

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202492121 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.16

(51) Int. Cl. C12N 5/00 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01)
G01J 3/44 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.02.13

(54) СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

(31) 17/671,029

(32) 2022.02.14

(33) US

(86) PCT/US2023/062467

(87) WO 2023/154910 2023.08.17

(88) 2023.10.05

(71) Заявитель:
ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
МАССАЧУСЕТТС (US)

(72) Изобретатель:

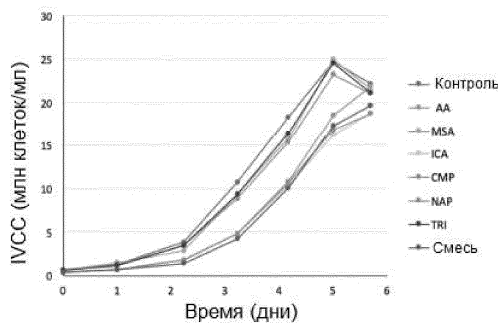
Юн Сонгю, Куанг Бинью, Хоанг Дук
(US)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Христофоров
А.А., Угрюмов В.М., Тихонина О.В.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Джермакян Р.В.,
Погосян А.А., Мамонтова К.Г. (RU)

(57) Способ культивирования клеток предусматривает: (i) культивирование клеток в среде для культивирования клеток и (ii) поддержание по меньшей мере одного метаболита на уровне ниже ингибирующей концентрации, определенной в среде для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере один этот метаболит, причем по меньшей мере один метаболит является аконитовым, кислота (AA), лейциновая кислота (HICA), цитидинмонофосфат (CMP), метилантарная кислота (MSA), тригонеллин (TRI), N-ацетилпутресциний (NAP) или их комбинация, и при этом фермент включает ADH5, BCAT1, CAT, GOT1, HADHB, HOGA1, SLC35A1 или их комбинация.

Стационарная культура
(интегрированная плотность жизнеспособных клеток)



A1

202492121

202492121

A1

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

ОПИСАНИЕ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка является международной заявкой, и она заявляет приоритет и преимущества непредварительной заявки на выдачу патента США № 17/671,029, поданной 14 февраля 2022 года, которая является частичным продолжением заявки PCT/US2020/046330, поданной 14 августа 2020 года, которая в свою очередь заявляет приоритет и преимущества предварительной заявки США № 62/886,683, поданной 14 августа 2019 года, содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Заявление о федерально спонсируемых исследованиях и разработках

[0002] Это изобретение было сделано при государственной поддержке Национальным научным фондом, грант номер 1624718. Государство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Сведения, включенные посредством ссылки

[0003] Сведения о последовательностях, содержащиеся в электронном файле под названием UM10027PCTP_Sequence_Listing_ST26.xml, размером 18,5 КБ, созданном 11 февраля 2023 года, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0004] Настоящее изобретение относится к способам культивирования клеток, продуцирования белков, таких как моноклональные антитела, в клетках млекопитающих, новым биомаркерам и способам контроля за продуцированием белка с использованием новых биомаркеров.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0005] Клетки млекопитающих, такие как линии клеток яичника китайского хомячка (СНО) и клеток почки эмбрионов человека (НЕК) 293, используются в качестве хозяев для производства терапевтических биологических препаратов в биофармацевтической промышленности. Однако в процессе производства антител клетки СНО демонстрируют неэффективный и плохо регулируемый метаболизм, поскольку они склонны использовать большую часть доступных питательных веществ для

продуцирования ненужных метаболитов, а не для потребностей своего роста. На поздней стадии биопроцесса клетки перестают расти и вырабатывать антитела, хотя уровень питательных веществ достаточен для поддержания роста и продуцирования белка. Накопленные во время процесса роста клеток метаболиты являются одной из основных причин, ограничивающих скорость пролиферации клеток и продуцирования антител. Чтобы управлять метаболизмом и повысить продуктивность клеток млекопитающих, крайне важно идентифицировать ингибирующие метаболиты-отходы и изучить их пути.

[0006] В этой связи необходима идентификация ингибирующих метаболитов и разработка стратегии контроля и борьбы с ними.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0007] В одном аспекте способ культивирования клеток предусматривает (i) культивирование клеток в среде для культивирования клеток и (ii) поддержание по меньшей мере одного метаболита на уровне ниже его ингибирующей концентрации, определенной в среде культивирования клеток, содержащей по меньшей мере этот один метаболит, при этом по меньшей мере один метаболит представляет собой аконитовую кислоту (AA), лейциновую кислоту (HICA), цитидинмонофосфат (CMP), метилянтарную кислоту (MSA), тригонеллин (TRI), N-ацетилпутресцин (NAP) или их комбинация, и при этом фермент включает ADH5, BCAT1, CAT, GOT1, HADHB, HOGA1, SLC35A1 или их комбинацию.

Краткое описание Фигур

[0008] На Фигуре 1 показана интегральная плотность жизнеспособных клеток как накопление клеток в стационарной культуре. Условия для смеси исключали ICA и включали AA, HICA, CMP, MSA, TRI и NAP.

[0009] На Фигуре 2 показано продуцирование антител, ингибируемое ингибирующими метаболитами. Продуцирование представлено в нормализованной шкале. Условия для смеси такие же, как и на Фигуре 1.

[0010] На Фигуре 3 представлен график плотности жизнеспособных клеток для теста с добавлением подпитки в стационарную культуру.

[0011] На Фигуре 4 показано, что HICA, CMP, ICA и TRI (снижение титра на 30-40% по сравнению с контролем) проявляют более сильное ингибирование в отношении продуктивности. Значения представляют собой величины титров в культуре в конце культивирования (день 14), измеренные с помощью ВЭЖХ по стандартным кривым в трех повторностях.

[0012] На Фигуре 5 показано влияние качества продукта на G1F, одного из соединений гликанового профиля, обнаруженных в лекарственных препаратах на основе антител IgG, и показан уровень гликозилирования. По сравнению с контрольной группой (столбец 9) AA, HISA, CMP, MSA и ISA оказывали большее влияние на образование G1F.

[0013] На Фигуре 6 показано влияние качества продукта на G2F, одного из соединений гликанового профиля, обнаруженных в лекарственных препаратах на основе антител IgG, и показан уровень гликозилирования. По сравнению с контрольной группой (столбец 9) AA полностью ингибирует образование G2F, а все остальные 6 ингибиторов оказали существенное влияние на образование G2F.

[0014] На Фигуре 7 представлена жидкостная хроматограмма контрольной культуры в день 14 культивирования. Во время биопроцесса зарегистрированы соединения гликанового профиля, такие как G0F, G1F и G2F.

[0015] На Фигуре 8 представлена жидкостная хроматограмма культуры с добавлением AA в день 14 культивирования. Зарегистрированы только пики G0F и G1F, а G2F не образовывался в ходе биопроцесса.

[0016] На Фигуре 9 представлена жидкостная хроматограмма культуры с добавлением AA в день 14 культивирования.

[0017] На Фигуре 10 показан пример стратегии контроля NAP. Она отражает метаболический путь N-ацетилпутресциния (NAP) в клетках CHO. Стратегия контроля 1: снизить концентрацию пролина и аргинина в средах, что приведет к снижению продуцирования NAP. Для существующих методов биопереработки клеток CHO очень распространено перекармливание (слишком большое количество подаваемых питательных веществ), что влияет на производство и качество биопродуктов. Стратегия контроля 2: снизить уровень экспрессии фермента (SAT1/2), например, путем введения миРНК. При снижении экспрессии ферментов скорость накопления NAP замедляется. Кроме того или в качестве альтернативы, повышение уровня экспрессии MAOB (моноаминоксидазы) приводит к смещению NAP в нижерасположенный цикл TCA, который может обеспечить энергию для роста клеток и продуцирования белка. Стратегия контроля 3: усиление активности MAOB для смещения NAP в нижний цикл TCA, который может обеспечить энергию для роста клеток и продуцирования белка.

[0018] На Фигуре 11 показаны профили роста клеток после активации регуляторных ферментов для продуцирования ингибирующих метаболитов. Контроль соответствует контрольным условиям стационарного культивирования клеток CHO K1 без трансфекции каких-либо генов. T1 - профиль роста клеток с геном Got1, трансфицированным в клеточную линию CHO K1. T2 - профиль роста клеток с

трансфекцией генов *Got1* и *Hog1*. Т3 - профиль роста клеток с трансфекцией генов *Got1*, *Hog1*, *Cat* и *Slc35a1*. После трансфекции наблюдали резкое увеличение пиковой плотности клеток, тогда как пиковая плотность клеток увеличивалась на 50,9% в профилях Т2 и Т3 по сравнению с контролем.

[0019] На Фигуре 12 показана стратегия генной инженерии, направленная на накопление α -гидроксиизокапроновой кислоты (HICA) и метилантарной кислоты (MSA) в клетках CHO-K1. В этом исследовании побочные продукты метаболизма HICA и MSA, ранее идентифицированные как ингибиторы роста, накопленные в биопроцессе с использованием CHO в стационарной культуре и в стационарной культуре с подпиткой, являются мишенью для генно-инженерного исследования. Масштабное моделирование генома (GEM) выявило дополнительные метаболические пути, которыми можно управлять с помощью стратегии генной инженерии. Накопление ингибиторов можно контролировать путем усиления экспрессии охарактеризованных генов (выделены курсивом), ответственных за модуляцию метаболических ферментов, катализирующих реакцию.

[0020] На Фигурах 13A, 13B, 13C и 13D показана стратегия генной инженерии, направленная на накопление тригонеллина (TRI), N-ацетилпутресцина (NAP), трансахонитовой кислоты (TAA) и цитидин-5'-монофосфата (CMP) в биопроцессе с использованием CHO-K1. На Фигуре 13A показана повышающая регуляция *Cat* за счет метаболизма триптофана и синтеза никотинамида *de novo*. На Фигуре 13B показана повышающая регуляция *Got1* и *Hog1* за счет метаболизма пролина. На Фигуре 13C показана повышающая регуляция *Got1* за счет цикла TCA. На Фигуре 13D показана повышающая регуляция *Slc35a1* за счет пути биосинтеза N-гликана. Накопление ингибиторов можно контролировать путем усиления экспрессии охарактеризованных генов (выделены курсив), ответственных за модуляцию метаболических ферментов, катализирующих реакцию.

[0021] На Фигурах 14A и 14B показана эффективность трансфекции, показанная как трансфекция плазмидой GFP. При этом физиологию клеток CHO-S в день 2 (Фигура 14A) и день 3 (Фигура 14B) после трансфекции оценивали с помощью проточно-цитометрического анализа. Результаты показали увеличение экспрессии генов в период пика продуцирования в клеточных линиях CHO-S.

[0022] На Фигуре 15 показаны клетки CHO-S, визуализированные под флуоресцентным микроскопом. (i) Визуализация клеток при обычном освещении. (ii) Визуализация клеток под флуоресцентным светом. На (i) и (ii) показано: (A) День 2, клетки, трансфицированные сконструированными плазмидами GFP; (B) День 2,

контрольные клетки без вставки плазмиды; (C) День 3, клетки, трансфицированные сконструированными плазмидами GFP; (D) День 3, контрольные клетки без вставки плазмиды.

[0023] На Фигурах 16A, 16B, 16C, 16D, 16E, 16F и 16G представлены графики, показывающие уровни экспрессии семи различных изученных генов при трансфекции в клетки CHO-S. Исследование разделено на девять уникальных групп субклонов. Каждый субклон сверхэкспрессировал отдельный представляющий интерес ген за счет транзientной трансфекции плазмиды при концентрации 50 мкг/мкл в клетки, с дополнительной группой субклонов со смесью генов, где все семь генов были трансфицированы в клетки одновременно, но при более низкой концентрации отдельной плазмиды, используемой в случае отдельного гена (6,25 мкг/мкл на ген, общая концентрация плазмид - 43,75 мкг/мкл для всех семи генов). В исследование включен отрицательный контроль, который не подвергался трансфекции плазмидой. Каждый субклон культивировали в течение 6 дней, после чего собирали клетки и супернатант клеточной культуры. Клетки как для контрольного, так и для трансфицированного субклона были получены из культуры с одним и тем же составом, чтобы исключить различия в цикле роста и других условиях культивирования. Уровни экспрессии генов определяли количественно с помощью количественной ПЦР (qPCR).

[0024] На Фигурах 17A, 17B, 17C, 17D, 17E, 17F и 17G представлены графики, показывающие накопление ингибирующих метаболитов в различных субклонах. Концентрация накопленных метаболитов, показанная на соответствующих Фигурах: на Фигуре 17A - CMP; на Фигуре 17B - GMP; на Фигуре 17C - HICA, на Фигуре 17D - MSA, на Фигуре 17E - NAP, на Фигуре 17F - TAA; и на Фигуре 17G - TRI. Исследование было разделено на девять уникальных групп субклонов. Каждый субклон сверхэкспрессировал отдельный представляющий интерес ген за счет транзientной трансфекции в клетки при концентрации плазмиды 50 мкг/мкл, с дополнительной группой субклонов со смесью генов, где все семь генов были трансфицированы в клетки одновременно, но при более низкой концентрации отдельной плазмиды, используемой в случае отдельного гена (6,25 мкг/мкл на ген, общая концентрация плазмид - 43,75 мкг/мкл для семи генов). В исследование включен отрицательный контроль, который не подвергался трансфекции плазмидой. Каждый субклон культивировали в течение 6 дней, после чего собирали клетки и супернатант клеточной культуры. Клетки как для контрольного, так и для трансфицированного субклона были получены из культуры с одним и тем же составом, чтобы исключить различия в цикле роста и других условиях культивирования. Количественную оценку накопления ингибирующих метаболитов проводили с помощью

LC-MS. Столбцы отражают среднее значение \pm стандартную ошибку средней; $n = 3$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Статистическая оценка дана по двустороннему t-критерию.

[0025] На Фигурах 18А и 18В представлены графики, показывающие профиль роста различных субклонов. На Фигуре 18А показан профиль плотности жизнеспособных клеток (VCD). На Фигуре 18В показан интегральный профиль плотности жизнеспособных клеток (IVCD). В этом исследовании каждый субклон сверхэкспрессировал отдельный представляющий интерес ген за счет транзientной трансфекции в клетки при концентрации плазмиды 50 мкг/мкл, с дополнительным субклоном смеси генов, где все семь генов были трансфицированы в клетки, но в более низкой концентрации (концентрация плазмиды 6,25 мкг/мкл на ген) по сравнению с концентрацией, используемой в случае отдельного гена. В исследование включен отрицательный контроль, который не подвергался трансфекции плазмидой. Каждый субклон культивировали в течение 6 дней, и супернатант клеточной культуры собирали в конце культивирования.

[0026] На Фигурах 19А и 19В представлены графики, показывающие профиль роста субклонов, трансфицированных смесью генов. На Фигуре 19А показан профиль VCD. На Фигуре 19В показан интегральный профиль VCD. Все семь критических генов трансфицировали в клетки-хозяева, чтобы проверить общую функцию и их взаимодействие. Субклон со смесью генов подвергали сверхэкспрессии всех семи представляющими интерес генами за счет транзientной трансфекции при концентрации плазмиды 6,25 мкг/мкл на ген. В исследование включен отрицательный контроль, который не подвергался трансфекции плазмидой. Каждый субклон культивировали до тех пор, пока жизнеспособность клеток не снизилась до 80%. Клетки как для контрольного, так и для трансфицированного субклона были получены из культуры одного и того же состава, чтобы исключить различия в цикле роста и других условиях культивирования.

[0027] На Фигурах 20А, 20В, 20С, 20D, 20Е, 20F и 20G представлены графики, показывающие профиль поглощения питательных веществ отдельными трансфицированными субклонами. На Фигуре 20А - профиль натрия; на Фигуре 20В - профиль калия; на Фигуре 20С - профиль аммиака; на Фигуре 20D - профиль лактата; на Фигуре 20Е - профиль глюкозы; на Фигуре 20F - профиль глутамата; и на Фигуре 20G - профиль глутамина. Исследование разделено на уникальные группы субклонов. Каждый субклон сверхэкспрессировал отдельный представляющий интерес ген за счет транзientной трансфекции в клетки плазмид при концентрации 50 мкг/мкл. В исследование включен отрицательный контроль, который не подвергался трансфекции плазмидой. Каждый субклон культивировали до тех пор, пока жизнеспособность клеток

не снизилась до 80%. Клетки как для контрольного, так и для трансфицированного субклона были получены из культуры одного и того же состава, чтобы исключить различия в цикле роста и других условиях культивирования. Наблюдали снижение поглощения аммиака более чем на 50% и меньшее потребление глюкозы в сконструированной клеточной линии.

[0028] На Фигурах 21A, 21B, 21C, 21D, 21E, 21F и 21G представлены графики, показывающие профиль поглощения питательных веществ субклонами, трансфицированными смесью генов. На Фигуре 21A - профиль натрия; на Фигуре 21B - профиль калия; на Фигуре 21C - профиль аммиака; на Фигуре 21D - профиль лактата; на Фигуре 21E - профиль глюкозы; на Фигуре 21F - профиль глутамата; и на Фигуре 21G - профиль глутамина. Все семь критических генов трансфицировали в клетки-хозяева, чтобы проверить общую функцию и их взаимодействие. Субклон со смесью генов сверхэкспрессировал все семь представляющих интерес генов за счет транзientной трансфекции при концентрации плазмид 6,25 мкг /мкл на ген. В исследование включен отрицательный контроль, который не подвергался трансфекции плазмидой. Каждый субклон культивировали до тех пор, пока жизнеспособность клеток не снизилась до 80%. Клетки как для контрольного, так и для трансфицированного субклона были получены из культуры одного и того же состава, чтобы исключить различия в цикле роста и других условиях культивирования.

[0029] Описанные выше и другие признаки и особенности настоящего изобретения будут понятны специалистам в данной области техники из следующего подробного описания, Фигур и прилагаемой формулы изобретения.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0030] Клетки яичника китайского хомячка (СНО) остаются ведущей «рабочей лошадкой» для производства моноклональных антител (mAb). Для достижения высокой продуктивности антител процесс производства осуществляют в условиях высокой плотности клеток (>10 миллионов клеток/мл). Однако продуктивность становится узким местом процесса из-за больших концентраций секретируемых ингибирующих метаболитов, когда плотность клеток достигает рекордно высокого уровня. Накопление этих ингибирующих метаболитов ставит под угрозу рост клеток, а также создает определенный риск для качества продукта, поскольку было показано, что накопление побочных продуктов-отходов (таких как аммиак) изменяет ключевые свойства рекомбинантных белков, представляющих продукт этого процесса. В этом исследовании помимо обычных ингибиторов, были идентифицированы и охарактеризованы (с

использованием LC-MS) с помощью метаболомики (анализа метаболитов и их путей синтеза) новые метаболические биомаркеры. Рабочий процесс метаболомики ингибиторов-отходов включает идентификацию кандидатов, проверку наличия ингибирующего воздействия и ее количественную оценку, а также разработку стратегии контроля.

[0031] Новыми биомаркерами продуцирования белка в клетках СНО и других клетках млекопитающих являются аконитовая кислота (AA), или, более конкретно, аконитовая кислота (AA), лейциновая кислота (HICA), цитидинмонофосфат (CMP), метилянтарная кислота (MSA), тригонеллин (TRI) и N-ацетилпутресциний (NAP). Гуанозинмонофосфат (GMP) и индол-3-карбоновая кислота (ICA), которые были известны ранее, также были исследованы в рамках настоящего изобретения, и они могут быть объединены с биомаркерами, описанными в настоящем документе.

[0032] В настоящем документе описаны способы культивирования клеток, в которых концентрация по меньшей мере одного метаболита, выбранного из аконитовой кислоты (AA), лейциновой кислоты (HICA), цитидинмонофосфата (CMP), метилянтарной кислоты (MSA), тригонеллина (TRI) и N-ацетилпутресциния (NAP), поддерживается на низких уровнях в среде культивирования клеток. В культуре клеток и в частности в культуре клеток высокой плотности, такой как, например, стационарная культура с периодической подпиткой и/или перфузией, предназначенная для получения большого количества представляющего интерес рекомбинантного белка, рост клеток может ингибироваться за счет накопления метаболитов, таких как AA, HICA, CMP, MSA, TRI и/или NAP. Ингибирующее действие этих метаболитов можно ограничить, поддерживая их концентрацию в среде культивирования клеток ниже уровня, при котором они ингибируют рост клеток, снижают продуцирование рекомбинантных белков и влияют на качество продукта. Качество продукта включает, помимо прочего, характер гликозилирования, варианты заряда, агрегацию и фрагментацию, все из которых можно контролировать и управлять способами, описанными в настоящем документе.

[0033] В одном аспекте настоящего изобретения способ культивирования клеток предусматривает (i) культивирование клеток в среде для культивирования клеток для начала процесса культивирования клеток, и (ii) поддержание по меньшей мере одного метаболита, выбранного из AA, HICA, CMP, MSA, TRI и NAP, в среде культивирования клеток на уровне ниже его ингибирующей концентрации в среде культивирования клеток, содержащей по меньшей мере этот один метаболит. В одном аспекте настоящего изобретения клетки представляют собой клетки млекопитающих.

[0034] Типовые клеточные линии CHO включают CHOK1, CHO GS и DG44. Другие клеточные линии млекопитающих включают клеточные линии, используемые для производства терапевтических продуктов, используемых для человека, такие как клетки НЕК 293, клетки HT-1080, сконструированные Т-клетки и сконструированные естественные клетки-киллеры.

[0035] Ингибирующие количества метаболитов могут находиться в диапазоне от 1 нМ до 50 мМ, и более конкретно, от 100 нМ до 10 мМ.

[0036] Когда метаболитом является АА, ингибирующая концентрация может быть менее 100 мкМ, 440 мкМ, 880 мкМ, 3 мМ, 5 мМ или 10 мМ.

[0037] Когда метаболитом является НСА, ингибирующая концентрация может быть менее 10 мкМ, 23,5 мкМ, 47 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ.

[0038] Когда метаболитом является СМР, ингибирующая концентрация может быть менее 5 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ или 1 мМ.

[0039] Когда метаболитом является МСА, ингибирующая концентрация может быть менее 1 мкМ, 3,75 мкМ, 7,5 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ.

[0040] Когда метаболитом является ТРИ, ингибирующая концентрация может быть менее 0,1 мкМ, 0,35 мкМ, 0,7 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ.

[0041] Когда метаболитом является NAR, ингибирующая концентрация может быть менее 0,1 мкМ, 0,3 мкМ, 0,6 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ.

[0042] В одном аспекте настоящего изобретения способ предусматривает измерение концентрации по меньшей мере одного метаболита. Концентрацию метаболита можно измерить любым способом, известным специалисту-аналитику.

[0043] Концентрацию метаболитов можно измерять один или несколько раз во время культивирования клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения концентрацию метаболита измеряют непрерывно или периодически, например, каждые 30 минут, каждый час, каждые два часа, два раза в день, один раз в день или один раз каждые два дня. В предпочтительном аспекте настоящего изобретения концентрацию метаболита измеряют ежедневно.

[0044] Концентрацию можно измерять способом, который не автоматизирован и не интегрирован в технологический процесс культивирования клеток. Например, может быть использован способ измерения, при котором образец вручную отбирается из среды культивирования клеток, чтобы измерить конкретную концентрацию в образце. Альтернативно, определение концентрации метаболитов может быть автоматизировано и интегрировано в технологический процесс культивирования клеток.

[0045] Типовые способы измерения концентрации метаболитов включают спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР), рамановскую спектроскопию (спектроскопию комбинационного рассеяния света), высокоэффективную/ультраэффективную жидкостную хроматографию (H/UPLC), жидкостную хроматографию с масс-спектрометрией (LC-MS), газовую хроматографию с масс-спектрометрией (GC-MS) или их комбинации. Например, в случае использования GC-MS эксперимент можно проводить с помощью автоматического пробоотборника, который отбирает образцы из реактора и по программе передает их в измерительные системы. Идентификацию AA, HICA, CMP, MSA, TRI и NAP осуществляли с использованием комбинации одного или нескольких из вышеуказанных способов (описание их и данные здесь не представлены).

[0046] В одном аспекте осуществления настоящего изобретения, когда измеренная концентрация одного или более метаболитов превышает заданное значение показателя, такого как ингибирующая концентрация, используется стратегия контроля для ограничения концентрации ингибирующего метаболита. В стратегии контроля 1 концентрация предшественника (например, аминокислот, глюкозы) по меньшей мере одного метаболита в среде культивирования клеток снижается за счет уменьшения количества предшественника, подаваемого клеткам для питания. Ограничение предшественников метаболитов приводит к уменьшению накопления ингибирующих метаболитов. Этот способ также можно назвать как способ контроля среды. Заданное значение выбирают так, чтобы снижение концентрации предшественника предотвращало повышение концентрации одного или нескольких метаболитов до уровня выше ингибирующей концентрации.

[0047] Когда метаболитом является AA, то предшественником является глутамин, глюкоза, аргинин и/или аспарагин.

[0048] Когда метаболитом является HICA, то предшественником является лейцин и/или изолейцин.

