9. Способ по п. 8, где представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из моноклональных антител, биспецифических привлекающих Т-клетки молекул, иммуноглобулинов, слитых белков на основе Fc и пептител.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где в процессе культивирования клеток млекопитающего используют процесс периодического культивирования с подпиткой, процесс перфузионного культивирования или их комбинацию.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где культуру клеток млекопитающего создают путем инокуляции в биореакторе объемом по меньшей мере 100 л от по меньшей мере $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ клеток/мл в бессывороточную культуральную среду с 0,03 мг/л или меньше IGF-1.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где клетки млекопитающего представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO).

13. Способ по п. 12, где клетки CHO характеризуются дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR) или являются нокаутными по глутаминсинтетазе (GSKO).

14. Способ по п. 1, где извлеченный представляющий интерес белок очищают и составляют в фармацевтически приемлемом составе.

15. Очищенный составленный представляющий интерес белок по п. 14.

16. Способ непосредственной адаптации клетки млекопитающего к среде IGF⁻, включающий

а) культивирование популяции клеток млекопитающего в среде для культивирования клеток, содержащей 0,03 мг/л или меньше IGF-1;

б) получение отдельных клеток из популяции клеток млекопитающего путем клонирования одной клетки;

с) размножение и пересев отдельных клеток до достижения восстановления до 90% или больше и времени удвоения, составляющего менее 30 часов. .

17. Способ по п. 16, где среда для культивирования клеток не содержит IGF-1.

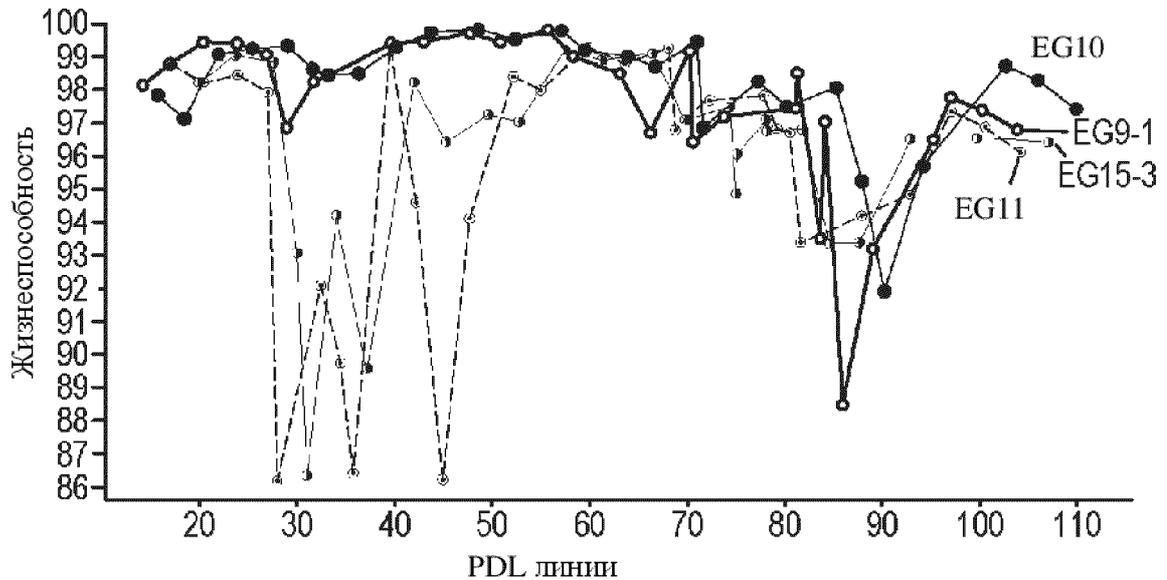
18. Способ по п. 16 или п. 17, где клетки млекопитающего представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO).

19. Способ по п. 18, где клетки CHO характеризуются дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR⁻) или являются нокаутными по глутаминсинтетазе (GSKO).