[0049] Когда метаболитом является CMP, то предшественником является глутамин, аргинин и/или аспарат.

[0050] Когда метаболитом является MSA, то предшественником является лизин, изолейцин, серин, глюкоза и/или глутамин.

[0051] Когда метаболитом является TRI, то предшественником является аспарат, триптофан и/или глутамин.

[0052] Когда метаболитом является NAR, то предшественником является аргинин, пролин, аспаратат-глутамин и/или аспарагин.

[0053] В таких способах также могут быть уменьшены концентрации комбинации вышеуказанных предшественников.

[0054] Снижение концентрации предшественников ингибирующих метаболитов может снизить концентрацию ингибиторов для обеспечения оптимизации процесса.

[0055] Концентрацию предшественника в среде культивирования клеток можно снизить путем уменьшения количества предшественника, подаваемого клеткам для питания, например, путем уменьшения концентрации предшественника в питательной среде, уменьшения скорости подачи, уменьшения количества или объема подачи, или за счет комбинации этих приемов. Например, питательную среду можно заменять питательной средой, которая содержит более низкую концентрацию предшественника.

[0056] Концентрация предшественников может находиться в диапазоне от 0,01 г/л до 2 г/л. Более конкретно:

[0057] Когда предшественником является аргинин, то концентрация может быть менее 0,2 г/л, 0,3 г/л, 0,4 г/л, 0,5 г/л или 0,6 г/л.

[0058] Когда предшественником является аспарагин, то концентрация может быть менее 0,1 г/л, 0,3 г/л, 0,5 г/л, 0,7 г/л или 0,9 г/л.

[0059] Когда предшественником является аспарагиновая кислота, то концентрация может быть менее 0,1 г/л, 0,3 г/л, 0,5 г/л, 0,7 г/л или 0,9 г/л.

[0060] Когда предшественником является глутамин, то концентрация может быть менее 0,1 г/л, 0,6 г/л, 0,9 г/л, 1,2 г/л или 1,5 г/л.

[0061] Когда предшественником является изолейцин, то концентрация может быть менее 0,05 г/л, 0,15 г/л, 0,25 г/л, 0,35 г/л или 0,45 г/л.

[0062] Когда предшественником является лейцин, то концентрация может быть менее 0,1 г/л, 0,2 г/л, 0,3 г/л, 0,4 г/л или 0,5 г/л.

[0063] Когда предшественником является лизин, то концентрация может быть менее 0,1 г/л, 0,2 г/л, 0,3 г/л, 0,4 г/л или 0,5 г/л.

[0064] Когда предшественником является пролин, концентрация может быть менее 0,05 г/л, 0,15 г/л, 0,25 г/л, 0,35 г/л или 0,45 г/л.

[0065] Когда предшественником является серин, то концентрация может быть менее 0,05 г/л, 0,15 г/л, 0,25 г/л, 0,35 г/л или 0,45 г/л.

[0066] Когда предшественником является триптофан, то концентрация может быть менее 0,01 г/л, 0,03 г/л, 0,07 г/л, 0,1 г/л или 0,15 г/л.

[0067] Схема экспериментов, такая как план Плакетта-Бермана или методология с использованием поверхности отклика (RSM), может быть применена для поиска оптимальной концентрации предшественника из вышеуказанного диапазона концентраций, чтобы минимизировать накопление ингибирующих метаболитов.

[0068] Уменьшение количества глюкозы, например, может включать культивирование клеток при низких концентрациях глюкозы с использованием альтернативных источников углерода, включая, помимо прочего, фруктозу и галактозу, использование клеточной линии со сниженными уровнями гликолитических ферментов, включая, помимо прочего, переносчик гексозы или лактатдегидрогеназу, с использованием линии клеток с подавленными уровнями внутриклеточного белка, такого как лактатдегидрогеназа, так и киназа пируватдегидрогеназы, или с использованием линии клеток со сверхэкспрессией фермента пируваткарбоксилазы, или с использованием ингибиторов (низкомолекулярных соединений или белков) сигнальных путей (таких как АКТ, mTOR, HIF1a), которые регулируют активность путей энергетического метаболизма (гликолиз, цикл ТСА и окислительно-восстановительный путь).

[0069] В стратегиях контроля 2a, b и 3 манипулируют экспрессией вышерасположенных и нижерасположенных ферментов (стратегия 2) или активностью ферментов (стратегия 3) для уменьшения синтеза ингибирующих метаболитов. Общая идея, лежащая в основе стратегий контроля 2 и 3, заключается в том, чтобы снижать уровень вышерасположенных ферментов для того, чтобы клетки продуцировали меньше ингибирующих метаболитов, и/или повышать уровень нижерасположенных ферментов, чтобы клетки потребляли метаболиты для выработки энергии. На Фигуре 10 показаны три стратегии контроля, проиллюстрированные для NAP, на Фигуре 12 показаны стратегии контроля для MSA и HISA, на Фигуре 13A показана стратегия контроля для TRI, на Фигуре 13B показана дополнительная стратегия контроля NAP, на Фигуре 13C показана стратегия контроля TAA, а на Фигуре 13D показана стратегия контроля CMP.

[0070] В стратегии контроля 2a экспрессию вышерасположенного и/или нижерасположенного фермента, который контролирует уровень метаболита, можно регулировать с помощью ингибирующей нуклеиновой кислоты, такой как миРНК. Термин «ингибиторная нуклеиновая кислота» означает одноцепочечную или двухцепочечную РНК или ДНК, в частности РНК, такую как триплексные олигонуклеотиды, рибозимы, аптамеры, малые интерферирующие РНК, включая миРНК (малую интерферирующую РНК) и кшРНК (короткошпилечную РНК), антисмысловую РНК, или ее часть, или ее аналог или миметик, которые способны снижать или ингибировать экспрессию целевого гена или последовательности. Ингибирующие нуклеиновые кислоты могут действовать,

например, опосредуя деградацию или ингибируя трансляцию мРНК, которые комплементарны интерферирующей последовательности РНК. Ингибирующая нуклеиновая кислота при введении в клетку млекопитающего приводит к снижению (например на 5%, 10%, 25%, 50%, 75% или даже на 90-100%) экспрессии (например, транскрипции или трансляция) целевой последовательности. Обычно ингибитор нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере части молекулы целевой нуклеиновой кислоты или ее ортолога, или соответствует им, или содержит по меньшей мере часть комплементарной цепи молекулы целевой нуклеиновой кислоты. Ингибирующие нуклеиновые кислоты могут иметь существенную или полную идентичность целевому гену или последовательности, или они могут включать область несовпадения (т.е. мотив ошибочного спаривания). Последовательность ингибирующей нуклеиновой кислоты может соответствовать полноразмерному целевому гену-мишени или его подпоследовательности. В одном аспекте настоящего изобретения молекулы ингибирующей нуклеиновой кислоты синтезируют химическим путем.

[0071] В стратегии контроля 2b используют рекомбинантную ДНК для сверхэкспрессии одного или нескольких нижерасположенных ферментов, которые контролируют уровень метаболита, снижая тем самым уровень метаболита.

[0072] В стратегии контроля 3 активацию фермента можно контролировать двумя разными подходами, как указано ниже.

[0073] Подход 1: регулирование экспрессии фермента для снижения синтеза метаболита предусматривает добавление ингибитора активности фермента. Типовые ингибиторы активности фермента включают низкомолекулярные соединения, пептиды, белки и нуклеиновые кислоты, которые связывают активный центр фермента и блокируют активности фермента.

[0074] Подход 2: Поскольку все ингибирующие метаболиты могут далее метаболизироваться в цикле ТСА для получения энергии, то для уменьшения накопления ингибирующих метаболитов можно использовать активаторы гликолитического пути, такие как НК-1 и GK.

[0075] В некоторых аспектах настоящего изобретения для стратегий контроля 2 и 3 предусматривается следующее:

метаболит представляет собой AA, и фермент представляет собой ADI1, HOGA1, TAD1 или их комбинацию;

метаболит представляет собой HICA, и фермент представляет собой ADH5, BCAT1, SLC35A1, GOT1, D-HicDH, MMUT, AUH, HMGCL, NADHA/B или их комбинацию;

метаболит представляет собой CMP, и фермент представляет собой UCK1/2, NT5, CMAS, CMPK1, DDYD, CDA, SLC35A1, RRM1, HOGA1, CAT, ADH5, BCAT1, GOT1, HADHA/B или их комбинацию;

метаболит представляет собой MSA, и фермент представляет собой BCAT1, GOT1, ETHE1, AMT, HADHA/B, MMUT, HOGA1, SLC35A1 или их комбинацию;

метаболит представляет собой TRI, и фермент представляет собой BCAT1, GOT1, HADHA/B, NADSYN1, NNMT, CAT, HOGA1, SLC35A1, NMNAT1, SULT4A1 или их комбинацию;

метаболит представляет собой NAP, и фермент представляет собой BCAT1, SLC35A1, CAT, HADHA/B, SAT1/2, HOGA1, AMD1, ODC1, GOT1, MAOB или их комбинацию;

метаболит представляет собой TAA, и фермент представляет собой BCAT1, ADH5, GOT1, HOGA1, SLC35A1, HADHB или их комбинацию; или

настоящее изобретение предусматривает использование комбинации метаболитов и соответствующих ферментов.

[0076] В одном аспекте настоящего изобретения фермент включает ADH5, BCAT1, CAT, GOT1, HADHB, HOGA1, SLC35A1 или их комбинацию.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусматривается следующее:

метаболит представляет собой HICA, и фермент включает ADH5, BCAT1, SLC35A1, GOT1, HADHB или их комбинацию;

метаболит представляет собой CMP, и фермент включает ADH5, BCAT1, CAT, GOT1, HOGA1, SLC35A1, HADHB или их комбинацию;

метаболит представляет собой MSA, и фермент включает BCAT1, GOT1, HADHB, HOGA1, SLC35A1 или их комбинацию;

метаболит представляет собой TRI, и фермент включает BCAT1, GOT1, HADHB, CAT, HOGA1, SLC35A1 или их комбинацию;

метаболит представляет собой NAP, и фермент включает BCAT1, SLC35A1, HOGA1, GOT1, CAT, HADHB или их комбинацию;

метаболит представляет собой TAA, и фермент включает BCAT1, ADH5, GOT1, HOGA1, SLC35A1, HADHB или их комбинацию; или

настоящее изобретение предусматривает использование комбинации метаболитов и соответствующих ферментов.

[0077] В одном аспекте настоящего изобретения фермент включает ADH5, BCAT1, GOT1, HADHA/B, HOGA1, SLC35A1 и CAT.

[0078] В стратегии контроля 4 поддержание по меньшей мере одного метаболита в среде культивирования клеток на уровне ниже ингибирующей концентрации по меньшей мере одного метаболита предусматривает контроль параметров процесса, включая температуру, уровень растворенного кислорода, pH или их комбинацию. Оптимальную температуру, уровень растворенного кислорода и pH можно определять по скорости ферментативной реакции и по накоплению ингибирующих метаболитов. Процесс может быть оптимизирован для стационарных биопроцессов с подпиткой и перфузией.

[0079] Типовые температуры составляют от приблизительно 30°C до приблизительно 40°C, в частности, на ранней стадии и на поздней стадии культивирования клеток могут быть применены температуры 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C и 37°C.

[0080] Типовые значения pH находятся в диапазоне pH от 5,5 до 8,5, например pH может составлять 6,5, 6,7, 6,9, 7, 7,2, 7,4 или 7,6. Для балансировки pH можно использовать барботирование CO₂ и/или добавление Na₂CO₃. Типовые скорости барботирования CO₂ включают 0,3 SLPH, 0,4 SLPH, 0,5 SLPH, 0,6 SLPH и 0,7 SLPH (стандартный литр в час). Типовые скорости перемешивания при добавлении Na₂CO₃ включают 90 об/мин, 120 об/мин, 150 об/мин и 170 об/мин (оборотов в минуту).

[0081] Типовые заданные значения уровня растворенного кислорода включают величины от 5% до 50%, например 20%, 30% и 40%.

[0082] В способах, описанных в настоящем документе, можно использовать любую клетку, которую можно выращивать в клеточной культуре. В некоторых аспектах настоящего изобретения клетка представляет собой клетку млекопитающего. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих включают линии клеток миеломы мышей BALB/c (NSO/I, номер ECACC: 85110503); линии ретинобластов человека (PER.C6, CruCell, Лейден, Нидерланды); линии клеток почки обезьяны CV1, трансформированных SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линии клеток почек эмбрионов человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензии); линии клеток почки детенышей хомячка (BHK, ATCC CCL 10); линии клеток яичника китайского хомячка +/-DHFR (CHO, ETrlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. ETSA, 77:4216, 1980); линии клеток Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); линии клеток почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); линии клеток почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1 587); линии клеток карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); линии клеток почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); линии клеток печени крысы Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); линии клеток легкого человека (W138, ATCC CCL 75); линии клеток печени человека (Hep G2, HB 8065); линии клеток опухоли

молочной железы мыши (ММТ 060562, ATCC CCL51); линии клеток TRI; линии клеток MRC 5; линии клеток FS4; и линии клеток гепатомы человека (Hep G2). В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения клетки представляют собой клетки CHO, клетки НЕК 293, клетки HT-1080, сконструированные Т-клетки и сконструированные естественные клетки-киллеры. Сконструированные Т-клетки включают CAR Т-клетки.

[0083] В способах, описанных в настоящем документе, можно использовать любое количество коммерчески и некоммерчески доступных клеточных линий гибридом. Термин «гибридома», используемый здесь, относится к клетке или потомству клетки, полученному в результате слияния immortalized клетки и клетки, продуцирующей антитело. Такая полученная гибридома представляет собой immortalized клетку, продуцирующую антитела. Отдельные клетки, используемые для создания гибридомы, могут быть получены из любого млекопитающих, включая, помимо прочего, крысу, свинью, кролика, овцу, козу и человека. В некоторых аспектах настоящего изобретения гибридома представляет собой клеточную линию триому, которая образуется в результате слияния потомства гетерогибридных слитых клеток миеломы, которые являются продуктом слияния клеток человека и клеточной линии мышинной миеломы, с последующим слиянием с плазматической клеткой. В некоторых аспектах настоящего изобретения гибридома представляет собой любую immortalized линию гибридных клеток, которая продуцирует антитела, такую как, например, клеточную линию квадрому. Специалисту в данной области понятно, что линии гибридомных клеток могут иметь разные потребности в питании и/или могут требовать разных условий культивирования для оптимального роста, и этот специалист может модифицировать условия по мере необходимости.

[0084] Термины «культура» и «культура клеток», используемые здесь, относятся к популяции клеток, которая суспендирована в среде в условиях, подходящих для выживания и/или роста популяции клеток. Специалистам в данной области техники понятно, что в некоторых аспектах настоящего изобретения эти термины, используемые здесь, относятся к комбинации, включающей популяцию клеток и среду, в которой эта популяция суспендирована. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клеткам культуры клеток, которые включают клетки млекопитающих.

[0085] Описанные здесь способы можно использовать с любым способом культивирования клеток, который подходит для желаемого процесса (например, для получения рекомбинантного белка (например, антитела)). В качестве неограничивающего примера клетки можно выращивать в стационарных культурах или в стационарных культурах с подпиткой, где культивирование прекращают после достаточной экспрессии

рекомбинантного белка (например, антитела), после чего собирают экспрессированный белок (например, антитело). Альтернативно, в качестве еще одного неограничивающего примера осуществления настоящего изобретения, клетки можно выращивать в стационарном режиме с повторной подпиткой, при этом культивирование не прекращается и к культуре периодически или непрерывно добавляют новые питательные вещества и другие компоненты, и в ходе культивирования клеток экспрессируется рекомбинантный белок (например, антитело), который собирают периодически или постоянно. Другие подходящие способы (например, культивирование в центрифужных пробирках) также известны в данной области, и они могут быть использованы для практического применения описанных здесь способов.

[0086] В некоторых аспектах настоящего изобретения клеточная культура представляет собой стационарную культуру с подпиткой. Термин «стационарная культура с подпиткой», используемый в настоящем документе, относится к способу культивирования клеток, при котором дополнительные компоненты вводят в культуру во время начала культивирования или в моменты времени после начала процесса культивирования. Такие вводимые компоненты обычно содержат питательные вещества для клеток, истощение которых произошло в процессе культивирования. Стационарную культуру с подпиткой обычно в какой-то момент останавливают, а клетки и/или компоненты среды собирают и, при необходимости, очищают. В некоторых аспектах настоящего изобретения стационарная культура с подпиткой включает базовую среду, дополненную питательной средой.

[0087] Альтернативно, клетки можно выращивать в процессе перфузии. В процессе перфузии клетки удерживаются в биореакторе, при этом постоянно удаляют продукты в виде клеточных отходов и истощенная среда. Свежую среду добавляют обычно с той же скоростью, с которой истощенную среду удаляют из системы. Удаление отработанной среды можно осуществлять путем чередования тангенциального потока, стандартной фильтрации тангенциального потока, фильтрации с использованием полых волокон и т.п.

[0088] Клетки можно выращивать в любом удобном объеме, выбранном практикующим специалистом. Например, клетки можно выращивать в небольших реакционных сосудах объемом от нескольких миллилитров до нескольких литров. Альтернативно, клетки можно выращивать в крупномасштабных коммерческих биореакторах объемом приблизительно от 1 литра до приблизительно 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000, 15000, 20000 или 25000 литров или даже больше, или в биореакторах с объемом, соответствующем любому объем между указанными значениями.

[0089] Температуру культивирования клеток выбирают, главным образом, исходя из диапазона температур, при котором культура клеток остается жизнеспособной, и диапазона температур, при котором продуцируется желаемый продукт (например, рекомбинантный белок) на высоком уровне. В целом, большинство клеток млекопитающих хорошо растут и могут продуцировать желаемые продукты (например, рекомбинантные белки) в диапазоне температур приблизительно от 25°C до 42°C, хотя описанные здесь способы не ограничиваются этими температурами. Некоторые клетки млекопитающих хорошо растут и могут продуцировать желаемые продукты (например, рекомбинантные белки или антитела) в диапазоне температур, составляющих приблизительно от 35°C до 40°C. В некоторых аспектах настоящего изобретения культуру клеток выращивают при температуре 20-45°C один или несколько раз в процессе культивирования клеток. Специалисты в данной области могут выбрать подходящую температуру или температуры для выращивания клеток в зависимости от конкретных потребностей клеток и конкретных требований в отношении производства. Клетки можно выращивать в течение любого времени, в зависимости от потребностей производства специалиста и требований в отношении конкретных клеток. В одном аспекте настоящего изобретения клетки выращивают при температуре 37°C. В других аспектах настоящего изобретения клетки выращивают при температуре 36,5°C.

[0090] В некоторых аспектах настоящего изобретения клетки выращивают во время начальной фазы роста (или стадии роста) в течение большего или меньшего периода времени, в зависимости от потребностей практикующего специалиста и требований со стороны самих клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения клетки выращивают в течение периода времени, достаточного для достижения заданной плотности клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения клетки выращивают в течение периода времени, достаточного для достижения плотности клеток, равной заданному проценту от максимальной плотности клеток, которой клетки в конечном итоге достигли бы, если бы они росли без помех. Например, клетки можно выращивать в течение периода времени, достаточного для достижения желаемой плотности жизнеспособных клеток, составляющей 1-99 процентов от максимальной плотности клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения клетки выращивают до тех пор, пока плотность клеток не увеличится более чем на 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% в день культивирования. В некоторых аспектах настоящего изобретения клетки выращивают до тех пор, пока плотность клеток не увеличится более чем на 5% в день культивирования.

[0091] В некоторых аспектах настоящего изобретения клеткам позволяют расти в течение определенного периода времени. Например, в зависимости от начальной концентрации клеточной культуры, температуры, при которой выращиваются клетки, и собственной скорости роста клеток, клетки можно выращивать в течение 0-20 или более дней, в частности, в течение 4-10 дней. В некоторых случаях клеткам можно позволить расти в течение месяца или более. Практикующий специалист сможет выбрать продолжительность начальной фазы роста в зависимости от требований к производству белка и потребностей самих клеток.

[0092] Культуру клеток можно перемешивать или встряхивать на начальной фазе культивирования, чтобы увеличить оксигенацию и диспергирование питательных веществ в клетках. Специалисту в данной области техники понятно, что может быть полезно контролировать и регулировать определенные внутренние условия в биореакторе во время начальной фазы роста, включая, помимо прочего, рН, температуру, оксигенацию и т.п.

[0093] В конце начальной фазы роста по меньшей мере одно из условий культивирования может быть изменено таким образом, чтобы реализовать второй набор условий культивирования, и чтобы в культуре произошел метаболический сдвиг. Метаболический сдвиг может быть осуществлен, например, путем изменения температуры, уровня растворенного кислорода, рН, осмоляльности или уровня содержания химического индуктора в клеточной культуре. В одном неограничивающем аспекте настоящего изобретения условия культивирования изменяют путем изменения температуры культивирования. Однако, как известно в данной области техники, изменение температуры не является единственным механизмом, посредством которого может быть достигнут соответствующий метаболический сдвиг. Например, такой метаболический сдвиг также может быть достигнут путем изменения других условий культивирования, включая, помимо прочего, рН, уровень растворенного кислорода, осмоляльность и уровни бутирата натрия. Время смены режима культивирования будет определяться практикующим специалистом на основе требований к продуцированию белка или на основе потребностей самих клеток.

[0094] При сдвиге температуры культивирования этот сдвиг может быть относительно постепенным. Например, для завершения изменения при сдвиге температуры может потребоваться несколько часов или дней. Альтернативно, температурный сдвиг может быть относительно резким. Например, изменение температуры может быть завершено менее чем за несколько часов. При наличии соответствующего производственного и контрольного оборудования, которое является

стандартным при коммерческом крупномасштабном производстве полипептидов или белков, изменение температуры может быть завершено менее чем за один час.

[0095] В некоторых аспектах настоящего изобретения, как только условия культивирования клеток были изменены, как обсуждалось выше, культуру клеток поддерживают для последующей фазы продуцирования при втором наборе условий культивирования, способствующих выживанию и жизнеспособности культивируемых клеток и подходящих для экспрессии желаемого полипептида или белка на коммерчески приемлемых уровнях.

[0096] Как обсуждалось выше, культуру можно изменить за счет изменения одного или нескольких условий культивирования, включая, помимо прочего, температуру, уровень растворенный кислорода, pH, осмоляльность и уровни бутирата натрия. В некоторых аспектах настоящего изобретения температуру культуры смещают. Согласно этому аспекту, во время последующей фазы продуцирования культуру поддерживают при температуре или в диапазоне температур, которые ниже температуры или диапазона температур начальной фазы роста. Как обсуждалось выше, можно использовать множественные дискретные температурные сдвиги для увеличения плотности или жизнеспособности клеток или для увеличения экспрессии рекомбинантного белка.

[0097] Клетки могут экспрессировать рекомбинантный белок, генный продукт или клеточный продукт. В некоторых аспектах настоящего изобретения клетки экспрессируют рекомбинантный белок, и способ культивирования клеток включает фазу роста и фазу продуцирования. Описанный здесь способ можно применять на фазе роста, на фазе продуцирования или на обоих фазах.

[0098] Описанные здесь способы можно использовать для улучшения роста клеток в культуре клеток с высокой плотностью клеток. Высокая плотность клеток в данном контексте относится к плотности клеток более 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл, 1×10^8 клеток/мл или 5×10^8 клеток/мл, предпочтительно выше 1×10^7 клеток/мл, и более предпочтительно - более 5×10^7 клеток/мл.

[0099] В некоторых аспектах настоящего изобретения рост клеток определяется плотностью жизнеспособных клеток (VCD), максимальной плотностью жизнеспособных клеток или интегрированной плотностью жизнеспособных клеток (IVCC; также называемой интегрированным количеством жизнеспособных клеток). В некоторых аспектах настоящего изобретения рост клеток определяется максимальной плотностью жизнеспособных клеток. Термин «плотность жизнеспособных клеток», используемый здесь, относится к количеству клеток, присутствующих в данном объеме среды. Плотность жизнеспособных клеток можно измерить любым методом, известным

специалисту. Предпочтительно, когда плотность жизнеспособных клеток измеряют с использованием автоматического счетчика клеток, такого как Bioprofile Flex[®]. Термин «максимальная плотность клеток», используемый здесь, относится к максимальной плотности клеток, достигаемой во время культивирования клеток. Термин «жизнеспособность клеток», используемый в настоящем документе, относится к способности клеток в культуре выживать при заданном наборе условий культивирования или при экспериментальных вариантах режимов. Например, чтобы определить жизнеспособность клетки можно использовать краситель (например, трипановый синий), который не проходит через мембрану живой клетки, но может проходить через разрушенную мембрану мертвой или умирающей клетки.

[00100] Термины «интегрированное количество жизнеспособных клеток (IVCC)» или «интегральная плотность жизнеспособных клеток (IVCD)» в контексте настоящего документа относятся к площади под кривой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Величину IVCC можно рассчитать по следующей формуле:

$$IVCC_{t+1} = IVCC_t + (VCD_t + VCD_{t+1}) * (\Delta t) / 2$$

где Δt представляет собой разницу во времени между моментами времени t и $t+1$. Значение величины $IVCC_{t=0}$ можно считать пренебрежимо малым. VCD_t и VCD_{t+1} представляют собой плотности жизнеспособных клеток в моменты времени t и $t+1$.

[00101] Термин «титр», используемый здесь, относится, например, к общему количеству рекомбинантно экспрессируемого белка, продуцируемого клеточной культурой в заданном объеме среды. Титр обычно выражают в граммах белка на литр среды.

[0100] В некоторых аспектах настоящего изобретения рост клеток увеличивается по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20% или на 25% по сравнению с контрольной культурой. Контрольная культура может быть идентична культуре, описанной выше, за исключением того, что ее не культивируют на стадии (ii). В некоторых аспектах настоящего изобретения рост клеток увеличивается по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольной культурой. В некоторых аспектах настоящего изобретения рост клеток увеличивается по меньшей мере на 20% по сравнению с контрольной культурой.

[0101] В некоторых аспектах настоящего изобретения продуктивность определяется титром и/или объемной продуктивностью. Термин «титр», используемый здесь, относится, например, к общему количеству рекомбинантно экспрессируемого белка, продуцируемого клеточной культурой в заданном объеме среды. Титр обычно выражают в граммах белка на литр среды. В некоторых вариантах продуктивность определяют по титру. В некоторых аспектах настоящего изобретения продуктивность

увеличивается по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20% или на 25% по сравнению с контрольной культурой. В некоторых аспектах настоящего изобретения продуктивность увеличивается по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольной культурой. В некоторых аспектах продуктивность увеличивается по меньшей мере на 20% по сравнению с контрольной культурой.

[0102] В некоторых аспектах настоящего изобретения максимальная плотность клеток клеточной культуры превышает 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл, 1×10^8 клеток/мл или 5×10^8 клеток/мл. В некоторых аспектах настоящего изобретения максимальная плотность клеток культивирования клеток превышает 5×10^6 клеток/мл. В некоторых аспектах настоящего изобретения максимальная плотность клеток культивирования клеток превышает 1×10^8 клеток/мл.

[0103] Термины «среда», «среда для культивирования клеток» и «культуральная среда», используемые здесь, относятся к раствору, содержащему питательные вещества, которые питают растущие клетки млекопитающих. Обычно такие растворы содержат незаменимые и заменимые аминокислоты, витамины, источники энергии, липиды и микроэлементы, необходимые клетке для минимального роста и/или выживания. Такой раствор может также содержать дополнительные компоненты, которые усиливают рост и/или выживаемость выше минимального уровня, включая, помимо прочего, гормоны и/или другие факторы роста, определенные ионы (такие как натрий, хлорид, кальций, магний и фосфат), буферы, витамины, нуклеозиды или нуклеотиды, микроэлементы (неорганические соединения, которые обычно присутствуют в очень низких конечных концентрациях), неорганические соединения, присутствующие в высоких конечных концентрациях (например, железо), аминокислоты, липиды и/или глюкозу или другой источник энергии. В некоторых аспектах настоящего изобретения среду предпочтительно готовят с рН и концентрацией соли, оптимальными для выживания и пролиферации клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения среда представляет собой питательную среду, которую добавляют после начала культивирования клеток.

[0104] В соответствии со способами, описанными в настоящем документе, можно использовать широкий спектр сред для выращивания клеток млекопитающих. В некоторых аспектах настоящего изобретения клетки можно выращивать в одной из множества сред с определенным химическим составом, где компоненты среды известны и контролируются. В некоторых аспектах настоящего изобретения клетки можно выращивать в сложной среде, в которой не все компоненты среды известны и/или некоторые компоненты среды не контролируются.

[0105] Известно множество сред с химически определенным составом для выращивания клеток млекопитающих, и сведения о таких средах опубликованы в течение последних нескольких десятилетий. Все компоненты конкретных сред хорошо охарактеризованы, поэтому такие среды не содержат сложных добавок, таких как сыворотка или гидролизаты. Ранее разработанные среды были созданы для обеспечения роста клеток и поддержания их жизнеспособности, практически не заботясь о продуцировании белка. Совсем недавно были разработаны составы сред с конкретной целью поддержки высокопродуктивных клеточных культур, продуцирующих рекомбинантный белок. Такие среды обычно содержат большое количество питательных веществ и, в частности, аминокислот, для поддержки роста клеток и/или поддержки высокой плотности клеток при культивировании. При необходимости специалист может модифицировать эти среды для использования в описанных здесь способах.

[0106] Не все компоненты сложных сред хорошо охарактеризованы, и поэтому сложные среды могут содержать добавки, такие как простые и/или сложные источники углерода, простые и/или сложные источники азота, и, среди прочего, сыворотку. В некоторых аспектах настоящего изобретения комплексная среда содержит добавки, такие как гидролизаты, в дополнение к другим компонентам определенной среды, как описано в настоящем документе.

[0107] В некоторых аспектах настоящего изобретения конкретная среда обычно включает приблизительно пятьдесят химических веществ в известных концентрациях в воде. Большинство из них также содержат один или несколько хорошо изученных белков, таких как инсулин, IGF-1, трансферрин или BSA, но некоторые другие среды не требуют белковых компонентов, и поэтому они называются средами с определенными свойствами, не содержащими белков. Типовые химические компоненты для сред делятся на пять широких категорий: аминокислоты, витамины, неорганические соли, микроэлементы и другие категории, которые не поддаются четкой классификации.

[0108] Среда для культивирования клеток может необязательно содержать дополнительные компоненты. Термин «дополнительные компоненты», используемый в настоящем документе, относится к компонентам, которые усиливают рост и/или увеличивают выживаемость выше минимального уровня, включая, помимо прочего, гормоны и/или другие факторы роста, определенные ионы (такие как натрий, хлорид, кальций, магний и фосфат), буферы, витамины, нуклеозиды или нуклеотиды, микроэлементы (неорганические соединения, которые обычно присутствующие в очень низких конечных концентрациях), аминокислоты, липиды и/или глюкозу или другой источник энергии. В некоторых аспектах настоящего изобретения к исходной клеточной

культуре могут быть добавлены дополнительные компоненты. В некоторых аспектах настоящего изобретения дополнительные компоненты могут быть добавлены после начала культивирования клеток.

[0109] Обычно микроэлементы относятся к различным неорганическим солям, включенных в среду на микромолярных или более низких уровнях. Например, обычно в состав микроэлементов входят цинк, селен, медь и другие элементы. В некоторых аспектах настоящего изобретения железо (соли двух валентного или трехвалентного железа) может быть включено в исходную среду для культивирования клеток в качестве микроэлемента в микромолярных концентрациях. Марганец также часто включают в число микроэлементов в виде двухвалентного катиона ($MnCl_2$ или $MnSO_4$) в диапазоне от наномолярных до микромолярных концентраций. Также обычно добавляют в среду множество менее распространенных микроэлементов в наномолярных концентрациях.

[0110] В некоторых аспектах настоящего изобретения среда, используемая в способе по изобретению, представляет собой среду, подходящую для поддержания высокой плотности клеток, такой как, например, 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл, 1×10^8 клеток/мл или 5×10^8 клеток/мл в культуре клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения культура клеток представляет собой стационарную культуру клеток млекопитающих с подпиткой, предпочтительно стационарную культуру клеток СНО с подпиткой.

[0111] Во многих случаях клетки будут выбраны или сконструированы так, чтобы они продуцировали высокие уровни желаемых продуктов (например, рекомбинантного белка или антитела). Часто клетки подвергаются воздействию, чтобы получить высокие уровни рекомбинантного белка, например, путем введения гена, кодирующего представляющий интерес белок, и/или путем введения элементов контроля генов, которые регулируют экспрессию этого гена (эндогенного или введенного).

[0112] Некоторые белки могут оказывать вредное воздействие на рост клеток, жизнеспособность клеток или на некоторые другие характеристики клеток, что в конечном итоге тем или иным образом ограничивает продукцию представляющего интерес белка. Даже среди популяции клеток одного конкретного типа, созданных для экспрессии конкретного белка, имеет место вариабельность внутри клеточной популяции, так что некоторые отдельные клетки будут расти лучше, продуцировать больше представляющего интерес белка или продуцировать белок с более высоким уровнем активности (например, ферментативной активности). В некоторых аспектах настоящего изобретения практикующий специалист выбирает линию клеток эмпирически для обеспечения устойчивого роста в конкретных условиях, выбранных для культивирования

клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения отдельные клетки, сконструированные для экспрессии определенного белка, выбирают для крупномасштабного производства на основе показателей роста клеток, конечной плотности клеток, процента жизнеспособности клеток, титра экспрессированного белка или любой комбинации этих или любых других параметров и условий, которые считаются важными на практике для специалиста.

[0113] Любой белок, экспрессируемый в клетке-хозяине, может быть получен в соответствии с описанными здесь способами. Термин «клетка-хозяин», используемый в настоящем документе, относится к клетке, которая подвергается воздействию с целью получения представляющего интерес белка, как описано в настоящем документе. Этот белок может экспрессироваться из гена, который является эндогенным для клетки, или из гетерологичного гена, который введен в клетку. Этот белок представляет собой белок, который может встречаться в природе или, альтернативно, может иметь последовательность, которая была сконструирована или выбрана.

[0114] Белки, которые желательно экспрессировать, часто выбирают на основе представляющей интерес или полезной биологической или химической активности. Например, способы можно использовать для экспрессии любого фармацевтически или коммерчески значимого фермента, рецептора, антитела, гормона, регуляторного фактора, антигена, связывающего агента и т.д. В некоторых аспектах настоящего изобретения белок, экспрессируемый клетками в культуре, выбирают из антител или их фрагментов, нанотел, однодоменных антител, гликопротеинов, терапевтических белков, факторов роста, факторов свертывания крови, цитокинов, слитых белков, фармацевтических лекарственных веществ, вакцин, ферментов или малых модульных иммунофармацевтических препаратов (SMIP™). Специалисту в данной понятно, что может быть экспрессирован любой белок, и специалист может выбрать конкретный белок, который будет продуцироваться, исходя из конкретных потребностей.

[0115] В соответствии со способами настоящего изобретения получение антител представляет особый интерес. Антитела - это белки, обладающие способностью специфически связывать определенный антиген. Можно получить любое антитело, которое может быть экспрессировано в клетке-хозяине. В некоторых аспектах настоящего изобретения экспрессируемое антитело представляет собой моноклональное антитело.

[0116] В некоторых аспектах настоящего изобретения моноклональное антитело представляет собой химерное антитело. Химерное антитело содержит фрагменты аминокислот, происходящие из более чем одного организма. Молекулы химерных антител

могут включать, например, антигенсвязывающий домен антитела мыши, крысы или других видов, и константные области антитела человека.

[0117] В некоторых аспектах настоящего изобретения моноклональное антитело представляет собой человеческое антитело, полученное, например, с использованием библиотек рибосомного или фагового дисплея или с использованием ксенографических видов, в которых гены нативного антитела инактивированы и функционально заменены генами антитела человека, в то время как другие компоненты нативной иммунной системы остаются без изменений.

[0118] В некоторых аспектах настоящего изобретения моноклональное антитело представляет собой гуманизованное антитело. Гуманизованное антитело представляет собой химерное антитело, в котором большая часть аминокислотных остатков получена из антител человека, что сводит к минимуму любую потенциальную иммунную реакцию при его введении человеку. В гуманизованных антителах аминокислотные остатки в определяющих комплементарность областях заменены, по меньшей мере частично, на остатки из вида, не относящегося к человеку, которые придают желаемую антигенную специфичность или аффинность. Такие измененные молекулы иммуноглобулина можно получить любым из множества способов, известных в данной области.

[0119] В некоторых аспектах настоящего изобретения моноклональные, химерные или гуманизованные антитела, описанные выше, могут содержать аминокислотные остатки, которые в природе не встречаются, и не встречаются в природе ни в одном антителе ни одного вида. Эти чужеродные остатки можно использовать, например, для придания новой или модифицированной специфичности, аффинности или эффекторной функции моноклональному, химерному или гуманизованному антителу. В некоторых аспектах настоящего изобретения антитела, описанные выше, могут быть конъюгированы с лекарственными средствами системной фармакотерапии, такими как токсины, низкомолекулярные цитотоксические лекарственные средства, модификаторы биологического ответа и радионуклиды.

[0120] Обычно молекула нуклеиновой кислоты, введенная в клетку, кодирует белок, который необходимо экспрессировать. Альтернативно, молекула нуклеиновой кислоты может кодировать генный продукт, который индуцирует экспрессию клеткой желаемого белка. Например, введенный генетический материал может кодировать фактор транскрипции, который активирует транскрипцию эндогенного или гетерологичного белка. Альтернативно или дополнительно, введенная молекула нуклеиновой кислоты может увеличить трансляцию или повысить стабильность белка, экспрессируемого

клеткой. В данной области техники известны способы, подходящие для введения нуклеиновых кислот, достаточных для достижения экспрессии представляющего интерес белка в клетки-хозяева млекопитающих. Для клеток млекопитающих распространенные способы введения генетического материала в эти клетки включают способ преципитации с фосфатом кальция или способ с использованием Lipofectamine™.

[0121] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к вводимой нуклеиновой кислоте в форме «голой молекулы» нуклеиновой кислоты. Например, молекула нуклеиновой кислоты, введенная в клетку, может состоять только из нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, и необходимых элементов контроля генов. Альтернативно, нуклеиновая кислота, кодирующая белок (включая необходимые регуляторные элементы), может находиться внутри плазмидного вектора. Неограничивающие репрезентативные примеры подходящих векторов для экспрессии белков в клетках млекопитающих включают pCDNA1; pCD; pMCIneo Poly-A; бакуловирусный вектор, такой как pAC 373 или pAC 610; МДМ8; и pMT2PS. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, необходимую для введения в клетку, которая содержится внутри вирусного вектора. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая белок, может быть встроена в вирусный геном (или в частичный вирусный геном). Регуляторные элементы, управляющие экспрессией белка, могут быть включены в нуклеиновую кислоту, встроенную в вирусный геном (т.е. связаны с геном, встроенным в вирусный геном), или они могут обеспечиваться самим вирусным геномом.

[0122] Голую ДНК можно ввести в клетки путем образования осадка, содержащего ДНК и фосфат кальция. Альтернативно, голая ДНК также может быть введена в клетки путем образования смеси ДНК и DEAE-декстрана, с последующей инкубацией этой смеси с клетками, или путем совместной инкубации клеток и ДНК в подходящем буфере и воздействия на клетки электрическим импульсом высокого напряжения (т.е. путем электропорации). Еще один способ введения голых ДНК в клетки заключается в смешивании ДНК с суспензией липосом, содержащей катионные липиды. Затем комплекс ДНК/липосома инкубируют с клетками. Голую ДНК также можно напрямую инъецировать в клетки, например, путем микроинъекции. Альтернативно, голая ДНК также может быть введена в клетки путем образования комплекса ДНК с катионом, таким как полилизин, который связан с лигандом рецептора клеточной поверхности. Связывание комплекса ДНК-лиганд с рецептором облегчает поглощение ДНК путем рецептор-опосредованного эндоцитоза.

[0123] Дефектные ретровирусы хорошо изучены с точки зрения использования их для переноса генов в целях генной терапии. Можно сконструировать рекомбинантный ретровирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес белок, встроенную в ретровирусный геном. Кроме того, части ретровирусного генома могут быть удалены, что приведет к нарушению репликации ретровируса. Такой ретровирус с дефектом репликации затем упаковывается в вирионы, которые можно использовать для инфицирования клетки-мишени посредством использования хелперного вируса стандартными способами. Например, геномом аденовируса можно сделать таким, чтобы он кодировал и экспрессировал представляющий интерес белок, но был инактивирован с точки зрения его способности реплицироваться в нормальном литическом жизненном цикле вируса. Типовые аденовирусные векторы, полученные из штамма аденовируса Ad типа 5 d1324 или других штаммов аденовируса (например, Ad2, Ad3, Ad7 и т.п.), известны специалистам в данной области. Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой встречающийся в природе дефектный вирус, которому требуется другой вирус, такой как аденовирус или вирус герпеса, в качестве хелперного вируса для эффективной репликации и продуктивного жизненного цикла.

[0124] Когда способ, используемый для введения молекул нуклеиновой кислоты в популяцию клеток, приводит к модификации большей части клеток и эффективной экспрессии белка клетками, модифицированную популяцию клеток можно использовать без дальнейшего выделения или субклонирования отдельных клеток из всей популяции. То есть, популяция клеток может продуцировать достаточное количество белка, так что дальнейшее или дополнительное выделение клеток не требуется, и популяцию можно непосредственно использовать для посева клеточной культуры с целью продуцирования белка. Альтернативно, может быть желательно выделить и размножить клетки в гомогенную популяцию из нескольких клеток или даже одной клетки, эффективно продуцирующей белок.

[0125] В качестве альтернативы введению в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует представляющий интерес белок, введенная нуклеиновая кислота может кодировать другой полипептид или белок, который индуцирует или увеличивает уровень экспрессии белка, эндогенно продуцируемого клеткой. Например, клетка может быть способна экспрессировать определенный белок, но может не выделять его без дополнительной обработки клетки. Аналогичным образом клетка может экспрессировать недостаточное количество белка для желаемой цели. Таким образом, агент, который стимулирует экспрессию представляющего интерес белка, может быть использован для индуцирования или увеличения экспрессии этого белка клеткой.

Например, введенная молекула нуклеиновой кислоты может кодировать фактор транскрипции, который активирует или усиливает транскрипцию представляющего интерес белка. Экспрессия такого фактора транскрипции, в свою очередь, приводит к экспрессии или более устойчивой экспрессии представляющего интерес белка.

[0126] Рекомбинантные белки, генные продукты или клеточные продукты, экспрессируемые в соответствии с описанными здесь способами обычно желательно выделить и/или очистить. В некоторых аспектах настоящего изобретения экспрессированный белок секретируется в среду, и, таким образом, клетки и другие твердые вещества могут быть удалены, например, путем центрифугирования или фильтрации в качестве первой стадии процесса очистки.

[0127] Альтернативно, экспрессированный белок может быть связан с поверхностью клетки-хозяина. Например, среду можно удалить, а клетки-хозяева, экспрессирующие белок, лизировать на первой стадии процесса очистки. Лизис клеток-хозяев млекопитающих может быть выполнен любым из множества способов, хорошо известным специалистам в данной области, включая физическое разрушение стеклянными шариками и воздействие условий с высоким значением pH.

[0128] Экспрессированный белок можно выделить и очистить стандартными способами, включая, помимо прочего, хроматографию (например, ионообменную, аффинную, эксклюзионную хроматографию и хроматографию на гидроксипатите), гель-фильтрацию, центрифугирование или дифференциальную растворимость, осаждение этанолом и/или можно использовать любой другой доступный способ очистки белка.

[0129] В некоторых аспектах настоящего изобретения полученные полипептиды или белки обладают фармакологической активностью, и они будут применимы для изготовления фармацевтических препаратов/композиций. Белки и пептиды могут быть представлены в препаратах, предназначенных для доставки любым доступным путем, включая, помимо прочего, парентеральный (например, внутривенный), внутрикожный, подкожный, пероральный, назальный, бронхиальный, офтальмологический, трансдермальный (местный), трансмукозальный, ректальный и вагинальный пути. Фармацевтические композиции обычно включают очищенный полипептид или белок, экспрессированный из линии клеток млекопитающих, средство доставки в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и средства, замедляющие абсорбцию, и т.п., совместимые с фармацевтическим применением

препарата. В состав препарата/композиции также можно включать дополнительные активные соединения.

[0130] Изобретение дополнительно иллюстрируется приведенными ниже неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Идентификация ингибитора

[0131] Для скрининга всего метаболома СНО использовали масс-спектроскопию с жидкостной хроматографией (LC-MS) на колонке HILIC Orbitrap™. Анализу подвергли 30000 факторов, и в отношении всей клеточной культуры выявили более 1000 факторов. Ингибирующее действие 20 основных факторов проверяли аналитическими и биологическими методами. В Таблице 1 представлены метаболиты, структура которых подтверждена анализом LC-MS. Конечную концентрацию в культуре измеряли также с помощью LC-MS, но другим методом.

Таблица 1. Структурно подтвержденные метаболиты с указанием их конечной концентрации в культуральном супернатанте.

Проверенные метаболиты		MS2	Эксп.	m/z	RT	Подтверж. значения
6	Индол-3-карбоновая кислота (ICA)	0,9300	Отриц.	160,0393	2,2	2,5
8	Метилантарная кислота (MSA)	0,8900		131,0339	3,11	13,59
10	Аконитовая кислота (AA)	0,7100	Отриц.	173,0081	4,55	14359
25	Лейциновая кислота (HICA)	0,62	Отриц.	131,0703	2,26	64,09
1	Тригонеллин (TRI)	0,6800	Положит.	138,0550	12,9	0,812
3	N-ацетилпутресциний (NAP)	0,9400	Положит.	131,1179	15,34	0,196
4	Цитидинмонофосфат (CMP)	1; 0,87	Положит. (Отриц.)	324,0591; 322,0435	18,45	11,27
5	Гуанозинмонофосфат (GMP)	0,99; 0,87	Положит. (Отриц.)	364,0653; 362,0496	18,29	20

Пример 2: Стандартные биопроцессы и биологическое подтверждение метаболитов

[0132] Стандартный промышленный стационарный процесс СНО К-1: клеточную линию NH СНО-К1 культивировали в течение 6 дней с добавлением 6 мМ глутамин в день инокуляции. Рабочий объем составлял 30 мл в шейкерных колбах емкостью 125 мл, а плотность клеток при инокуляции составляла 0,5 миллиона клеток/мл. Параметры инкубатора со встряхиванием: 125 об/мин и 5% CO₂.

[0133] Стандартный промышленный стационарный процесс для СНО GS: клеточную линию СНОZn® культивировали в течение 6 дней. Рабочий объем составлял 30 мл в шейкерных колбах емкостью 125 мл, а плотность клеток при инокуляции составляла 0,5 миллиона клеток/мл. Параметры инкубатора со встряхиванием: 125 об/мин и 5% CO₂.

[0134] Стандартный промышленный стационарный процесс для НЕК 293: клеточную линию MBL НЕК 293 культивировали в течение 6 дней. Рабочий объем составлял 30 мл в шейкерных колбах емкостью 125 мл, а плотность клеток при инокуляции составляла 0,5 миллиона клеток/мл с добавлением 6 мМ глутамин в день инокуляции. Параметры инкубатора со встряхиванием: 125 об/мин и 5% CO₂.

[0135] Клетки подвергали воздействию идентифицированных ингибирующих метаболитов из Таблицы 1 при их концентрации, достигнутой в конце культивирования в течение 6 дней в стационарной культуре. АА, ICA, СМР и смесь привели к более низкой плотности клеток, чем в контрольной группе (см. Фигуру 3). Все ингибирующие метаболиты снижали продуктивность антител (см. Фигуру 4).

[0136] Стандартный промышленный стационарный процесс с подпиткой: клеточную линию СНО-К1 культивировали в соответствующих средах. Среда подпитывали со дня инокуляции в течение 14 дней добавкой глутамин в дозе 6 мМ. Рабочий объем составлял 30 мл в шейкерных колбах емкостью 125 мл, а плотность клеток при инокуляции составляла 0,5 миллиона клеток/мл. Параметры инкубатора со встряхиванием: 125 об/мин и 5% CO₂. Стратегия подпитки: 10% соответствующей питательной среды каждый день, начиная с дня 3 по день 13.

[0137] В стандартном промышленном стационарном процессе с подпиткой клетки подвергались воздействию ингибиторов в течение длительного периода времени. Этот эксперимент имитировал процесс производства терапевтических антител, и он предусматривал увеличение дозы ингибиторов до их концентрации в клетках в конце

культивирования. Подтверждено, что ICA является известным ингибитором, и он использовался в качестве положительного контроля ингибитора. Условия для смеси исключали ICA и включали AA, HICA, CMP, MSA, TRI, NAP. Процесс продолжался в течение 14 дней, и начиная с дня 6 плотность клеток в условиях присутствия ингибитора была ниже, чем в культуре отрицательного контроля. Результаты показаны на Фигуре 3. По сравнению с контрольной культурой, CMP, ICA, TRI и HICA показали более сильное ингибирующее воздействие на рост клеток, что привело к снижению VCD на 40-50% на пике VCD в день 9.

Пример 3. Влияние метаболитов на продуктивность клеток и качество продукта

[0138] IgG измеряли с помощью ВЭЖХ на колонке с белком А. Качество продукта количественно оценивали по гликановому профилю IgG, который измеряли с помощью ВЭЖХ на гликановой колонке.