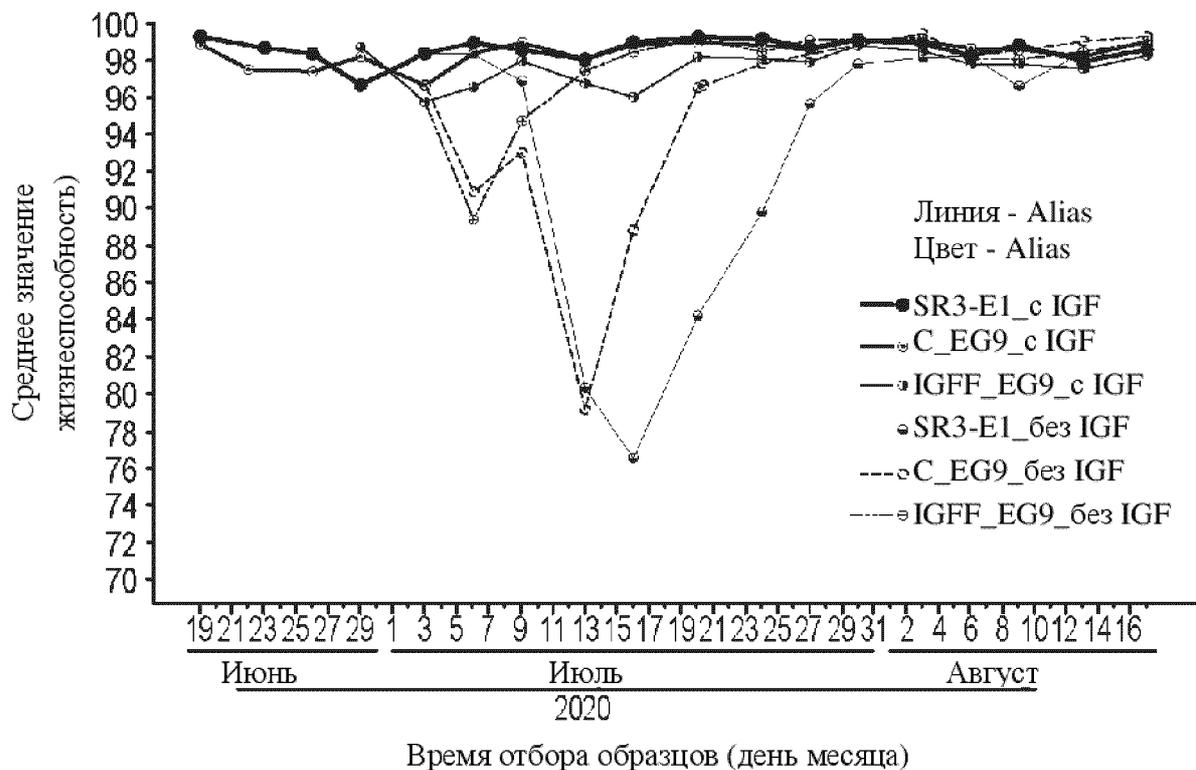
По доверенности

Фигура 1. Адаптация хозяев GSKO к среде без Long R3 IGF-1

А) Постепенная адаптация

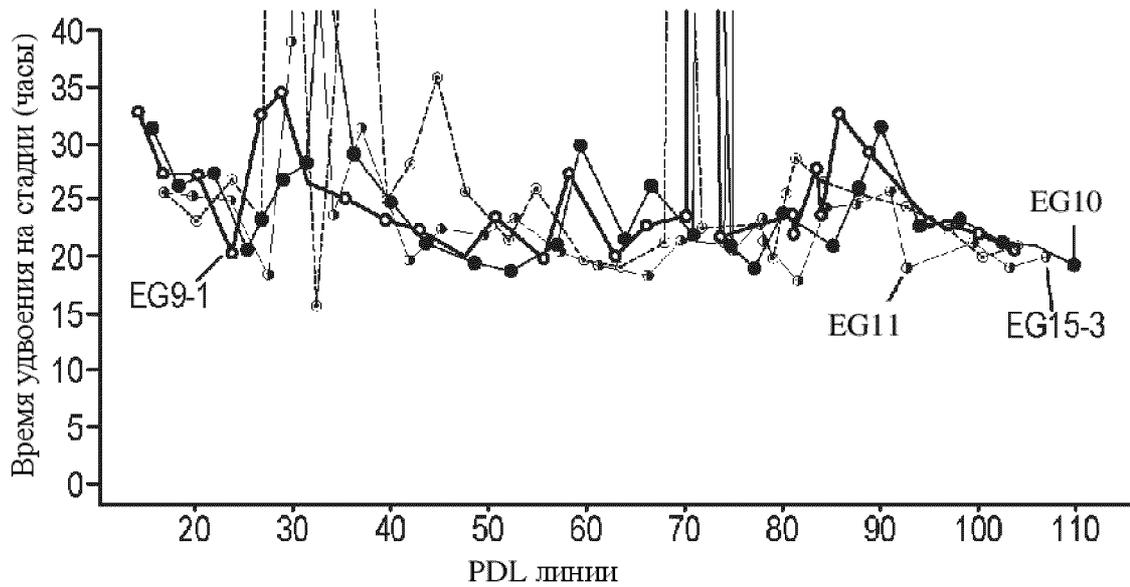