[0139] Все 7 метаболитов оказали ингибирующее действие на продуцирование и качество продукта. HICA, CMP, ICA и TRI показали сильное ингибирование в отношении продуктивности, и снижение продуктивности составило более 30% по сравнению с контролем (Фигура 4). Качество продукта является критическим параметром для биопроцесса и для одобрения лекарств, где гликановый профиль является одним из наиболее важных критических атрибутов качества (CQA). AA, HICA, CMP, MSA и ICA показали очень сильное влияние на образование G1F (Фигура 5), а AA полностью ингибировала образование G2F, а все остальные 6 ингибиторов оказали значительное влияние на образование G2F (Фигура 6). Эксперименты по введению добавок, выполненные в двух повторностях, показали, что влияние на гликановый профиль является устойчивым (см. Фигуры 7, 8 и 9).

Выводы

[0140] В ходе метаболомного исследования с контролем LC-MS, описанного в настоящем документе, выявлено более 30000 факторов, и с помощью многомерного анализа данных и анализа путей выбраны 20 лучших кандидатов-ингибиторов с высокой степенью достоверности идентификации. Кандидаты-ингибиторы с высоким рейтингом экспериментально исследованы и проверены путем внесения их в стационарную культуру, и среди них 11 из 15 продемонстрировали ингибирующее действие на рост клеток. Восемь побочных продуктов метаболизма были проверены структурно и биологически. Среди них шесть метаболитов являются новыми побочными продуктами, ингибирующими рост и/или продуктивность клеток, а 4 из них являются впервые идентифицированными метаболитами СНО (см. Таблицу 2).

Таблица 2: В этом исследовании AA, HICA, CMP, GMP, MSA, ISA, TRI и NAP идентифицированы как ингибиторы клеточного процесса с использованием CHO. В публикациях/патентах сообщалось, что GMP и ISA являются ингибиторами процесса культивирования клеток CHO, а остальные 6 метаболитов исследованы авторами изобретения впервые. TRI, NAP, AA и MSA были впервые идентифицированы авторами изобретения как метаболиты клеток CHO.

Метаболит	Конц. (мкМ)	Путь	Известность ингибитора
AA	14359	Цитратный цикл	Нет
HICA	64.09	Метаболизм лейцина	Нет
CMP	11.27	Метаболизм пиримидина	Нет
GMP	20	Метаболизм пурина	Да
MSA	13.59	Метаболизм изолейцина	Нет
ISA	2,5	Метаболизм триптофана	Да
TRI	0,812	Цикл NADPH	Нет
NAP	0,196	Метаболизм аргинина и пролина	Нет

Пример 4. Накопление ингибирующих метаболитов в стационарной культуре с подпиткой

[0141] Условия стационарного процесса с подпиткой культуры были такими же, как в случае промышленного стандартного процесса с подпиткой для CHO K-1, приведенные в Примере 2. Условия стационарного процесса были такими же, как в стандартном промышленном стационарном процессе для CHO K-1, приведенные в Примере 2.

[0142] Метаболиты идентифицировали с помощью LC-ESI-MS. В Таблице 3 показаны идентифицированные ингибирующие метаболиты, накопленные в процессе, и их накопление через 6 дней стационарного процесса и через 5, 8 и 14 дней при стационарном процессе с подпиткой.

Таблица 3: Накопление ингибирующих метаболитов в стационарном процессе и стационарном процессе с подпиткой

CHO K1	День	AA мкМ	HICA мкМ	MSA мкМ	CMP мкМ	TRI мкМ	NAP мкМ
Стационарный процесс	6	1910	10,62	3,97	11,69	0,085	0,164
Стационарный процесс с подпиткой	5	1238	8,53	1,3	1,14	0,018	0,096
	8	4026	26,95	5,62	5,82	0,132	0,178
	14	14359	64,09	13,59	11,27	0,812	0,196

[0143] В этом примере показаны концентрации ингибитора в стационарной культуре и стационарной культуре с подпиткой. На основании полученных результатов авторы изобретения пришли к выводу, что ингибирующие метаболиты накапливаются в основном биопроцессе.

Пример 5. Накопление ингибирующих метаболитов в CHO K1, CHO GS и HEK 293 в стационарной культуре

[0144] Условия стационарного процесса были такими же, как в промышленном стандартном стационарном процессе для CHO K-1, CHO GS и HEK 293, приведенные в Примере 2. Метаболиты идентифицировали с помощью LC-ESI-MS. В Таблице 4 показаны идентифицированные ингибирующие метаболиты, накопленные в процессе, и их накопление через 6 дней в стационарном процессе. В Таблице 4 показано, что шесть ингибирующих метаболитов присутствуют в различных линиях культур клеток млекопитающих, и они накапливаются в стационарной культуре.

Таблица 4. Накопление ингибирующих метаболитов в CHO K1, CHO GS и HEK 293 в стационарной культуре.

Конц. (мкМ)	AA	HICA	MSA	CMP	TRI	NAP
CHO K1	1910,00	10,62	3,97	11,69	0,09	0,16
CHO GS	717,42	31,63	2,59	78,51	0,81	0,20
HEK 293	984,53	53,80	1,55	2,43	0,02	0,17

[0145] На основании результатов о накоплениях ингибирующих метаболитов в конце стационарного культивирования, авторы настоящего изобретения пришли к выводу,

что ингибирующие метаболиты присутствуют в больших количествах в линиях клеток млекопитающих.

Пример 6: Разработка способа уменьшения накопления ингибирующих метаболитов

[0146] Трансфекция регуляторных генов для продуцирования ингибирующих метаболитов в линию клеток CHO K1 в стационарной культуре снижает рост ингибирующих метаболитов.

[0147] Целью трансфекции является сверхэкспрессия регуляторных генов/ферментов ингибирующих метаболитов. Нежарасположенные гены, кодирующие ферменты, вводили в клеточную линию CHO с использованием сконструированных плазмид с *Got1*, *Hoga1*, *Cat*, *Slc35a1* на векторе pcDNA 3.1(+) (V79020, ThermoFisher Scientific). Плазмиды амплифицировали с использованием 5-альфа-компетентной *E.coli* (C2987I, New England BioLabs). Для трансфекции плазмид в клеточные линии млекопитающих использовали полиэтиленимин (408727, Millipore Sigma) для снижения концентрации ингибирующих метаболитов за счет сверхэкспрессии регуляторных генов для ингибирующих метаболитов. Трансфекцию проводили так же, как и для стандартного промышленного стационарного процесса для CHO K1, за исключением того, что первоначальная плотность клеток при инокуляции составляла 1 миллион клеток/мл.

[0148] В Таблице 5 и на Фигуре 11 представлено следующее. Контроль указывает на контрольные условия стационарной культивирования клеток CHO K1 без трансфекции какого-либо гена; T1 указывает профиль роста клеток с *Got1*, трансфицированным в клеточную линию CHO K1; T2 указывает на трансфекцию *Got1* и *Hoga1*; и T3 указывает на трансфекцию *Got1*, *Hoga1*, *Cat* и *Slc35a1*. Как показано в Таблице 5 и на Фигуре 11, по сравнению с контрольной культурой клеток, концентрация всех ингибирующих метаболитов уменьшилась при сверхэкспрессии генов регуляции ингибирующих метаболитов в клеточной линии CHO K1, и профиль роста улучшился.

Таблица 5: Трансфекция генов регуляции ингибирующих метаболитов в клеточную линию CHO K1 в стационарной культуре.

Клоны	Дни культивирования	AA мкМ	HICA мкМ	MSA мкМ	СMP мкМ	TRI мкМ	NAP мкМ
Контроль	1	0,000	0,000	0,007	0,000	0,006	0,044

T3	1	0,000	0,000	0,010	0,000	0,004	0,000
Контроль	3	1026,918	10,696	0,865	1,720	0,021	0,158
T2	3	984,457	3,826	0,619	1,692	0,019	0,178
T3	3	874,268	2,786	0,405	0,978	0,001	0,072
Контроль	5	1910,126	10,686	3,966	11,687	0,044	0,165
T2	5	1868,026	9,951	2,868	9,433	0,042	0,129
T3	5	1277,005	9,173	2,296	5,005	0,030	0,113

[0149] На основании этих данных авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что концентрации ингибиторов уменьшилась после трансфекции генов регуляции ингибирующих метаболитов в клеточную линию СНО.

Пример 7. Разработка способа путем анализа пути, связанного с моделированием шкалы генома

[0150] Скрининг целевых генов проводили путем периодического культивирования клеток СНО при стандартных настройках и рабочих условиях (без изменений). Концентрацию ключевых питательных веществ, включая незаменимые аминокислоты и глюкозу, накопленную/истощенную во внеклеточной среде на протяжении всего периода культивирования, непрерывно измеряли с помощью LC-MS, с помощью которой рассчитывали соответствующие пути метаболического поглощения для входных ограничений в методе масштабного моделирования генома (GEM) для линии клеток СНО-K1. Затем проводили анализ баланса путей с использованием целевой функции по максимизации биомассы, чтобы установить базовую оценку роста и продуктивности биомассы. После этого каждый кодирующий ген в библиотеке генов, включенной в модель, активировали, что позволило провести повторную оценку целевой функции в конце каждой успешной итерации. В результате исследования выявили ряд генов, которые обеспечили улучшение продуктивности по биомассе, что позволило предположить, что внутренние пути эффективно перераспределены в сторону производства энергии для роста, одновременно уменьшая образование отходов и побочных метаболических продуктов. В конечном счете, путем объединения компьютерного моделирования с результатом идентификации, представленным в настоящем документе, который на основании биологического анализа подтвердил, что побочные метаболические продукты подавляют рост в культуре СНО, установили, что охарактеризованные гены вносят вклад в биопроцесс, способствуя росту клеток в биомассе по сравнению с установленным исходным уровнем, и что гены также вовлечены в биохимические процессы, в которых

потребляются идентифицированные метаболиты. Эти данные и результаты использовали для дальнейшего подтверждения путем исследования методами генной инженерии.

Материалы и методы

[0151] *Плазмидная конструкция для проверки ингибирующего воздействия.* Биологическую проверку стратегии контроля накопления метаболитов проводили с помощью транзientной трансфекции. Общая подробная стратегия разработки субклонов и анализа функциональности генов показана ниже. Для каждого соответствующего представляющего интерес гена (GOI) были созданы прямые и обратные праймеры для клонирования. Чтобы обеспечить экспрессию ферментов, в плазмиду встраивали промотор рСМV, способствующий транскрипции. Кроме того, для повышения активности трансляции добавляли последовательность Козака. Все плазмиды с рестрикционными ферментами и праймерами, включенные в это исследование, показаны в Таблице 6.

[0152] **Таблица 6.** Подробная последовательность операций анализа подклонов и анализа функциональности гена. Ген, представляющий интерес (GOI), первоначально клонировали из генома ДНК СНО, после чего каждый GOI подвергали следующим стадиям исследования методами генной инженерии для анализа функциональности гена в клетках СНО.

	Стадии	Цель
Конструирование GOI	1. ПЦР	Аmplификация GOI
	2. Гель-электрофорез	Очистка GOI
	3. Ферментативное расщепление	Конструирование GOI в плаزمидах
	4. Ферментативное лигирование	Конструирование GOI в плазмидах
Трансфекция GOI	5. Трансформация с помощью E. coli	Аmplификация сконструированных плазмид
	6. Экстракция	Очистка и экстракция плазмид
	7. Транзientная трансфекция	Экспрессия GOI в клетках млекопитающих

[0153] Конструирование плазмидного вектора. Клетки СНО-К1 экстрагировали с 4 по 6 день культивирования стационарной культуры с подпиткой. Выделение и очистку РНК СНО-К1 проводили с использованием набора RNeasy Mini Kit от Qiagen USA (Джермантаун, Мэриленд). Количественное определение концентрации РНК проводили с использованием установки NanoDrop OneC от Thermo Fischer Scientific (Уолтем, Массачусетс). Конструирование полученной библиотеки кДНК СНО-К1 осуществляли с использованием набора Superscript SS3 от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). ПЦР-

амплификацию проводили на ранее экстрагированной кДНК. GOI включают: *Adh5*, *BCat1*, *Cat*, *Got1*, *Hadhb*, *Hoga1*, *Slc35a1*. На основе данных о последовательностях генов, полученных из базы данных NCBI (Приложение А), и сайтов рестрикции плазмид создавали праймеры. Подробные сведения о последовательностях праймеров представлены в Таблице 7. ПЦР проводили для амплификации GOI с использованием ДНК-полимераз Q5[®] High-Fidelity от New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс). Продукты ПЦР очищали с помощью гель-электрофореза ДНК в течение восьмидесяти минут при 100 В с использованием набора для экстракции из геля QIAquick от Qiagen USA (Джермантаун, Мэриленд). Комплекс GOI/плазмида получали с использованием GOI и плазмиды pсDNA3.1/Zeo(+) от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). Комплекс GOI/плазмида дополнительно расщепляли ферментами рестрикции от New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс). После дефосфорилирования 5'-конца плазмиды с использованием Quick CIP от New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс), комплекс GOI/плазмида лигировали с использованием ДНК-лигазы T4 от New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс).

Таблица 7. Последовательности праймеров, предназначенные для ПЦР-амплификации. В этом исследовании были изучены семь генов в отношении ферментативной активности при повышении регуляции вследствие транзientной трансфекции, и для них показаны специфические последовательности каждого прямого и обратного праймера.

Ген	Праймер	Фермент рестрикции	Последовательность праймера (5'-3')	SEQ ID NO:
<i>Adh5</i>	Прямой	AflII	taatataacttaaggccaccatggcgaaccaggtgat	1
	Обратный	EcoRI	cggccggaattcttacagcttagaacagt	2
<i>Bcat1</i>	Прямой	AflII	taataacttaaggccaccatggactgcagtaat	3
	Обратный	EcoRI	gcccgaattctcacgataacaagattg	4
<i>Cat</i>	Прямой	AflII	atatcttaaggccaccatgatgcgatttctac	5
	Обратный	XbaI	gcgccgtctagattatcacaggtagctttt	6
<i>Got1</i>	Прямой	AflII	atacttaaggccaccatgtcgcctccgtcagtc	7
	Обратный	XbaI	ggcgcctctagattatcactggattttggtgacagc	8
<i>Hadhb</i>	Прямой	AflII	tatacttaaggccaccatgtctaccatcttgactt	9
	Обратный	EcoRI	ccggaattctcattttggataagcttcc	10

<i>Hogal</i>	Прямой	AflII	atatcttaaggccaccatgctaggccccagatgt	11
	Обратный	XbaI	gcgctctagattatcagagccagccattgttgctg	12
<i>Slc35a1</i>	Прямой	HindIII	tatataccaagcttgccaccatggctcaggcgagagaaaat	13
	Обратный	XbaI	gcgcgcgctctagattatcacacaccaatgactc	14

[0154] Трансформация плазмидами. Трансформацию бактерий проводили с использованием 50 мкл NEB® (5-альфа-компетентные клетки *E. coli* от New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс)) с 5 мкл предварительно лигированных плазмид. Клетки аккуратно перемешивали, осторожно постукивая по смесительной пробирке пять раз, и инкубировали на льду в течение 30 минут. Клетки подвергали тепловому шоку с использованием сухой бани для теплового шока клеток от Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс) при 42°C в течение тридцати секунд, и затем клетки снова инкубировали на льду в течение пяти минут. К клеткам добавляли среду для роста SOC от New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс) до общего объема 950 мкл, и всю смесь переносили в центрифужные пробирки емкостью 50 мл от VWR (Раднор, Пенсильвания). Пробирки неплотно закрывали крышками, чтобы обеспечить дыхание клеток, и инкубировали в течение девяноста минут во влажном инкубаторе со встряхиванием от Queue Systems Inc (Колумбия, Южная Каролина), при скорости 250 об/мин и температуре 37°C. Общий объем 100 мкл клеток равномерно и аккуратно распределяли с помощью одноразовой инокуляционной петли от VWR (Раднор, Пенсильвания) на чашку с агаром и ампициллином LB от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури), предварительно нагретую до 37°C. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C.

[0155] Колонии (приблизительно три-четыре) отбирали после инкубационного периода, и их смешивали с 5 мл бульонной среды LB от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури) и 5 мкл ампициллина в центрифужных пробирках емкостью 50 мл от VWR (Раднор, Пенсильвания). Пробирки неплотно закрывали крышками, чтобы обеспечить дыхание клеток, и инкубировали во влажном инкубаторе со встряхиванием от Queue Systems Inc (Колумбия, Южная Каролина) в течение 12 часов при скорости 250 об/мин и температуре 32°C. Экстракцию плазмид проводили с использованием набора ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit от Zymo Research. (Ирвин, Калифорния) после двенадцати часов инкубации. Осадки клеток выделяли с использованием центрифуги фирмы Eppendorf (Гамбург, Германия). Концентрацию плазмид (в диапазоне нг/мкл) измеряли с использованием установки NanoDrop от Thermo Fischer Scientific (Уолтем, Массачусетс). В процессе проверки использовали ферменты-рестриктазы с последующим гелем-электрофорезом для выделения GOI.

[0156] *Определение профиля метаболитов с использованием метода LC-MS/MS:* Стандарты метаболитов приобретали в Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури), и их использовали для идентификации метаболитов-отходов, обладающих ингибирующим действием. Рабочие параметры и порядок подготовки проб соответствовали ранее описанному протоколу.

[0157] *Клетки, среды и добавки.* Для этого исследования использовали клеточную линию CHO-K1, экспрессирующую антитело IgG (VRC01), полученную из НИИ (Национального института здравоохранения), с двумя собственными средами. Условия инокуляции и культивирования клеток соответствовали ранее описанному протоколу.

Результаты и обсуждение

[0158] *Анализ путей метаболизма CHO.* Глобальный метаболомный анализ различных режимов биопроцесса CHO выявил восемь различных побочных продуктов роста, которые накапливались на протяжении всего периода культивирования клеток. Однако, хотя эффекты ингибирования роста из-за присутствия этих метаболитов во внеклеточной среде CHO были подтверждены, соответствующий путь, посредством которой метаболизируются их питательные предшественники, и степень метаболизма в настоящее время неизвестны. Таким образом, на основе анализа путей метаболизма в сочетании с анализом GEM была разработана стратегическая методология для контроля степени накопления ингибирующих рост метаболитов в биопроцессе для CHO. Анализ метаболических путей проводили для каждого метаболита в сочетании с анализом GEM, после чего метаболиты были сопоставлены с целостной регуляторной метаболической сетью. В первую очередь рассматривали все метаболические ферменты, способные либо к прямому/непрямому катаболизму токсичных метаболитов, либо к перераспределению метаболических путей в альтернативные метаболические ветви, не приводящие к образованию побочных продуктов-ингибиторов. Контроль накопления ингибиторов оценивали путем усиления экспрессии идентифицированных генов-кандидатов, ответственных за модуляцию таких ферментов. Перечень генов-кандидатов дополнительно проверяли биологически с помощью методов генной инженерии для оценки их влияния на рост. Окончательный перечень генов, посредством которых активация ферментативной активности может стимулировать рост продуцирования продуктов, соответствующие метаболические пути и соответствующие входные метаболиты показаны в Таблице 8.

Таблица 8. Гены, соответствующие метаболические пути и регулируемые нижестоящие метаболиты. Функциональность генов и путей показаны в предыдущих исследованиях, выполненных на различных линиях клеток млекопитающих. В этом исследовании гены были встроены в плазмиды, которые транзистентно трансфецировали в клетки, когда клетки достигли плотности жизнеспособных клеток, составляющей 1×10^6 клеток/мл.

Гены	Связанные метаболические пути	Регулируемые метаболиты
<i>Adh5</i>	Метаболизм лейцина ¹	HICA, MSA
<i>Bcat1</i>	Метаболизм лейцина, метаболизм изолейцина ²	HICA, MSA
<i>Cat</i>	Метаболизм триптофана ¹	TRI
<i>Got1</i>	Метаболизм глутамата/глутамин ³ , метаболизм аргинина/пролина ³ , метаболизм аспартата ³	TAA, CMP, NAP, TRI
<i>Hadhb</i>	Метаболизм изолейцина ¹	HICA, MSA
<i>Hogal</i>	Метаболизм аргинина/пролина (UK)	CMP, TAA, NAP
<i>Slc35a1</i>	Метаболизм пиримидина ²	CMP

¹ фермент контролирует другие метаболические пути, в которых происходит потребление метаболитов.

² нижестоящий фермент участвует в биохимическом процессе, в котором метаболиты используются в качестве входных реагентов.

³ известно, что они участвуют в метаболических путях, но точная взаимосвязь путей изучена недостаточно.

[0159] *Генно-инженерная стратегия, направленная на накопление метаболитов.* Анализ путей, проведенный в отношении HICA и MSA, выявил, что они происходят из пути, связанного с катаболизмом ВСАА. На первой стадии катаболизма перенос α -аминогруппы от каждой аминокислоты-предшественника (лейцина, изолейцина и валина) приводит к образованию трех различных соответствующих α -кетокислот с разветвленной цепью. Дезаминирование лейцина катализируется аминокислотной трансферазой с переносом аминогруппы лейцина на акцептор α -кетокислоты в α -кетоглутарате. Другие ВСАА (например, валин и изолейцин) также обладают свойством акцептора α -кетокислоты, что и лейцин. Дальнейший анализ показал, что HICA является конечным продуктом метаболизма лейцина, в частности, путем прямого преобразования кетокислоты в гидроксильную кислоту. Таким образом, регуляция накопления α -

кетозокапроновой кислоты (КИС) является основной стратегией модуляции метаболических путей, приводящих к образованию НИСА, как показано на Фигуре 12. В частности, перераспределение путей, превращающих α -кетоглутарат в глутамат до другой ВСАА, эффективно уменьшит в данный момент времени присутствие α -кетоглутарата, который может участвовать в превращении лейцина в КИС. Таким образом, повышающая регуляция цитозольной трансаминазы ВСАА (BCAT1) является одним из эффективных подходов к контролю образования НИСА. Можно привести дополнительный аргумент, выраженный в том, что снижение КИС может компенсировать доступные пути, идущие на выработку ацетил-КоА, который является важнейшим субстратом для выработки энергии на протяжении всего цикла Кребса. Хотя это остается верным в отношении количества ацетил-КоА, образующегося в результате катаболизма лейцина, важно отметить, что ацетил-КоА также может образовываться в результате катаболизма изолейцина или в результате конверсии сукцинил-КоА, что приводит к понижающей регуляции пути деградации лейцина, и, как следствие, ведет к образованию меньшего количества метаболитов НИСА в качестве побочных продуктов.

[0160] Дополнительные пути также были изучены с помощью GEM. В клетках СНО алкогольдегидрогеназа (ADH5) катализирует реакцию внеклеточного транспорта с участием формальдегида и глутатионата. Исследование глутатионата с помощью GEM выявило ключевые реакции, конвертирующие глутатионат в КИС через путь метаболизма лейцина, участвующий в пути 1 и пути 2, как показано на Фигуре 12. Для пути 1 глутатионат участвует в реакции образования цистеина из цистина, который является побочным продуктом реакции транспортировки лейцина из цитоплазмы во внеклеточный лейцин. Для пути 2 характерно, что за счет метаболизма глутатионата образуется глутамат, который служит метаболитом, участвующим в реакции генерации КИС. Повышающая регуляция активности ADH5 дополнительно метаболизирует глутатионата в формальглутатионат, уменьшая количества глутатионата, доступного для участия в других реакциях, приводящих к образованию комплементарных субстратов (т.е. уменьшение количества образующегося лейцина, который может метаболизироваться в КИС для пути 1, или уменьшение количества глутамата, который может катализировать реакцию, приводящую к КИС, для пути 2).

[0161] Как отмечалось ранее, триптофан служит основным субстратом метаболизма никотинамида, в результате которого в качестве побочного продукта образуется метаболит TRI (см. Фигуру 13А). Пролин, метаболизируясь главным образом в пируват в качестве основного субстрата цикла ТСА, также образует NAP в качестве побочного продукта (см. Фигуру 13В). С другой стороны, метаболит ТАА представляет

собой прямой продукт отходов цикла TCA (см. Фигуру 13C). CMP является основным метаболитом, участвующим в метаболизме пиримидинов (см. Фигуру 13D). Повышающая регуляция CAT за счет метаболизма триптофана и никотината/никотинамида (целевой метаболит TRI), GOT1 и HOGA за счет метаболизма пролина (целевой метаболит NAP), GOT1 за счет метаболизма глутамата и цикла TCA (целевой метаболит TAA) и SLC35A1 посредством биосинтеза N-гликанов, позволяет контролировать и управлять стратегией накопления идентифицированных метаболитов.

[0162] *Оценка эффективности трансфекции плазмид.* Для оценки эффективности трансфекции использовали ген GFP в качестве репортера экспрессии во время трансляции. Плазмиду, созданную с помощью гена GFP, встраивали в клеточную линию CHO-S, и интенсивность флуоресценции оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Условия для клеток дикого типа использовали в качестве контроля для условий трансфекции. Клетки контроля, так же как и клетки для трансфекции, получали из одной и той же культуры, чтобы исключить вариации в цикле роста и других условиях культивирования. Сравнение измерений интенсивности флуоресценции после трансфекции на день 2 и день 3 для каждого из условий трансфекции и контроля показано на Фигуре 14. Эффективность трансфекции клеточных линий CHO-S составила 35,2% на второй день при использовании поставляемой среды и конкретных условий культивирования (см. выше раздел «Материалы и методы»). В день 3 измеренная эффективность увеличилась до 43,1%, что подтверждает, что клетки CHO-S успешно экспрессируют GFP на стадии продуцирования. Полученные результаты также подтверждены с помощью флуоресцентной микроскопии, поскольку у клеток также зарегистрировали высокий уровень флуоресцентных маркеров при визуализации под флуоресцентным светом, как показано на Фигуре 15.