В) Непосредственная адаптация

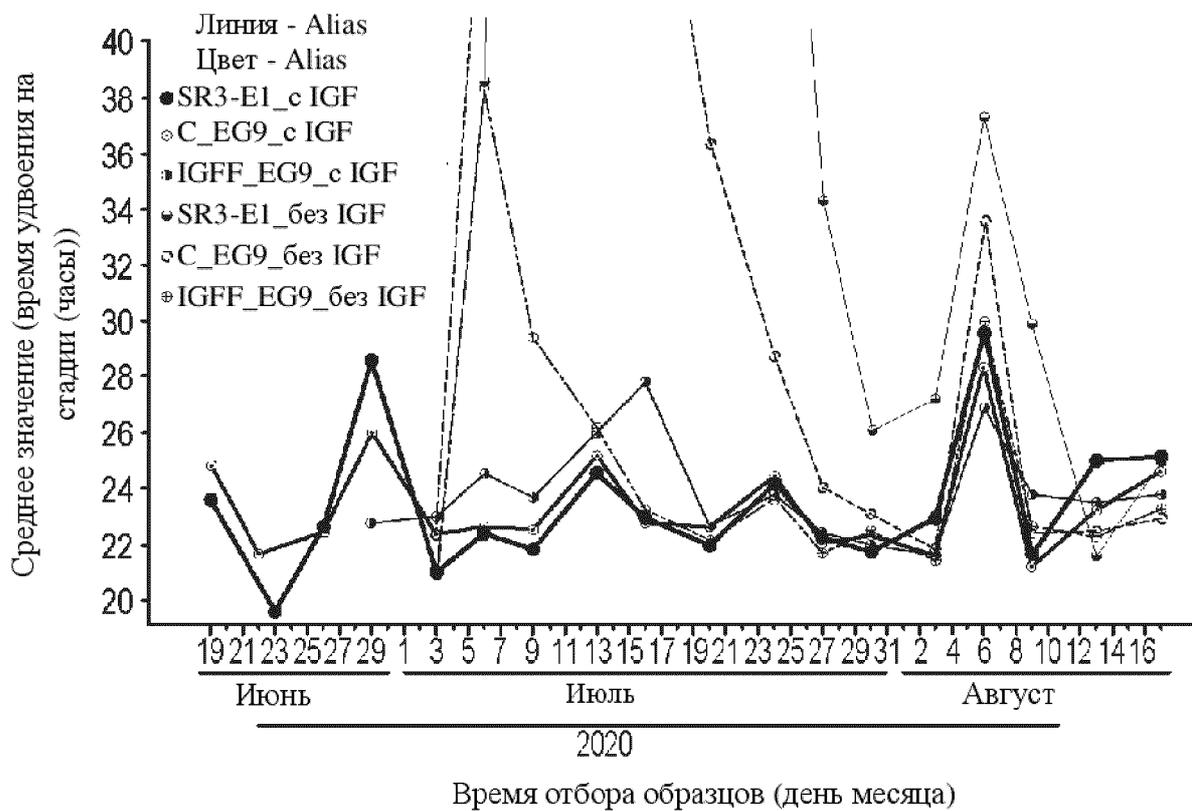


Фигура 2. Время удвоения клонированных из адаптированной к IGF⁻ одной клетки хозяев GSKO по сравнению с контролями GSKO

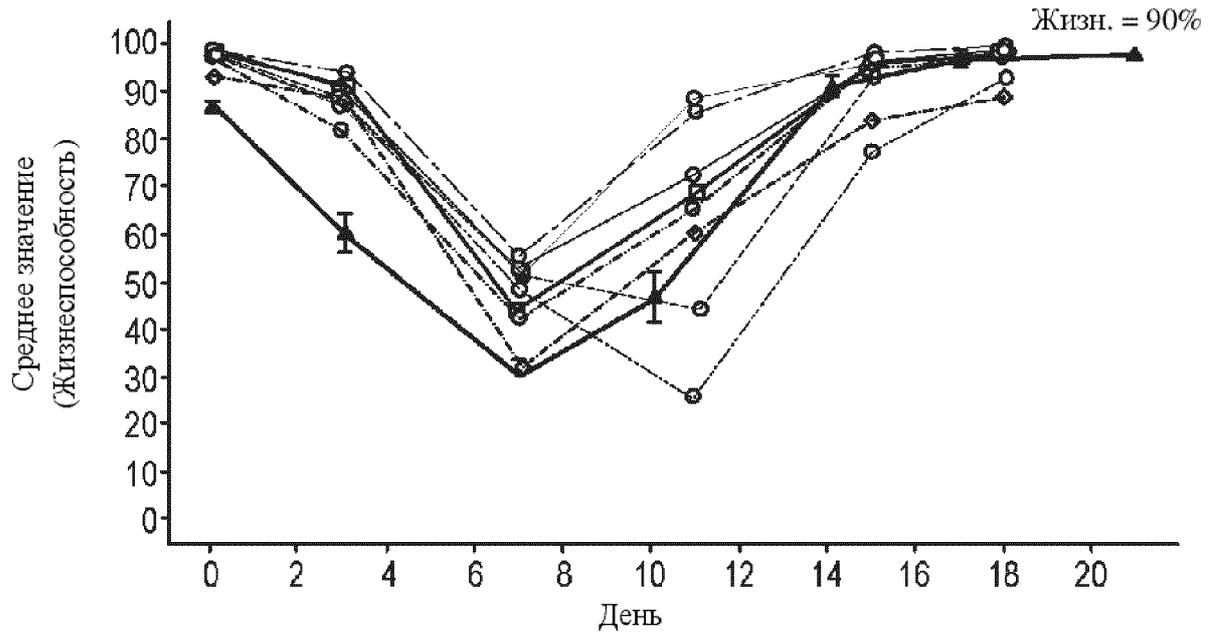
А) Постепенная адаптация



В) Непосредственная адаптация



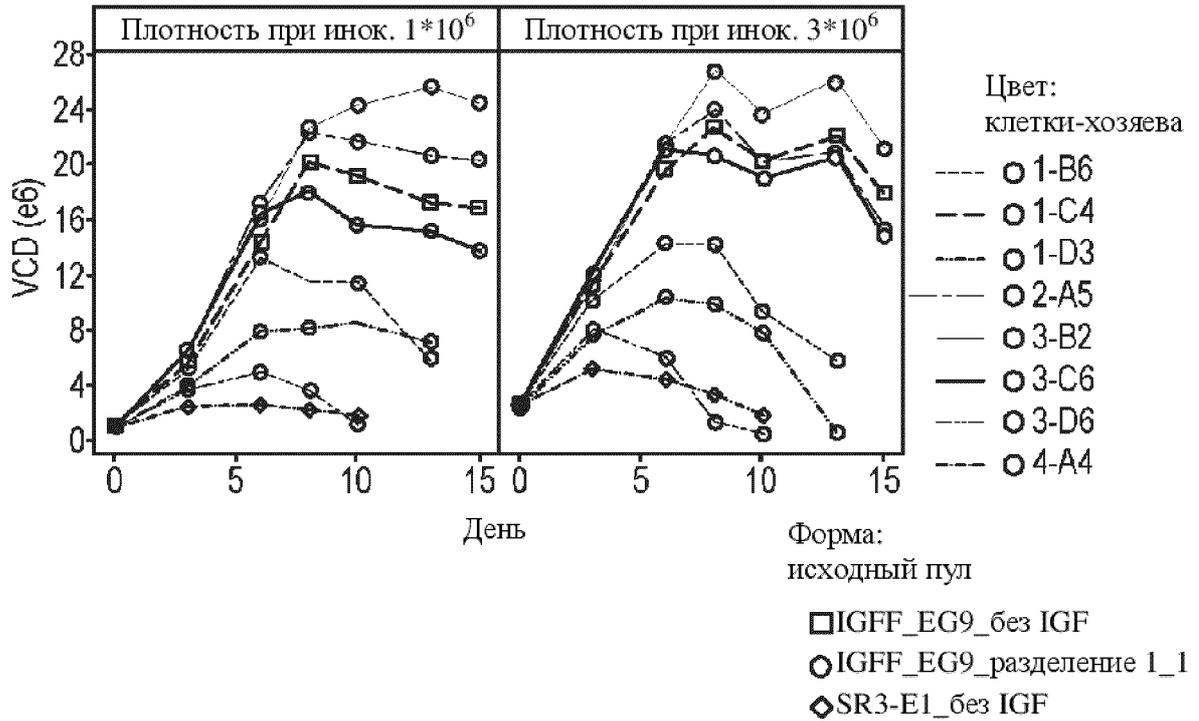
Фигура 3. Графики восстановления с помощью 25 мкМ MSX восстановленных клонированных из адаптированной к IGF^r одной клетки хозяев GSKO после трансфекции моноклональным антителом