[0163] *Количественная оценка уровня экспрессии представляющего интерес трансфицированного гена с помощью qPCR.* Уровень экспрессии семи различных генов, трансфицированных в клетки CHO-S, оценивали с использованием относительного количественного анализа (RQ) по сравнению с калибратором. Исследование выполняли в отношении восьми уникальных групп субклонов. Каждый субклон подвергали сверхэкспрессии отдельного GOI за счет транзientной трансфекции при концентрации плазмиды 50 мкг/мкл в клетки, и также исследовали дополнительную группу субклонов со смесью генов, где все семь генов трансфицировали в клетки одновременно, но при более низкой концентрации индивидуальной плазмиды, по сравнению с трансфекцией отдельного GOI (6,25 мкг/мкл на ген, общая концентрация плазмид 43,75 мкг/мкл для всех семи генов). В исследование включали отрицательный контроль, в отношении которого не

проводилось никаких генно-инженерных операций, связанных с трансфекцией плазмид. Каждый субклон культивировали в течение 6 дней. Клетки как для контрольного субклона, так и для трансфицированных субклонов получали из одной и той же культуры, чтобы исключить различия в цикле роста клеток и в условиях культивирования. Графики, отражающие результаты, полученные с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR), показаны на Фигурах 16A-G. Как видно, уровень экспрессии генов в контроле был самым низким во всех случаях, за ним следовал случай, когда использовали смесь генов, где каждый ген трансфицировали в дозе 6,25 мкг/мкл с общей концентрацией плазмиды для семи генов составляющей 43,75 мкг/мкл, по сравнению с концентрацией плазмид 50 мкг/мкл, использованной в случае отдельных генов. Диапазон полученных значений RQ показал значительную вариабельность среди каждого случая трансфицирования по сравнению со случаем трансфекции смеси генов, и наоборот, для контроля. Таким образом, результаты этого исследования предполагают, что все сконструированные плазмиды, где плазмиды включали индивидуальные гены, показали различный уровень экспрессии генов при вставке в клетки в зависимости от GOI, и все они показали более высокий уровень экспрессии генов по сравнению с отрицательным контролем для образцов, полученных на 3-й день, когда имеет место наибольшая экспрессия гена в стационарной культуре клеток СНО, что служит достоверным показателем того, что плазмиды были успешно трансфицированы в клетки, и все GOI обеспечили экспрессию в процессе трансляции СНО.

[0164] *Исследование функциональности генов посредством анализа метаболических путей.* Как отмечено ранее, HISA образуется в качестве метаболита ниже пути метаболизма лейцина в клетках млекопитающих, у которых биохимическая активность в клетках регулируется ферментами ADH5 и BCAT1. Сравнивали все семь генов, каждый из которых был трансфицирован индивидуально в клетки при концентрации плазмиды 50 мкг/мкл, с группой субклонов, трансфицированных смесью генов, где все семь генов были трансфицированы в клетки одновременно, но при более низких концентрациях, чем для отдельных плазмид (концентрация плазмид для индивидуальных генов составляла 6,25 мкг/мкл, для смеси семи генов - 43,75 мкг/мкл). В исследование включен отрицательный контроль, в отношении которого не проводилось никаких генно-инженерных операций, связанных с трансфекцией плазмид. Полученные результаты показаны на Фигурах 17A-G.

[0165] Клоны, трансфицированные Adh5 и Bcat1, показали снижение накопления HISA на 86,13% и 72,31% соответственно (см. Фигуру 17A). Что касается метаболизма разветвленных аминокислот (BCAA), то путь метаболизма изолейцина активно

взаимодействует с путем метаболизма лейцина (см. Фигуру 12). Исследование показало, что благодаря сверхэкспрессии гена *Nadhb* в клетках СНО, накопление НСА в СНО уменьшилось на 27,05% (см. Фигуру 17С) по сравнению с контролем, что позволяет предположить, что клеточные метаболические пути перераспределены в большей степени в сторону метаболизма изолейцина, и, следовательно, они в меньшей степени ведут к образованию побочных продуктов, ингибирующих рост клеток (в данном случае - НСА).

[0166] Что касается TRI, то этот метаболит является частью пути метаболизма никотинамида, и он образуется как продукт метаболизма NAD и NADH, для которых никотинамид является предшественником. В этом исследовании клоны со сверхэкспрессией генов *Cat* и *Got1* показали снижение накопления TRI соответственно на 27,8% и 40,43% (см. Фигуру 17В). Кроме того, клоны, сверхэкспрессирующие гены *Got1*, *Hoga1* и *Slc35a1*, показали снижение накопления СМР соответственно на 35,68%, 33,59% и 50,63% (см. Фигуру 17С). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки перераспределили внутренние метаболические пути в сторону метаболизма глутамина, пиримидина, аргинина и пролина, и в меньшей степени в сторону образования побочных продуктов, ингибирующих рост (в данном случае СМР).

[0167] В целом результаты показали, что НСА, TRI и СМР являются метаболическими побочными продуктами, образующимися в результате метаболизма ВСАА, триптофана, глутамина и пиримидина в системе клеток СНО, а также в других клетках-хозяевах млекопитающих. Кроме того, благодаря генной инженерии, обеспечившей сверхэкспрессию вышестоящих генов, участвующих в различных метаболических путях, выполненное исследование также показало, что повышение трансляционной активности метаболических ферментов, включая *ADH5*, *BCAT1*, *CAT*, *GOT1*, *HOGA1* и *SLC35A1*, может контролировать и управлять образованием метаболитов, ингибирующих рост, либо за счет увеличения интенсивности биохимических реакций путей, которые метаболизируют побочные продукты-отходы (следующий фермент к образованию отходов), либо за счет перераспределения действующих метаболических путей на другие альтернативные метаболические пути.

[0168] Интересно отметить, что накопление НСА в культуре СНО значительно снижается при сверхэкспрессии гена переносчика пиримидина *Slc35a1* (накопление меньше на 73,51% по сравнению с контролем, см. Фигуру 17А). Кроме того, активация *Vcat1* и *Nadhb1* также привели к снижению накопления TRI соответственно на 42,96% и 35,38%. Таким образом, полученные данные и результаты свидетельствуют о том, что ферменты *SLC35A1*, *BCAT1* и *NADHB1* потенциально взаимодействуют с образованием НСА и TRI через недостаточно изученные метаболические пути. Результаты также

показывают, что в большинстве случаев сверхэкспрессия метаболических генов снижает накопление СМР по сравнению с контролем, что позволяет предположить, что пиримидины взаимодействуют со многими различными путями метаболизма аминокислот.

[0169] Полученные результаты также показали, что накопление концентраций ТАА, МСА и NAR в собираемой культуре в конце культивирования клеток во всех субклонах не показало существенной разницы по сравнению с контролем (см. Фигуры 17D, 17E и 17F). Не ограничиваясь теорией, предполагается, что эти метаболиты не происходят из известных путей метаболизма, как в других клеточных линиях млекопитающих (см. Таблицу 7).

[0170] Таким образом, генетическое вмешательство в соответствующие гены, ответственные за гликолиз и/или пути метаболизма пролина и изолейцина, возможно может обеспечить более надежный набор инструментов для разработки правильной стратегии контроля и контроля образованием этих метаболитов, ингибирующих рост.

[0171] *Оценка продуктивности культуры.* Профиль роста всех отдельных субклонов показан на Фигурах 18А-В. Кроме того, в экспериментах также изучали эффект усиления регуляции для всех сконструированных векторов (для семи генов), трансфицированных в линию клеток СНО-S в концентрации 6,25 мкг/мкл на ген (см. Фигуру 19). В обоих случаях клетки культивировали в стационарном режиме до тех пор, пока жизнеспособность клеток не снизилась до величины менее 80%. В целом, все субклоны (с отдельными генами, а также со смесью генов) со сверхэкспрессией метаболических генов показали увеличение роста по сравнению с контролем. Результаты в целом позволяют предположить, что рост клеток СНО в биопроцессах можно улучшить либо за счет увеличения выработки клеточной энергии, используемой для роста, путем метаболизма ингибирующих рост метаболитов в качестве реагентов в некоторых недостаточно изученных биохимических путях (и, следовательно, снижения их накапливающейся концентрации), либо путем перераспределения метаболических переходит в альтернативные пути метаболизма, которые не приводят к образованию побочных продуктов метаболизма, которые могут подавлять клеточную пролиферацию.

[0172] Профиль потребления питательных веществ. Профиль потребления питательных веществ всеми трансфицированными субклонами показан на Фигурах 20А - 20G. В целом, клетки во всех условиях культивирования потребляли наибольшее количество питательных веществ в день 4 стационарного культивирования. В целом профиль потребления ключевых обменных ионов, включая натрий и калий, из трансфицированного субклона обычно выше по сравнению с контролем. Традиционно

клетки используют насосный механизм транспорта Na^+ / K^+ для регулирования водного баланса и других физиологических состояний клеток. Предполагается, что более высокая скорость поглощения ионов способствует активности градиента обмена ключевых питательных веществ, что предполагает, что клетки более быстро используют субстрата и имеют более высокий уровень метаболической активности, когда активируются ключевые целевые биохимические пути, обеспечивающие прямой/опосредованный катаболизм идентифицированных метаболитов. Это дополнительно приводит к более высокому профилю накопления аммиака и лактата, измеренному в день 4 и 6 стационарного процесса (см. Фигуру 20C и Фигуру 20D). Однако пиковая плотность жизнеспособных клеток (VCD) и кумулятивная интегральная плотность жизнеспособных клеток (IVCD) во всех условиях не была ниже, что показано на Фигурах 18A - 18B, где показано, что характеристики культуры для всех сконструированных субклонов являются лучшими по сравнению с контролем. Интересно, что все трансфицированные субклоны показали более высокий профиль потребления глюкозы на протяжении всего периода культивирования (накопление глюкозы было меньше: см. Фигуру 20D), с более лучшим профилем потребления, начиная с дня 4 по день 6. При сравнении профиля потребления питательных веществ (см. Фигуры 20A - 20G), этот период культивирования совпадает с клеточной фазой продуцирования, и, таким образом, улучшенные характеристики клеточного роста (более высокая плотность клеток) позволяют клеткам использовать больше глюкозы для продуцирования белков. Результаты, полученные с различными профилями клеточной активности, позволяют предположить, что продуктивность клеток также повышается за счет более высокого потребления глюкозы во время фазы продуцирования, поскольку клетки используют глюкозу преимущественно для производства гликанов. В будущем могут быть проведены работы, направленные на исследование профиля титров клеток после трансфекции, для анализа продуктивности субклонов СНО с усиленным ростом за счет продуцирования ими менее токсичных ингибиторов роста. Интересно, что измеренная концентрация глутамин в день 4 у субклона *Got1* оказалась значительно выше по сравнению с контролем. Традиционно считается, что фермент GOT1 катализирует биосинтез глутамата из аспартата и цистеина. Можно предположить, что повышающая регуляция *Got1* вызывает выработку большего количества глутамата, который может быть конвертирован в глутамин через путь синтеза глутамин, регулируемый глутаминсинтетазой. Тем не менее, в будущем необходимы исследования, направленные на генетические вмешательства в изученные гены, ответственные за эти метаболические пути, чтобы лучше объяснить наблюдаемую тенденцию в профиле обмена питательных веществ.

[0173] Авторами настоящего изобретения также был изучен профиль потребления питательных веществ в условиях, когда использовали смесь генов, как показано на Фигурах 21А - 21G. В целом, накопленная концентрация натрия и калия, измеренная на протяжении всего периода культивирования, была выше для условий смеси генов по сравнению с контролем (см. Фигуры 21А и 21В), за исключением дня 7, когда профиль накопления натрия и калия в контроле состояние было выше. Данные согласуются с тенденцией, наблюдаемой из профиля роста, где субклон со смесью генов достиг более высокого пика VCD и кумулятивного IVCD. Было высказано предположение, что более высокая плотность клеток в культуре со смесью генов потребляет больше натрия и калия для поддержания роста и другой клеточной активности, за исключением дня 7, когда произошла гибель клеток. Интересно, что в условиях, когда использовалась смесь генов, потребление глутамина и глутамата было меньшим (количества накопленного глутамина и глутамата, измеренные в отработанной среде, увеличено, что показано на Фигурах 21Е и 21G), при уменьшении количества аммиака и лактата (см. Фигуры 21С и 21D, где показана более низкая концентрация аммиака и лактата), и имели место более высокий пик плотности жизнеспособных клеток (VCD) и кумулятивная интегральная плотность жизнеспособных клеток IVCD (см. Фигуры 19А и 19В). В целом, полученные данные и результаты свидетельствуют о том, что когда все семь генов трансфицированы в клетки одновременно, эффект от трансфицированных генов является более значительным, и при этом клетки в изучаемых условиях потребляют меньшее количество питательных веществ, что обеспечивает продуцирование ими меньшего количества токсичных побочных продуктов роста клеток и ингибирующих метаболитов (см. Фигуру 17), что позволяет достичь более высокой общей плотности клеток и лучших показателей культивирования.

Заключение

[0174] Известно, что клетки млекопитающих секретируют ингибирующие рост метаболиты во время фазы роста и фазы продуцирования, что ухудшает показатели продуктивности клеток и отрицательно влияет на качество продукта. Для типового биопроцесса для клеток СНО и НЕК 293 идентифицированы восемь ингибиторов роста. Семь из этих генов (*Adh5*, *Bcat1*, *Cat*, *Got1*, *Hadhb*, *Hogal* и *Slc35a1*) были трансфицированы в клетки СНО для регулирования их метаболизма. Концентрации метаболитов, измеренные с помощью LC-MS/MS, были успешно снижены за счет перераспределения внутренних метаболических путей, существующих в клетках, в ключевые метаболические пути, способные к прямому или опосредованному метаболизму

ранее идентифицированных ингибиторов. Когда семь идентифицированных генов были индивидуально трансфицированы в клетку при концентрации плазмид с одним геном 8 мкг/мкл, то пик плотности жизнеспособных клеток (VCD) и кумулятивная интегральная плотность жизнеспособных клеток IVCD повышались по сравнению с контролем на протяжении всего периода культивирования после трансфекции клеток. Концентрация ингибирующих метаболитов, накопленных в отработанной среде каждого субклона, измеренная с помощью LC-MS/MS, также снижалась.

[0175] Каждый из семи генов также трансфицировали вместе в клетки в концентрации 6,25 мкг/мкл на ген (общая концентрация плазмид с семью генами составляла 43,75 мкг/мкл). Полученные результаты показали, что при этом также достигнуто улучшение продуцирующей способности клеток: использование смеси генов обеспечило достижение более высокого пика VCD и кумулятивной IVCD. Интересно, что эффект трансфекции смеси нескольких генов по-видимому оказывает более глубокое влияние на клеточный метаболизм по сравнению с трансфекцией одного гена. Проведенное исследование показывает, что в условиях использования смеси генов клетками потребляется меньшие количества глутамин и глутамат (в отработанной среде присутствует большие количества накопленного глутамин и глутамат), что позволяет клеткам секретировать меньше аммиака и лактата, в то же время сохраняя лучший профиль роста и уменьшая продукцию метаболитов, ингибирующих рост. В целом, успешно продемонстрировало, что при сочетании моделирования в масштабе генома с анализом путей, настоящее исследование проясняет базу для разработки стратегии контроля, способную уменьшить накопление метаболитов путем переориентации существующих метаболических путей в другие конкретные метаболические пути, способные метаболизировать ингибиторы роста и стимулировать клеточный рост.

[0176] Использование терминов в единственном числе (особенно в контексте следующей далее формулы изобретения) подразумевает включение определений в единственном числе и во множественном числе, если не указано иное или явно не противоречит контексту. Термины «первый», «второй» и т.д., используемые в данном документе, не предназначены для обозначения какого-либо конкретного порядка, а просто для удобства описывают множество, например, определений. Термины «содержащий», «имеющий», «включающий в себя» и «включающий» рассматриваются в виде открытых терминов (т.е. означающих как «включающий» без ограничения), если не указано иное. Предполагается, что перечисление диапазонов значений используется только в виде сокращенного способа упоминания каждого отдельного значения, входящего в указанный диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение, входящее в указанный

диапазон, включено в описание так, как если бы оно было указано конкретно. Конечные точки всех диапазонов включены в диапазон значений, и они могут комбинироваться независимо друг от друга. Все способы, описанные здесь, можно выполнять в подходящем порядке, если не указано иное, или если это не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или иллюстративного изложения (например указания «такой как»), сделано только с целью более понятного описания настоящего изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения, если не указано иное. Никакие описательные выражения, используемые в описании настоящего изобретения, не следует рассматривать как указание на какой-либо не заявленный элемент или признак в качестве необходимого для осуществления настоящего изобретения, описанного в настоящем документе.

[0177] Хотя настоящее изобретение описано здесь со ссылкой на иллюстративный вариант осуществления, специалистам в данной области техники понятно, что могут быть внесены различные изменения, и некоторые элементы или признаки могут быть заменены их эквивалентами не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения. Кроме того, можно внести множество модификаций в описанные технические решения для адаптации конкретной ситуации или материала, не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения. Таким образом, предполагается, что настоящее изобретение не ограничивается конкретным вариантом осуществления, раскрытым здесь как лучший вариант осуществления настоящего изобретения, и настоящее изобретение будет включать все варианты осуществления, попадающие в объем прилагаемой формулы изобретения. Любая комбинация вышеописанных элементов и признаков во всех их возможных вариантах охватывается настоящим изобретением, если иное не указано явным образом по тексту описания или иным образом не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ культивирования клеток, предусматривающий

(i) культивирование клеток в среде для культивирования клеток, и

(ii) поддержание по меньшей мере одного метаболита на уровне ниже ингибирующей концентрации в среде культивирования клеток, содержащей по меньшей мере этот один метаболит, путем регулирования экспрессии фермента для уменьшения синтеза метаболита,

где по меньшей мере один метаболит представляет собой аконитовую кислоту (AA), лейциновую кислоту (HICA), цитидинмонофосфат (CMP), метилантарную кислоту (MSA), тригонеллин (TRI), N-ацетилпутресциний (NAP) или их комбинацию, и

фермент включает ADH5, BCAT1, CAT, GOT1, HADHB, HOGA1, SLC35A1 или их комбинацию.

2. Способ по п.1, где способ дополнительно предусматривает измерение концентрации по меньшей мере одного метаболита, и когда измеренная концентрация по меньшей мере одного метаболита превышает заданное значение, осуществляют регулирование экспрессии фермента для снижения синтеза метаболита.

3. Способ по п.2, где регулирование экспрессии фермента для снижения синтеза метаболита включает добавление молекулы рекомбинантной ДНК для сверхэкспрессии фермента, при этом фермент представляет собой нижерасположенный фермент.

4. Способ по п.1,

где метаболит представляет собой HICA, и фермент включает ADH5, BCAT1, SLC35A1, GOT1, HADHB или их комбинацию;

где метаболит представляет собой CMP, и фермент включает ADH5, BCAT1, CAT, GOT1, HOGA1, SLC35A1, HADHB или их комбинацию;

где метаболит представляет собой MSA, и фермент включает BCAT1, GOT1, HADHB, HOGA1, SLC35A1 или их комбинацию;

где метаболит представляет собой TRI, и фермент включает BCAT1, GOT1, HADHB, CAT, HOGA1, SLC35A1 или их комбинацию;

где метаболит представляет собой NAP, и фермент включает BCAT1, SLC35A1, HOGA1, GOT1, CAT, HADHB или их комбинацию;

где метаболит представляет собой TAA, и фермент представляет собой BCAT1, ADH5, GOT1, HOGA1, SLC35A1, HADHB или их комбинацию; или

их комбинация.

5. Способ по п.1, где фермент включает ADH5, BCAT1, GOT1, HADHB, HOGA1, SLC35A1 и CAT.

6. Способ по п.1, где концентрацию по меньшей мере одного метаболита измеряют с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), рамановской спектроскопии, высокоэффективной/ультраэффективной жидкостной хроматографии (H/UPLC), жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS), газовой хроматографии и масс-спектрометрии (GC-MS) или их комбинации.

7. Способ по п.1, где поддержание по меньшей мере одного метаболита на уровне ниже ингибирующей концентрации, определенной в среде культивирования клеток, содержащей по меньшей мере один метаболит, предусматривает контроль температуры, уровня растворенного кислорода, рН или их комбинации.

8. Способ по п.1, где клетки представляют собой клетки CHO, клетки НЕК 293, клетки HT-1080, сконструированные Т-клетки или сконструированные естественные клетки-киллеры.

9. Способ по п.1, где культура клеток представляет собой стационарную культуру, стационарную культуру с подпиткой или перфузионную культуру.

10. Способ по п.1, где клетки экспрессируют рекомбинантный белок, генный продукт или клеточный продукт.

11. Способ по п.10, где рекомбинантный белок представляет собой моноклональное антитело.

12. Способ по п.1, где рост клеток и/или продуктивность увеличены по сравнению с контрольной культурой, причем контрольная культура идентична культуре клеток согласно п.1, за исключением того, что ее не культивируют с использованием стадии (ii).

13. Способ по п.12, где рост клеток определяют по максимальной плотности жизнеспособных клеток и он увеличен по меньшей мере на 5% по сравнению с контрольной культурой.

14. Способ по п.1,
где метаболит представляет собой АА, и концентрация АА в среде культивирования клеток составляет менее 440 мкМ,

где метаболит представляет собой НІСА, и концентрация НІСА в среде культивирования клеток составляет менее 23,5 мкМ,

где метаболит представляет собой СМР, и концентрация СМР в среде культивирования клеток составляет менее 10 мкМ,

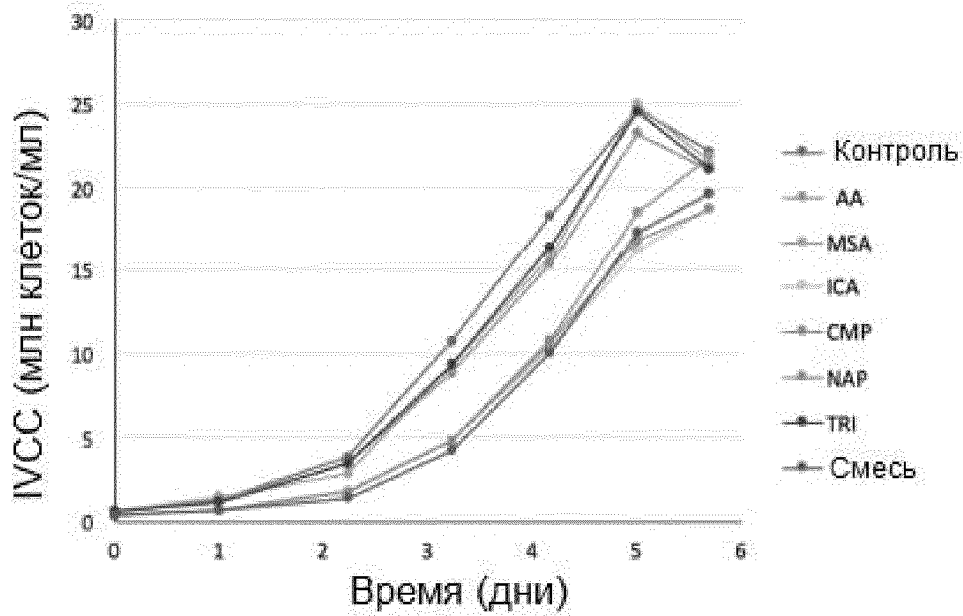
где метаболит представляет собой МSA, и концентрация МSA в среде культивирования клеток составляет менее 3,75 мкМ,

где метаболит представляет собой TRI, и концентрация TRI в среде культивирования клеток составляет менее 0,35 мкМ, или

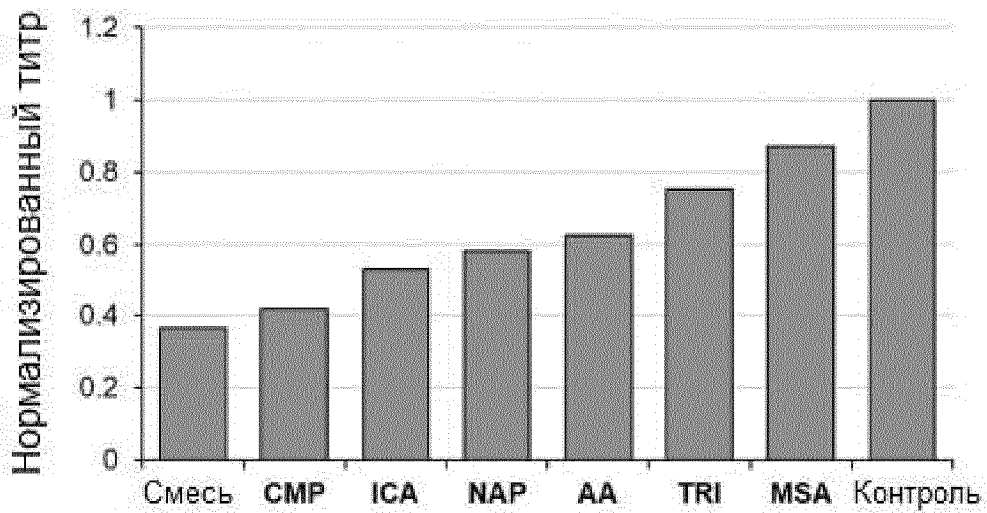
где метаболитом является NAP, и концентрация NAP в среде культивирования клеток составляет менее 0,3 мкМ.

15. Способ по п.1, где концентрацию по меньшей мере одного метаболита измеряют с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), рамановской спектроскопии, высокоэффективной/ультраэффективной жидкостной хроматографии (H/UPLC), жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS), газовой хроматографии и масс-спектрометрии (GC-MS) или их комбинации.

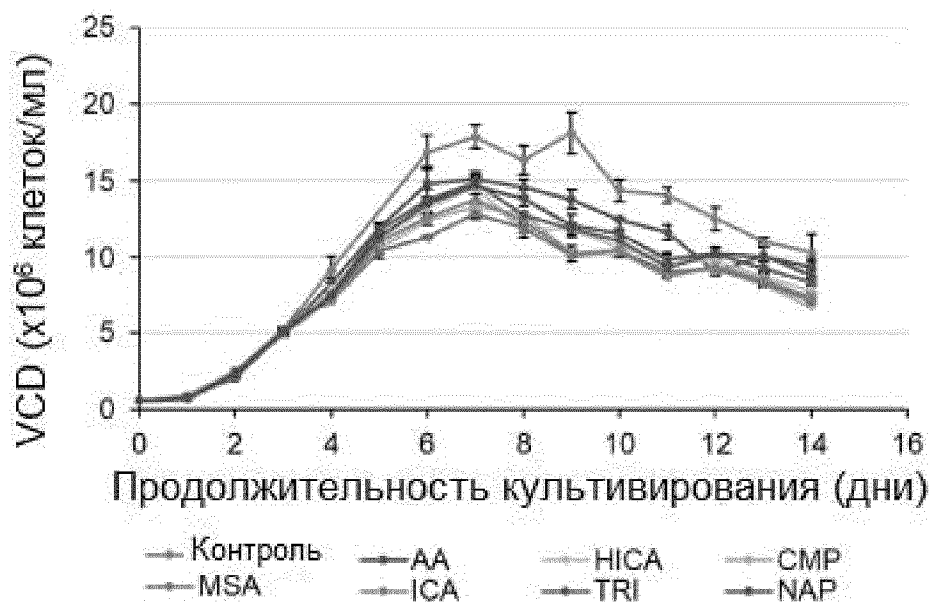
Стационарная культура
(интегрированная плотность жизнеспособных клеток)



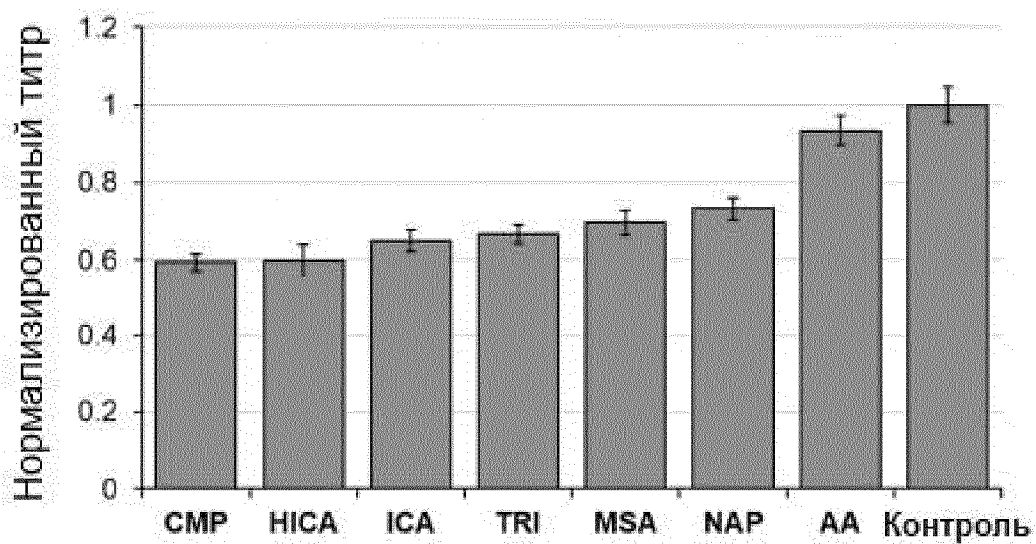
ФИГ. 1



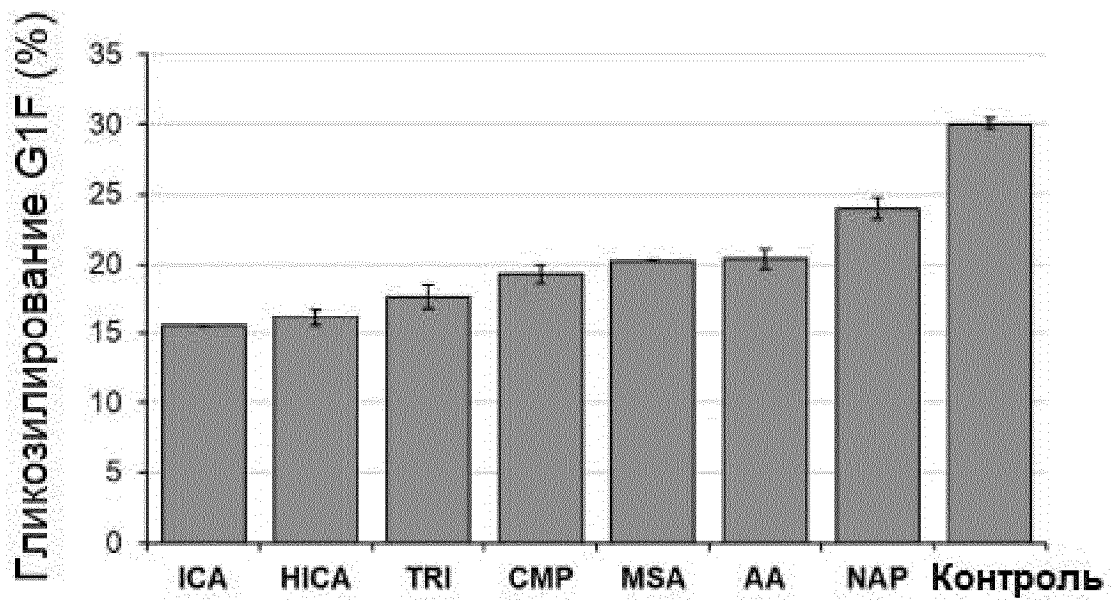
ФИГ. 2



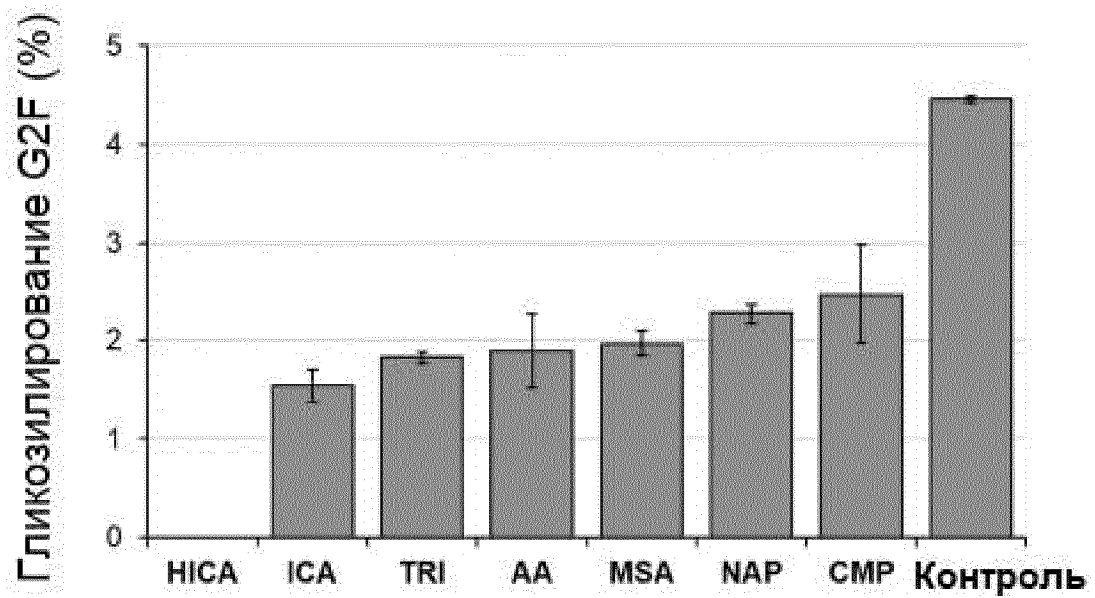
Фиг. 3



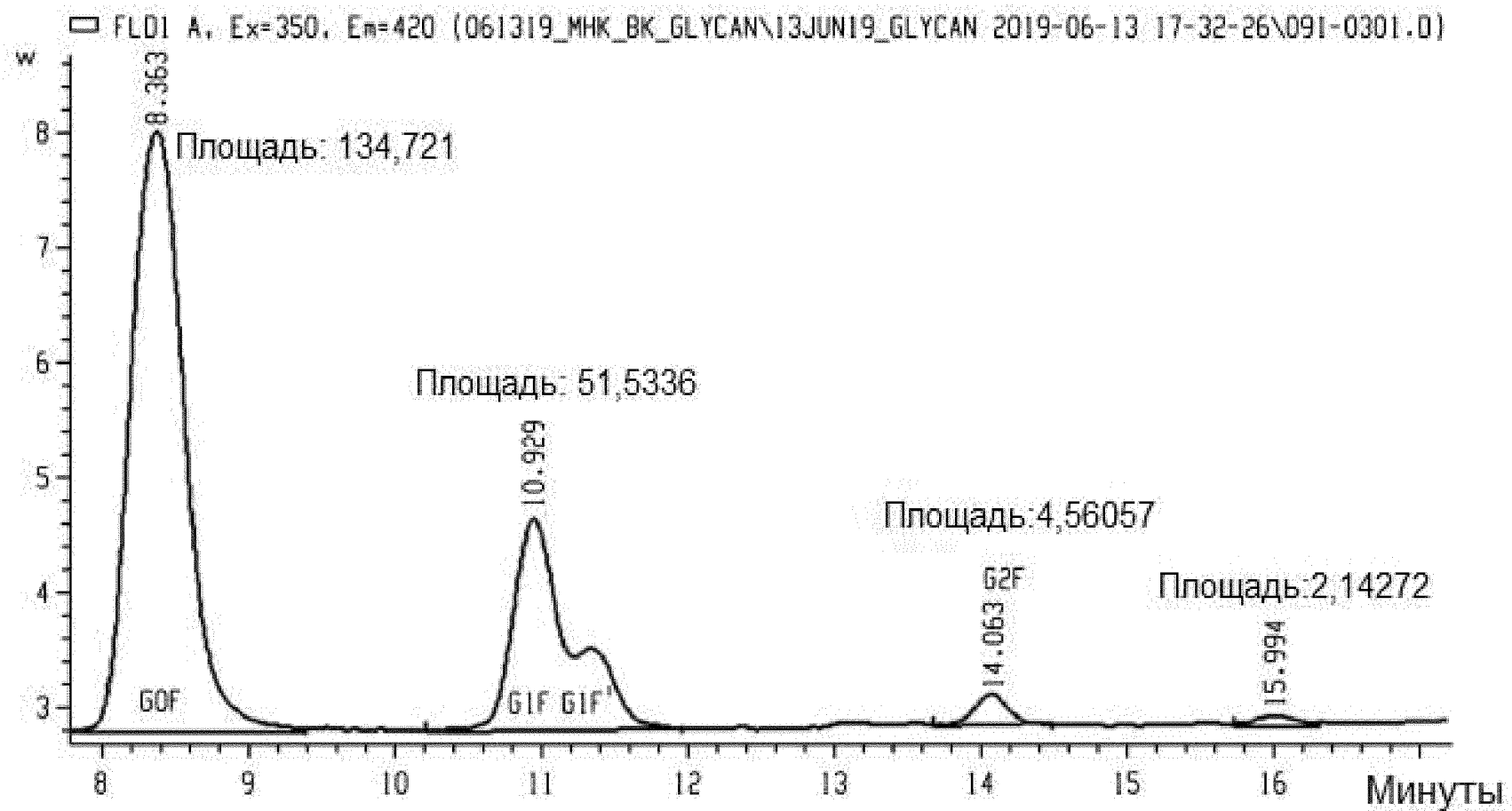
Фиг. 4



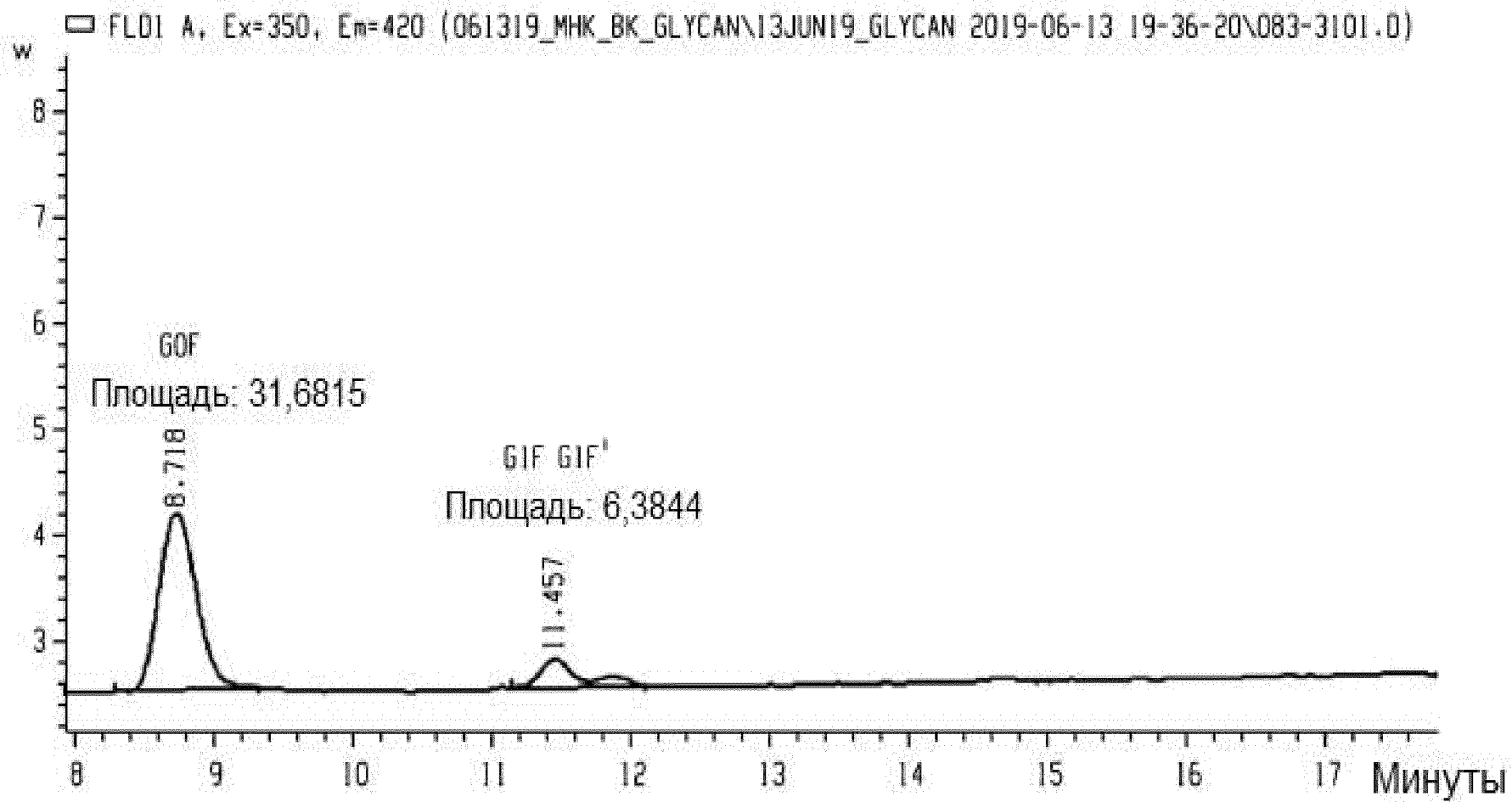
ФИГ. 5



ФИГ. 6

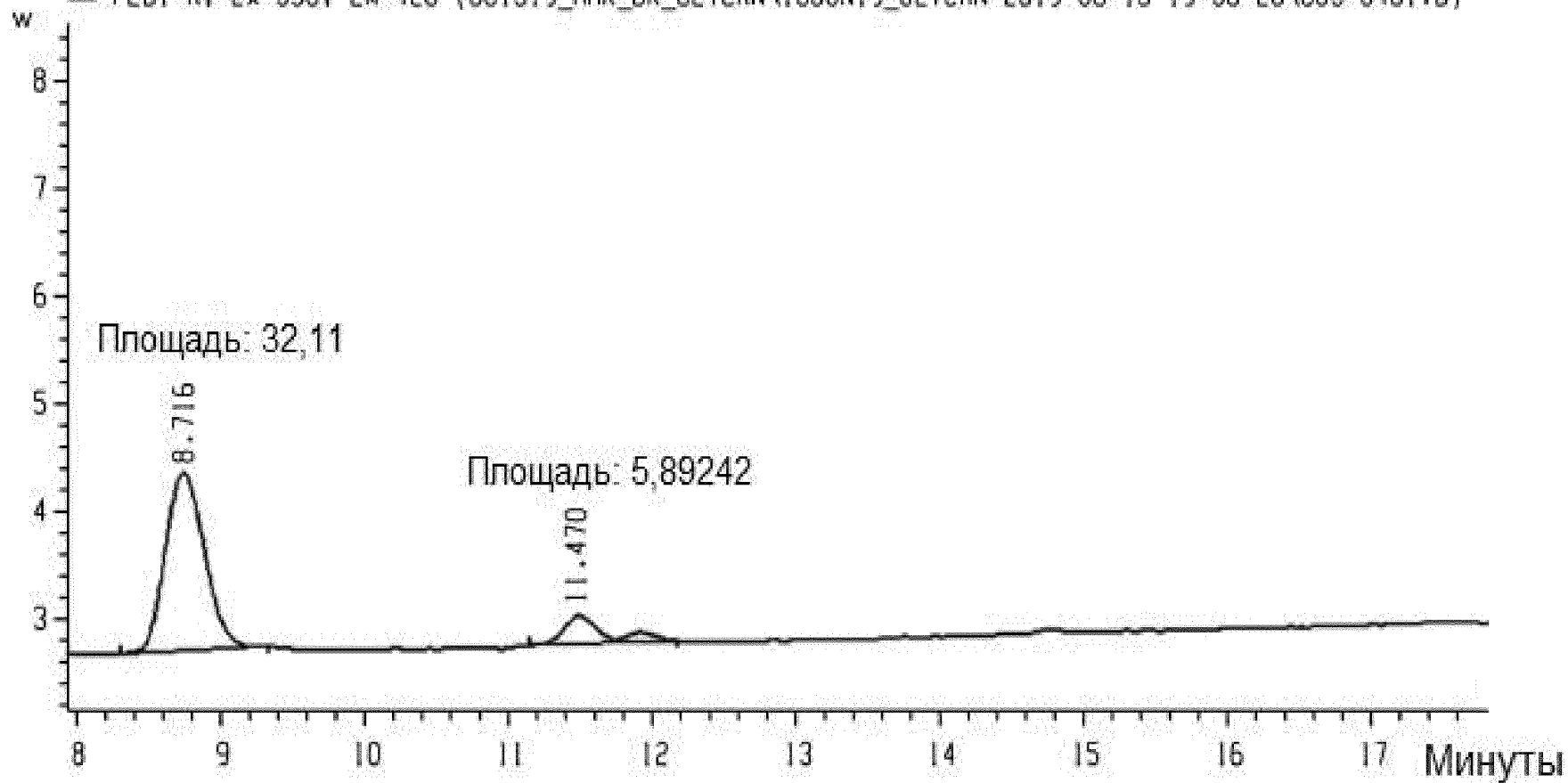


Фиг. 7

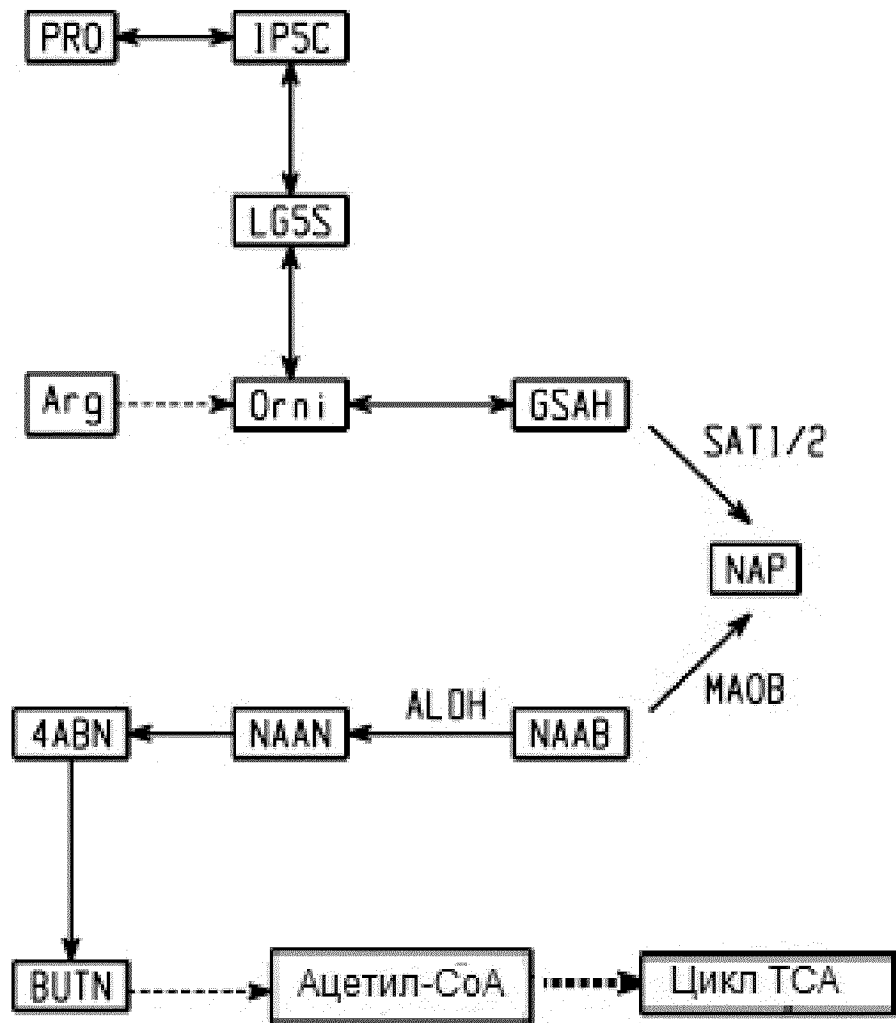


Фиг. 8

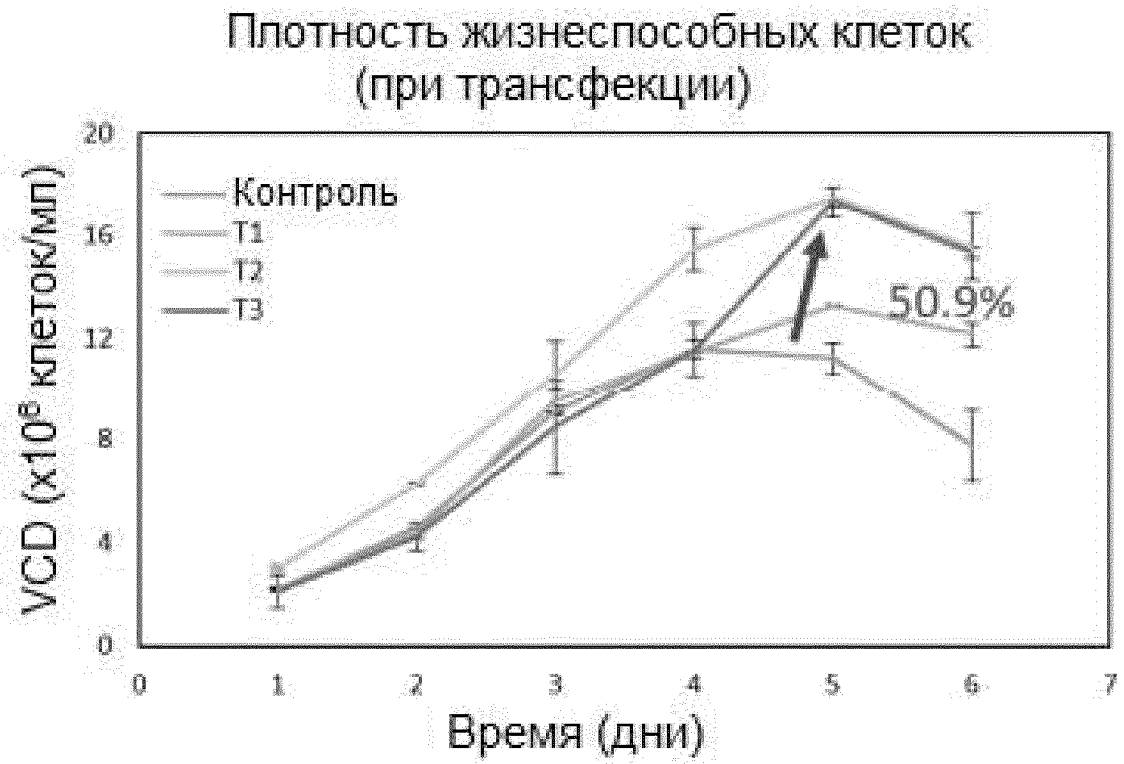
FLDI A, Ex=350, Em=420 (061319_MHK_BK_GLYCAN\13JUN19_GLYCAN 2019-06-13 19-36-20\083-0401.D)