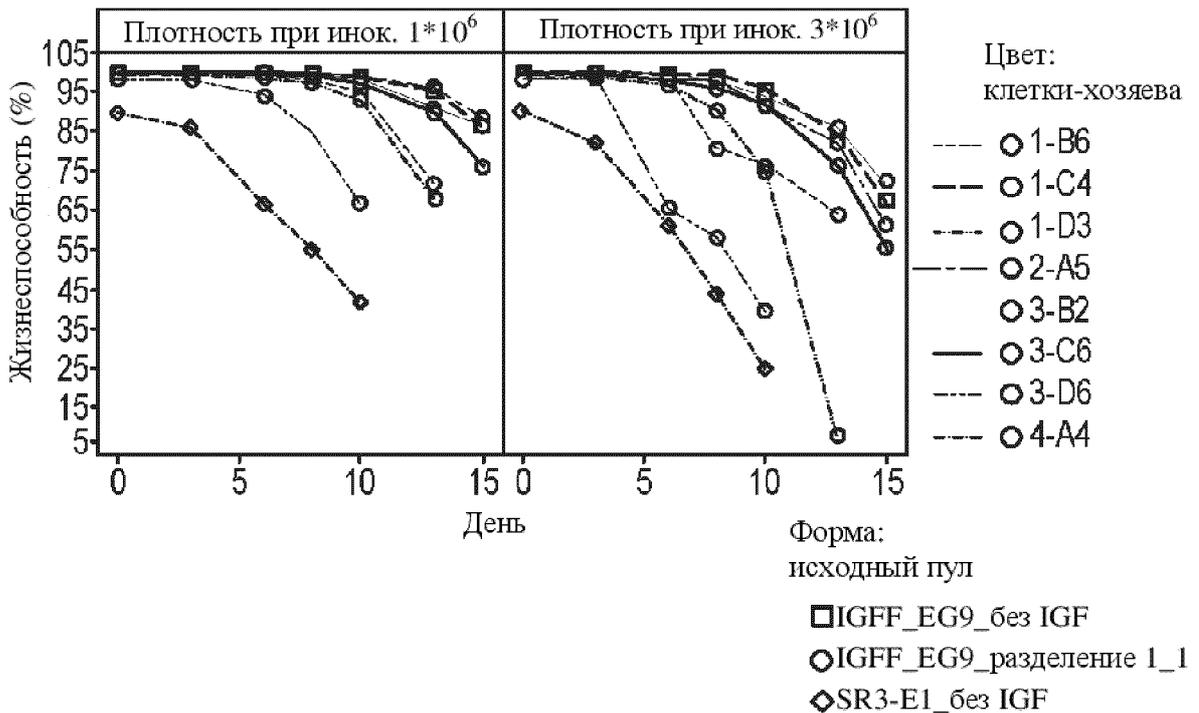
Цвет: клетки-хозяева	Форма: исходный пул
--- ○ 1-B6	□ IGFF_EG9_без IGF
--- ○ 1-C4	○ IGFF_EG9_разделение 1_1
--- ○ 1-D3	◇ SR3-E1_без IGF
— ○ 2-A5	△ SR3-E1_с IGF
— ○ 3-B2	
— ○ 3-C6	
--- ○ 3-D6	
--- ○ 4-A4	
— ○ SR3-E1	

Фигура 4. Графики роста и продуктивности при получении путем 15 D периодического культивирования с подпиткой с помощью 25 мкМ MSX CS9-IGF для клонированных из одной клетки хозяев, трансфицированных с помощью моноклонального антитела

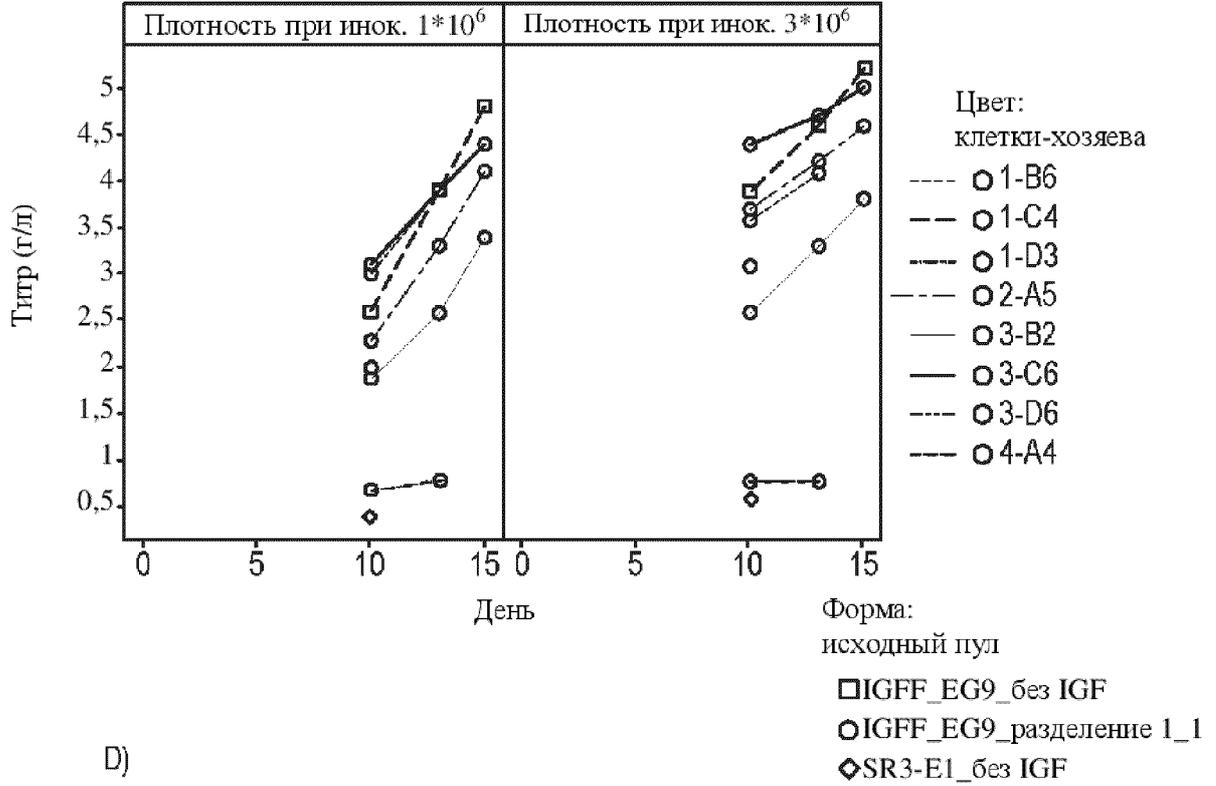
А)



В)



C)



D)