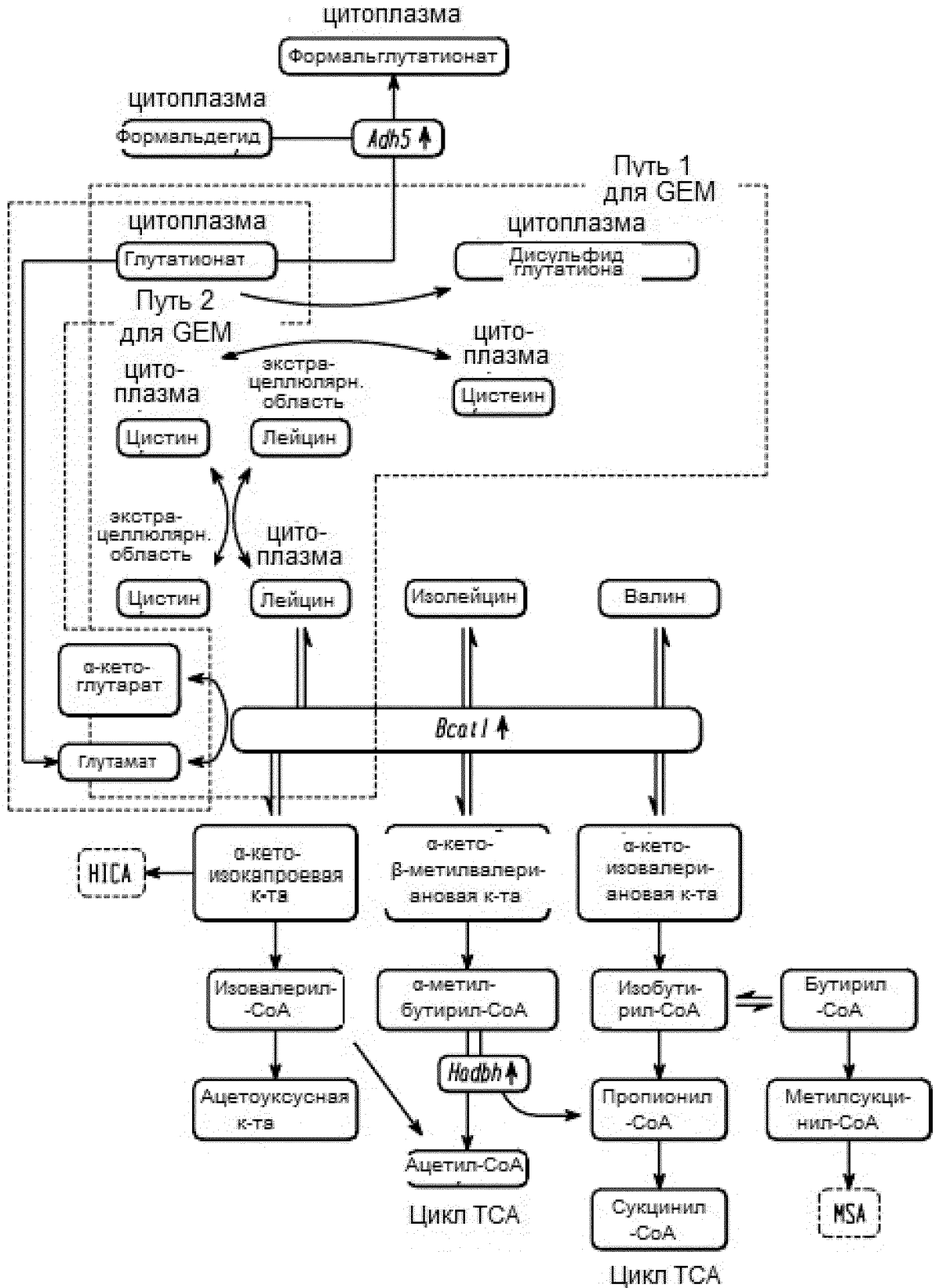
Фиг. 9



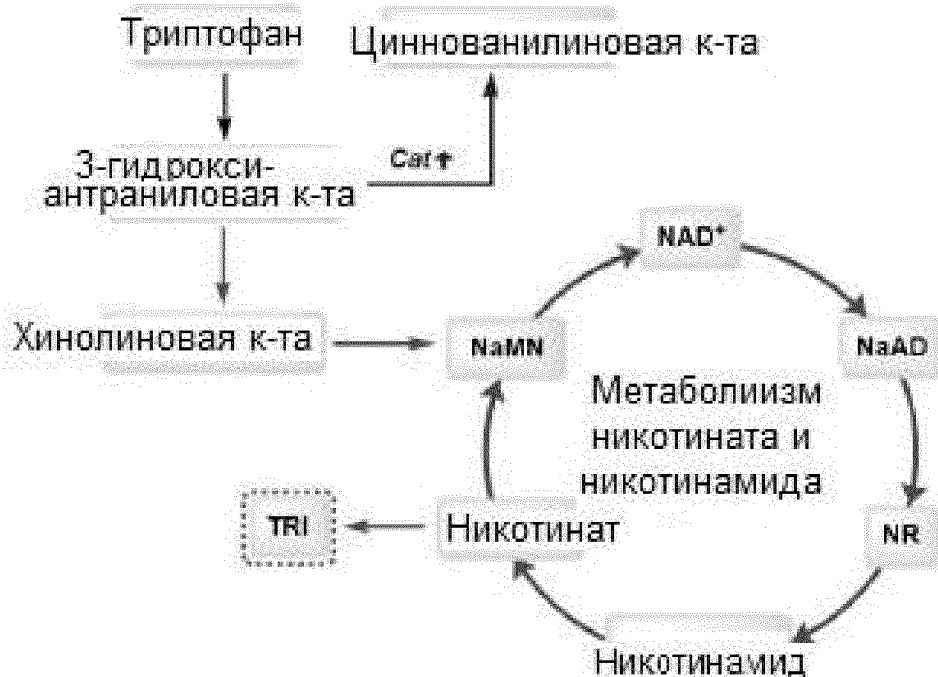
ФИГ. 10



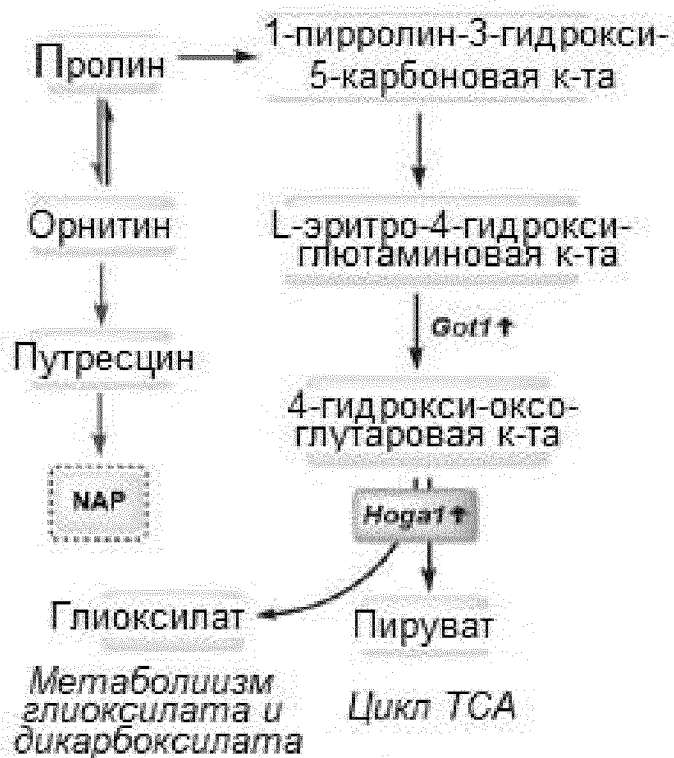
Фиг. 11



ФИГ. 12

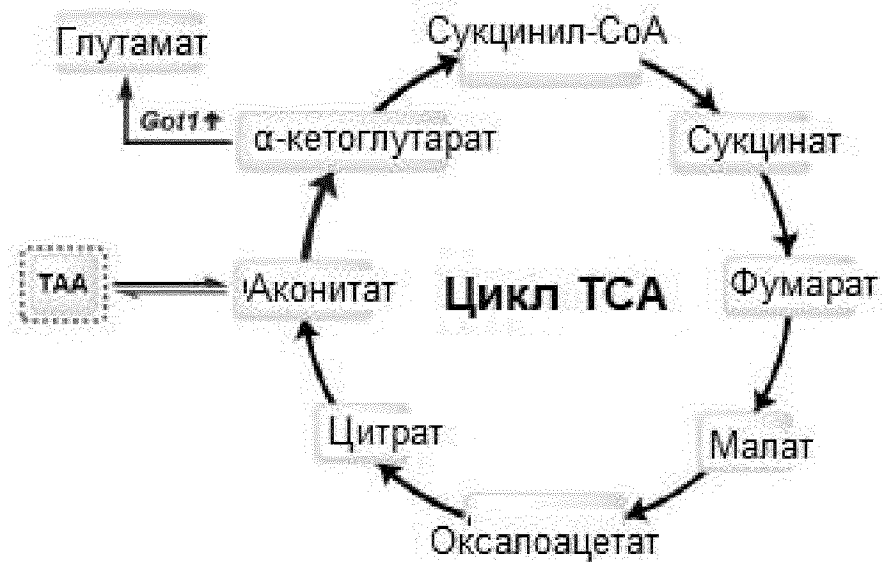


Фиг. 13А



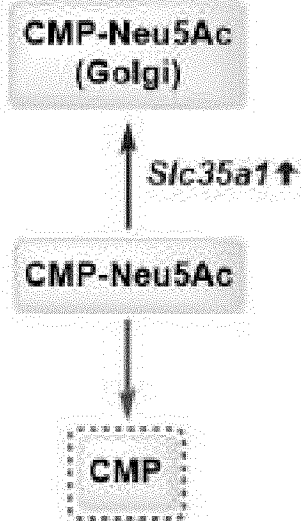
Фиг. 13В

Метаболизм
цистеина, фенилаланина и тирозина
Биосинтез аспартама

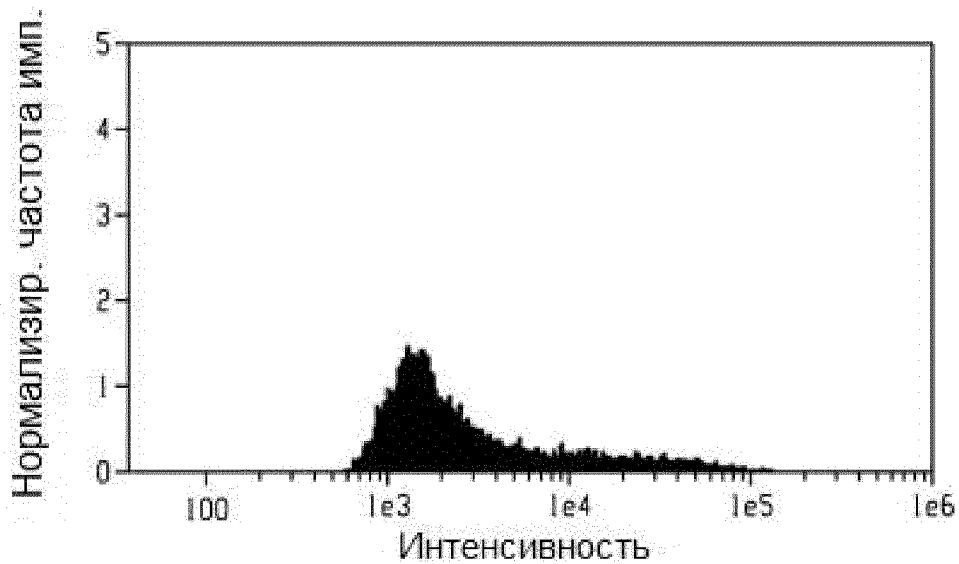


ФИГ. 13С

Биосинтез N-гликана

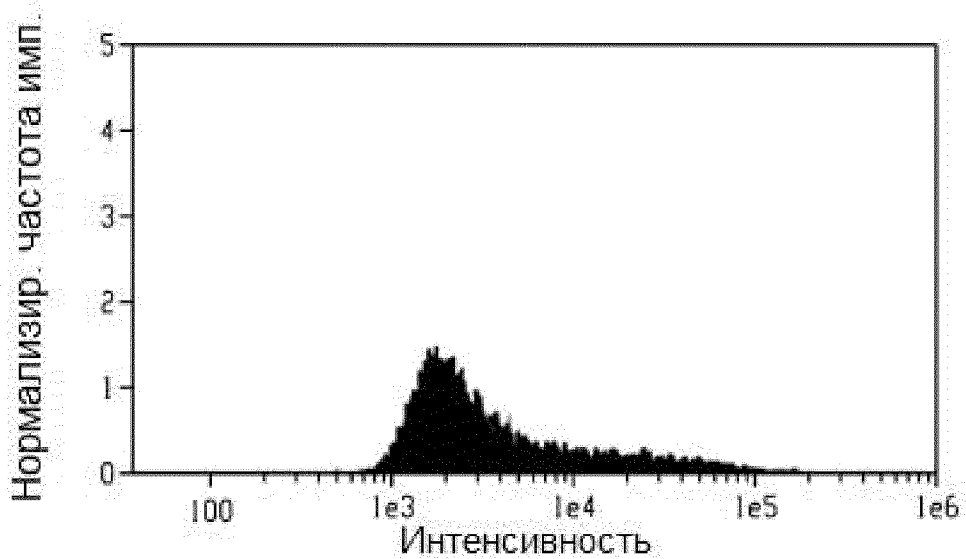


ФИГ. 13D



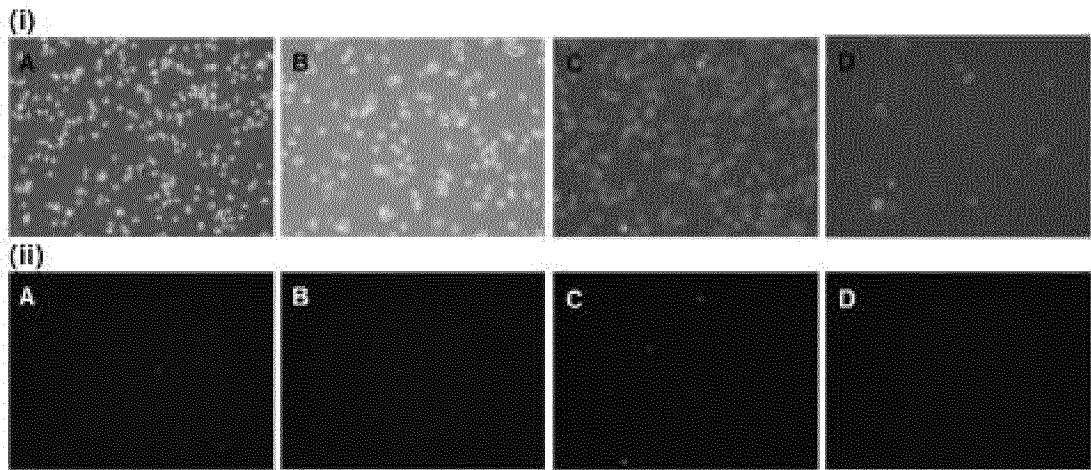
Анализ. группа	Кол-во	% строб.	Средн.	Медиана	Ст. отклон.
Одиноч. С1 & фокус	9878	100	7995.7	1990.29	16176.62
M1 & одиноч. С1 & фокус	3479	35.2	19775.75	9965.53	22984.39

Фиг. 14А

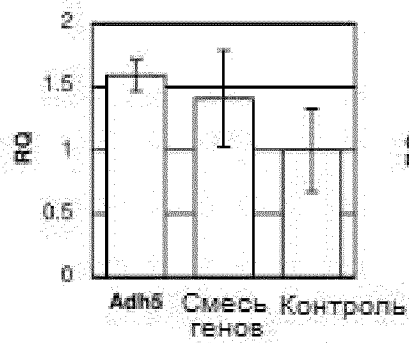


Анализ. группа	Кол-во	% строб.	Средн.	Медиана	Ст. отклон.
Одиноч. С1 & фокус	11547	100	8601.08	2580.19	16621.93
M1 & одиноч. С1 & фокус	4973	43.1	17518.82	8171.76	22394.07

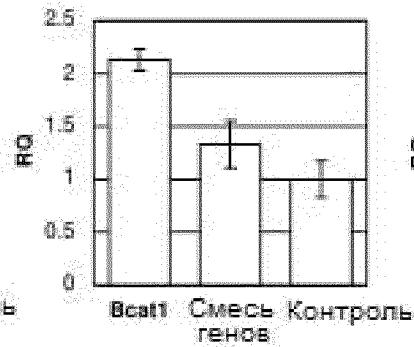
Фиг. 14В



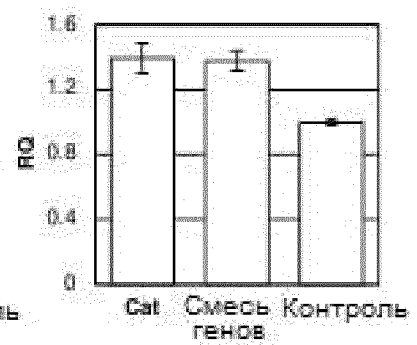
ФИГ. 15



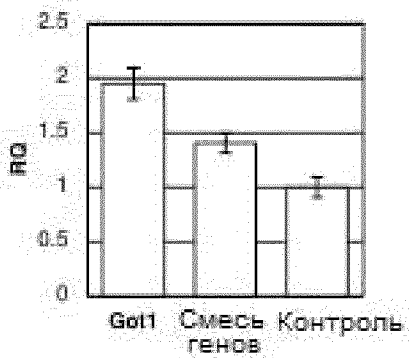
ФИГ. 16А



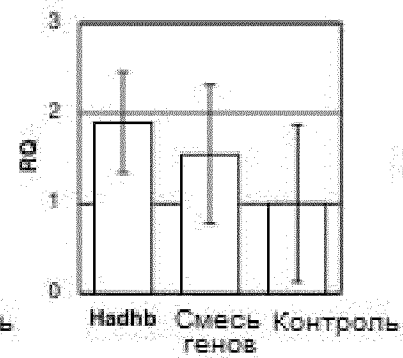
ФИГ. 16В



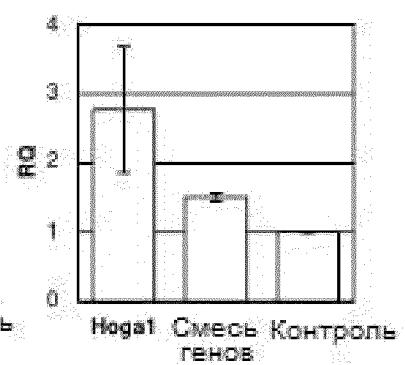
ФИГ. 16С



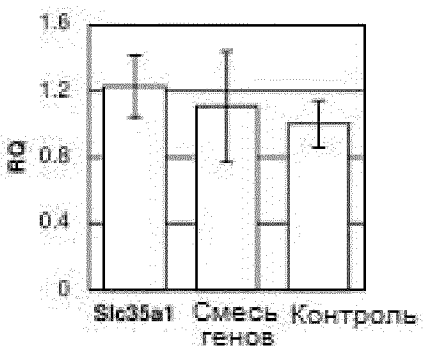
ФИГ. 16D



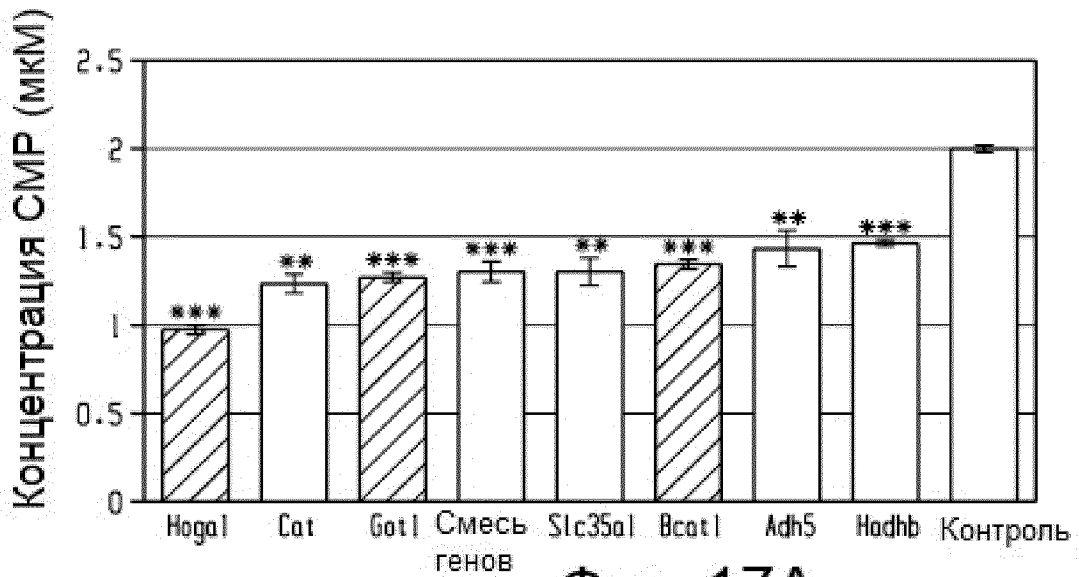
ФИГ. 16Е



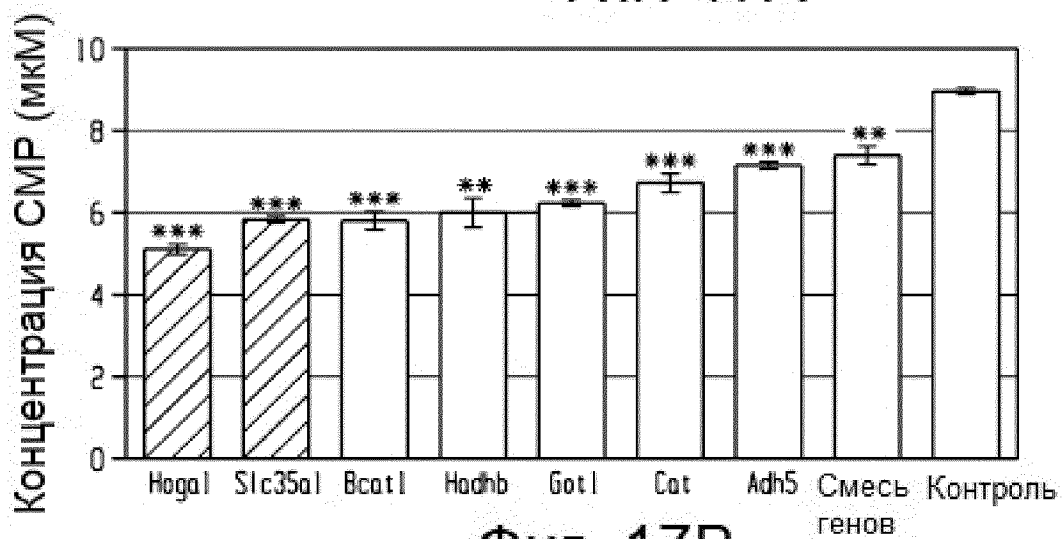
ФИГ. 16F



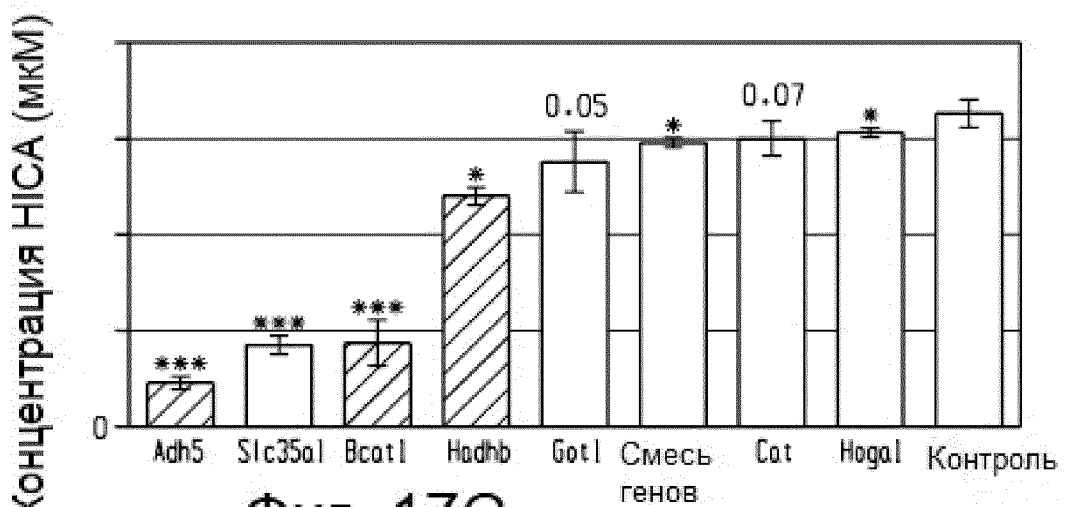
ФИГ. 16G



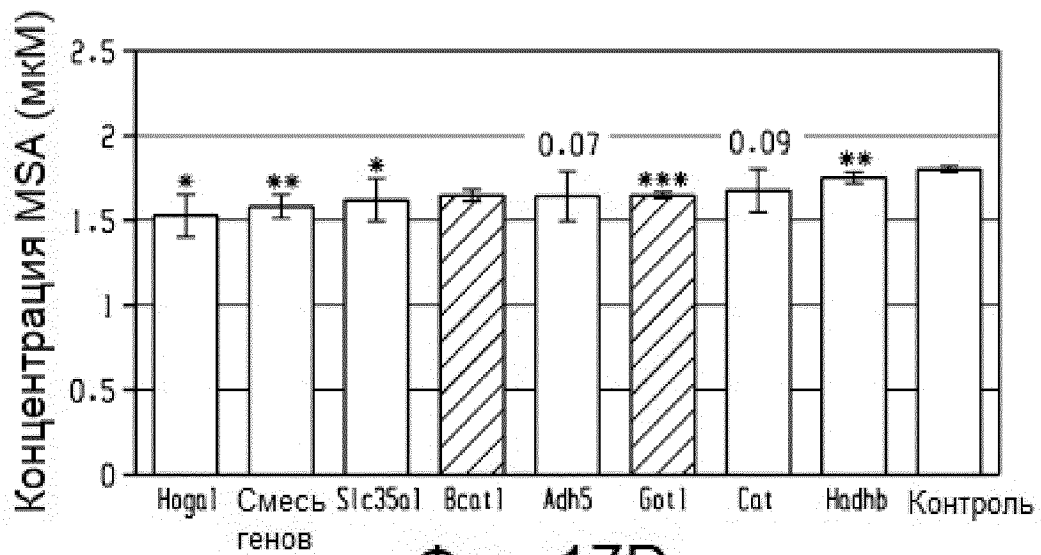
Фиг. 17А



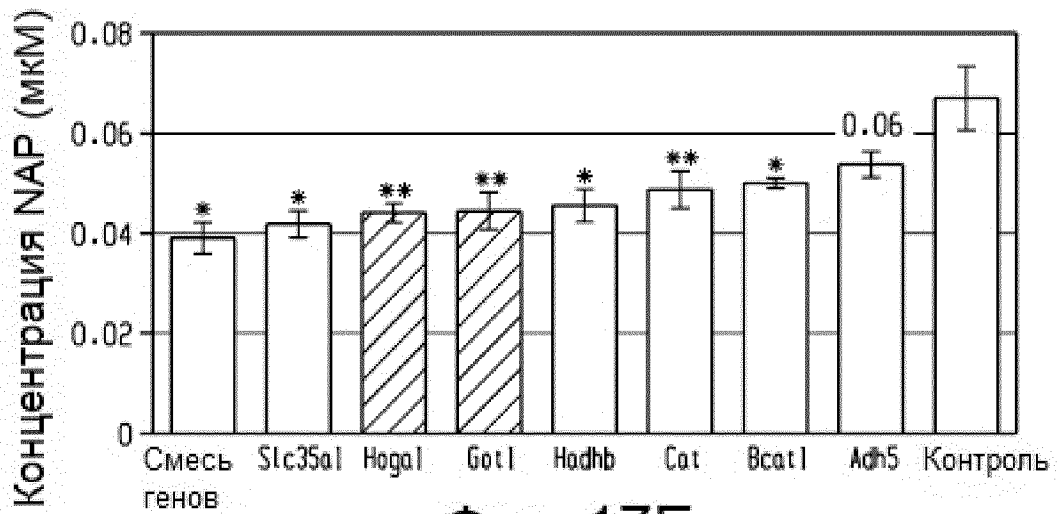
Фиг. 17В



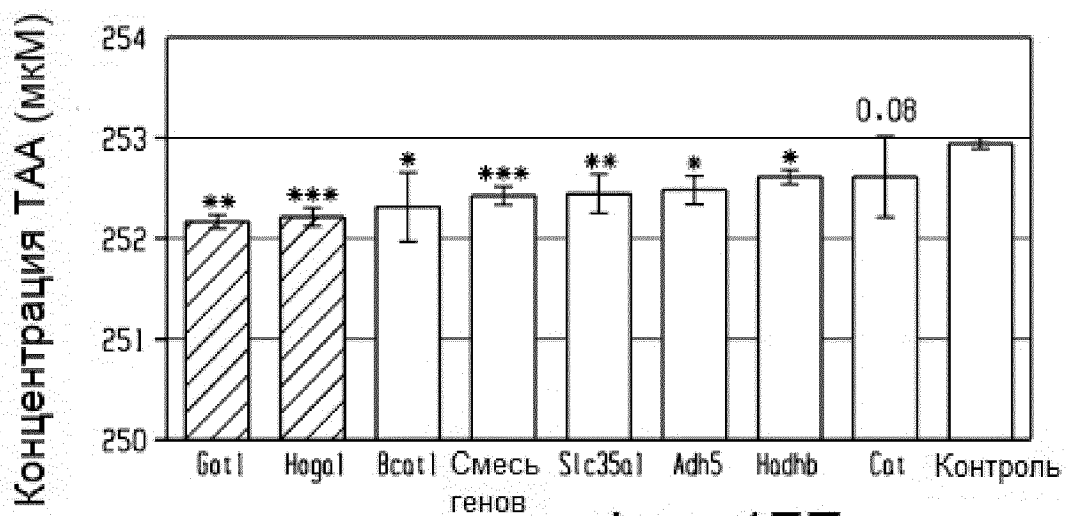
Фиг. 17С



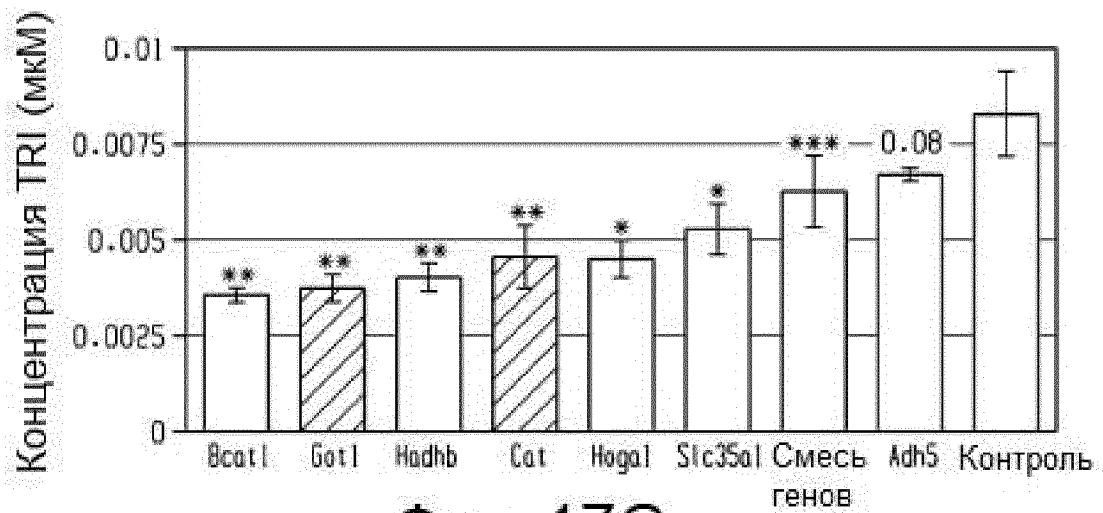
Фиг. 17D



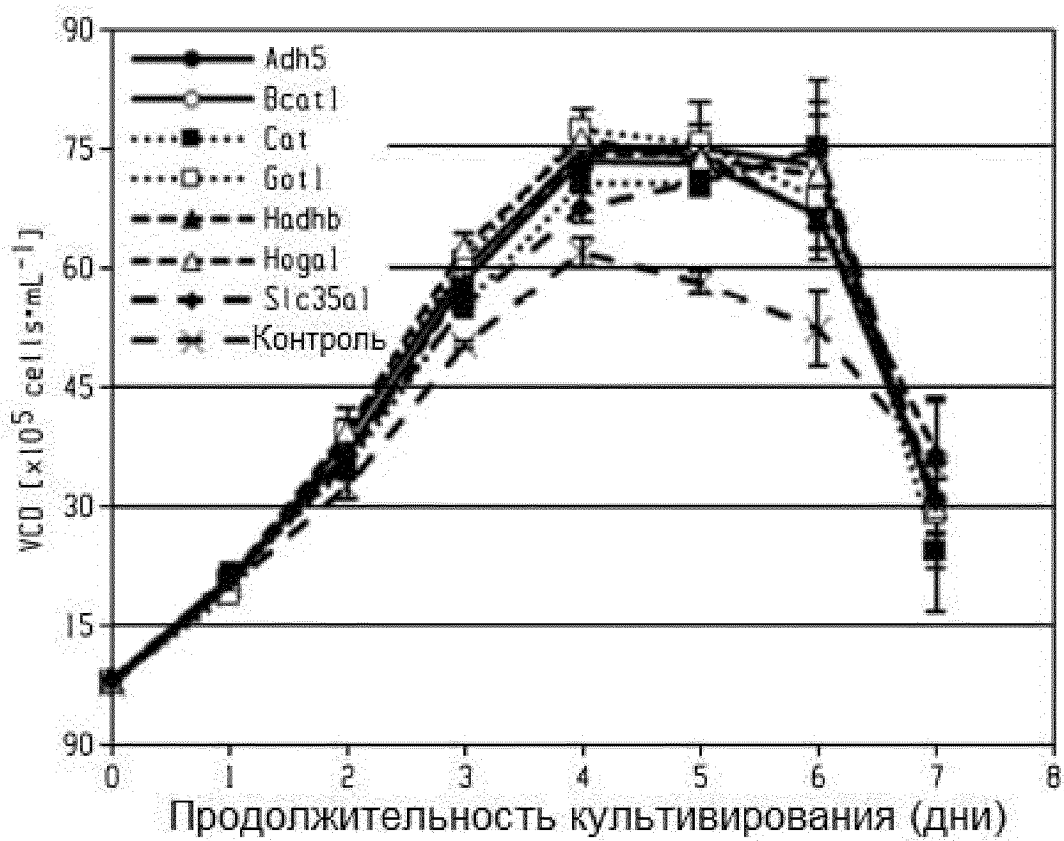
Фиг. 17E



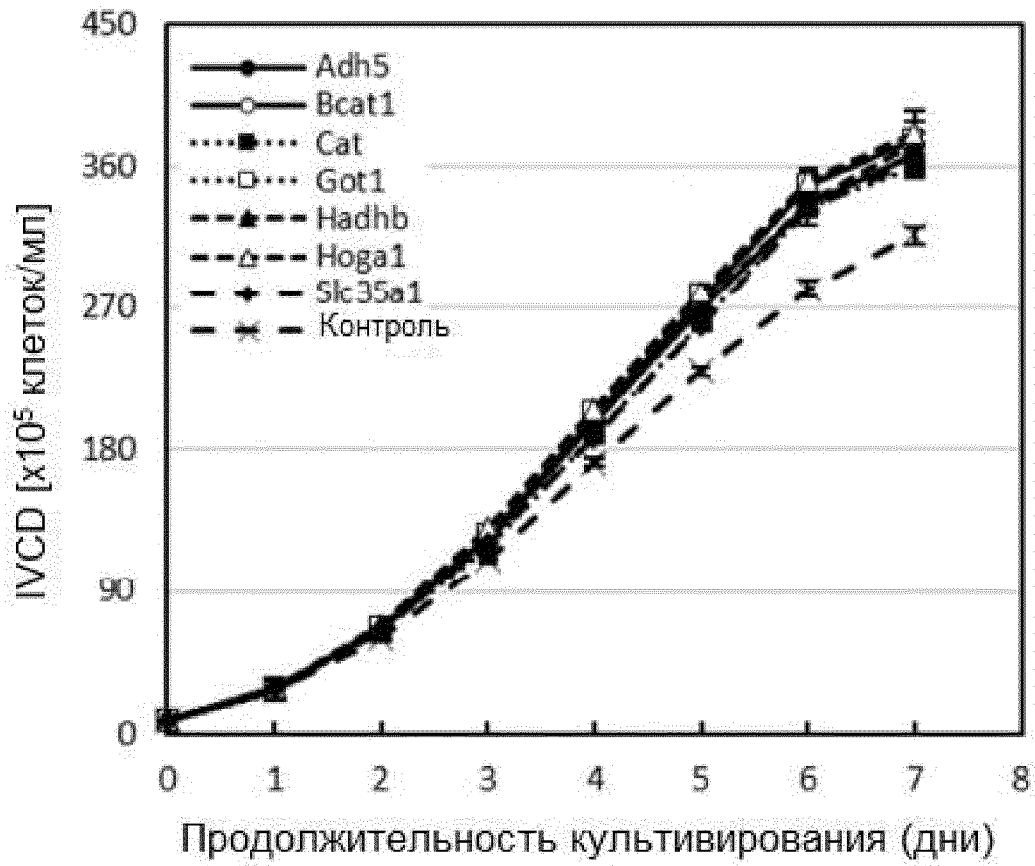
Фиг. 17F



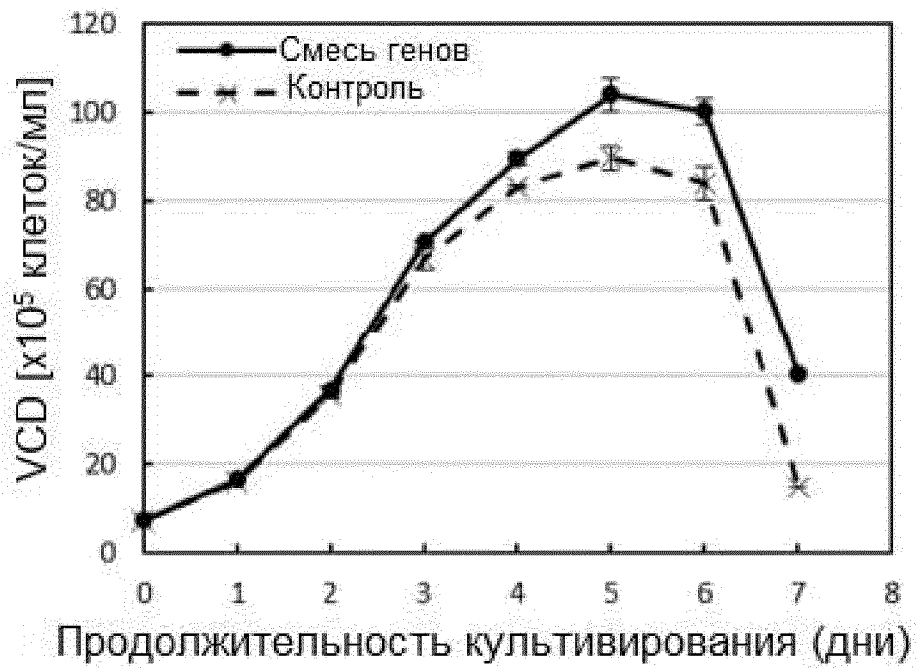
Фиг. 17G



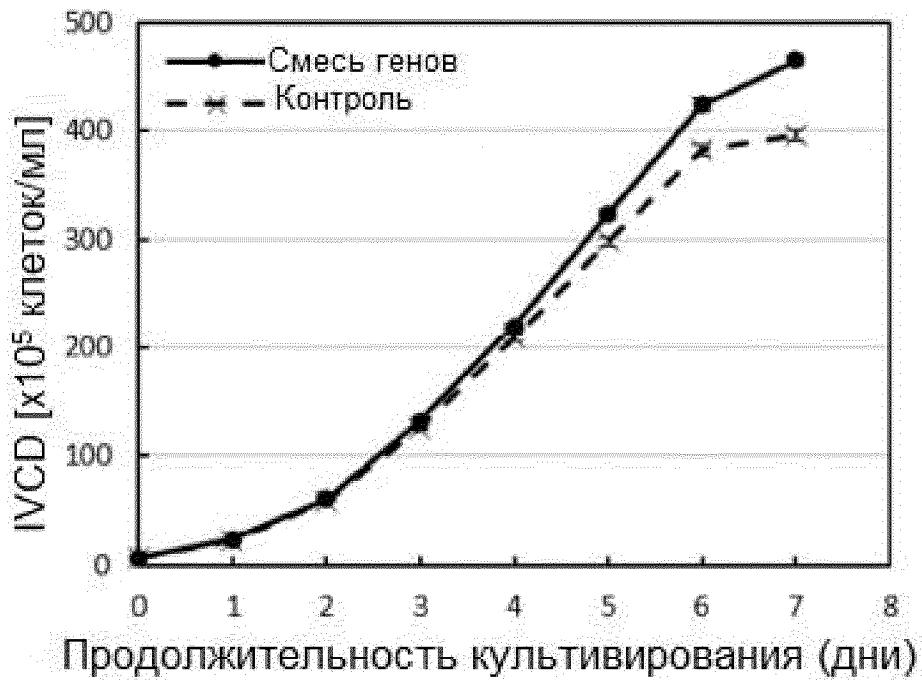
Фиг. 18А



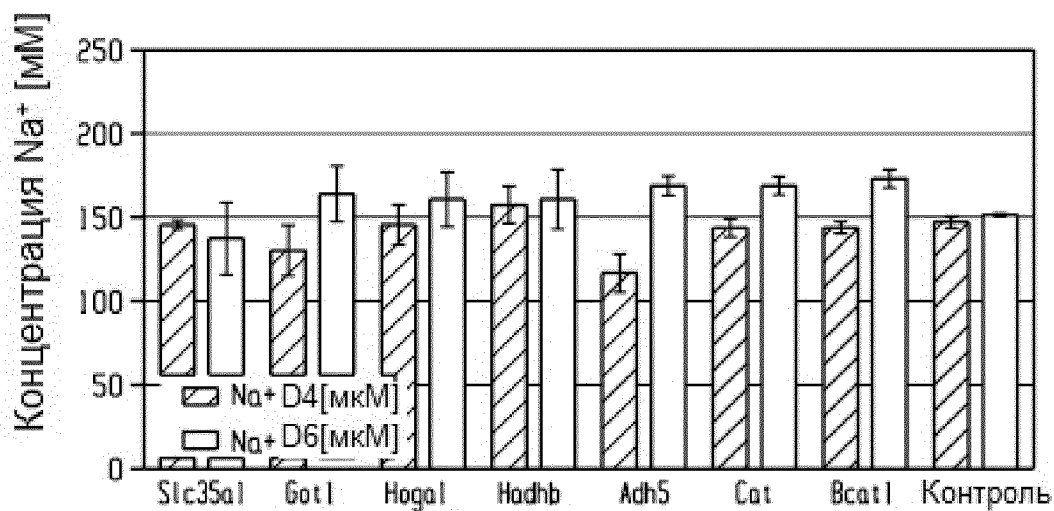
Фиг. 18В



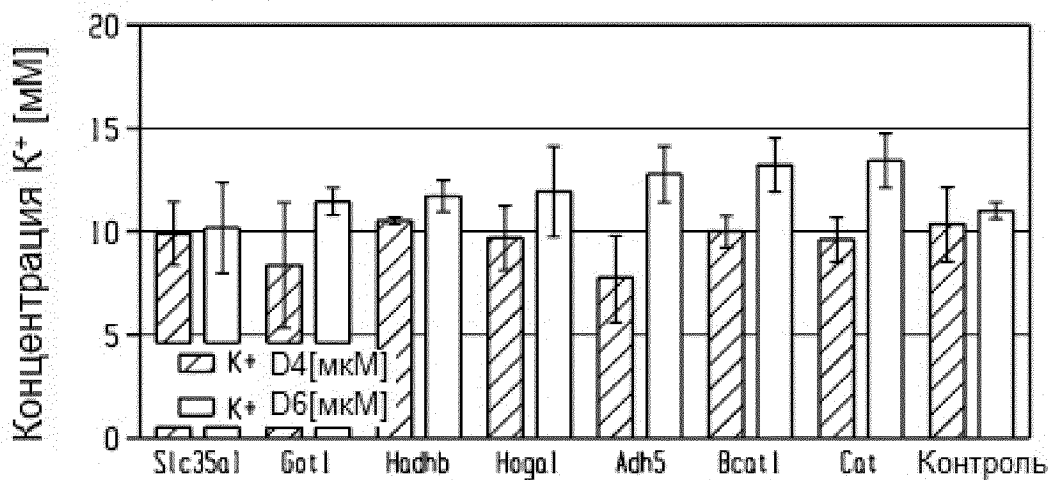
Фиг. 19А



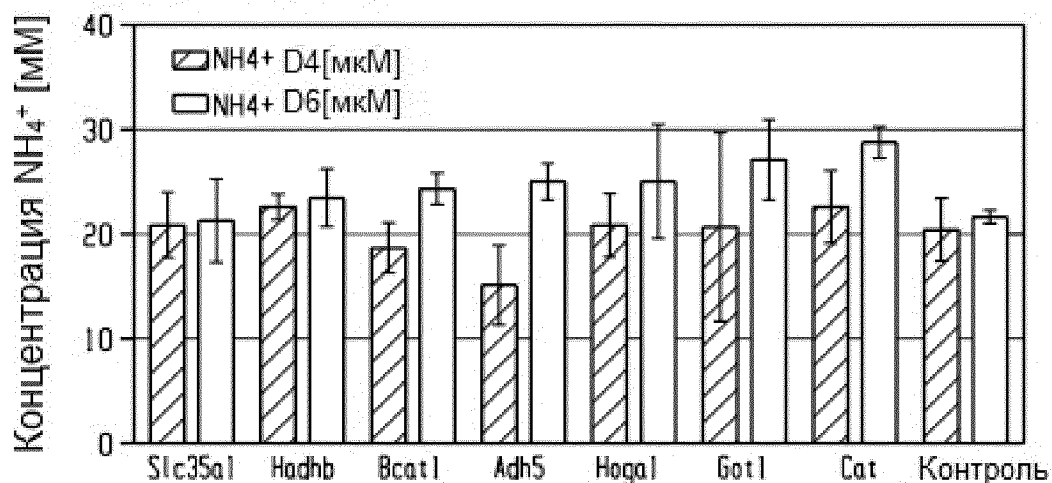
Фиг. 19В



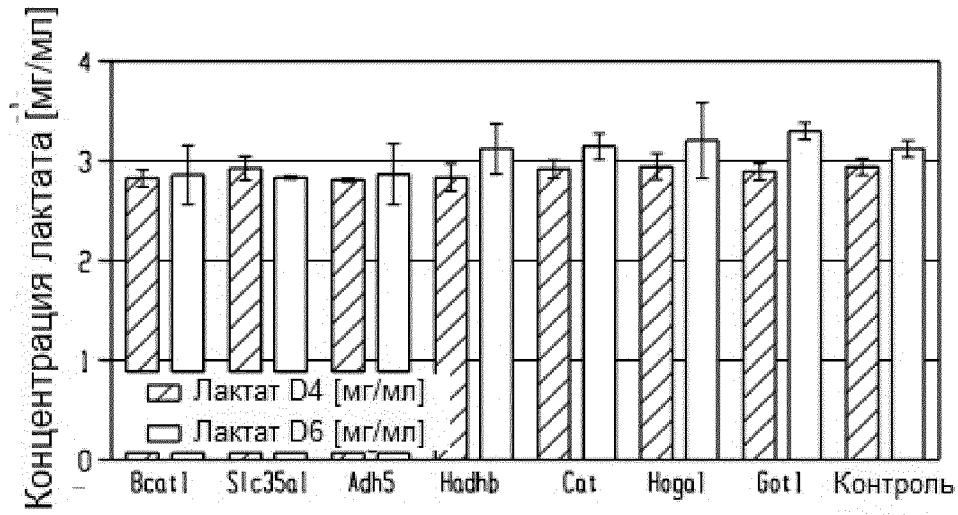
Фиг. 20А



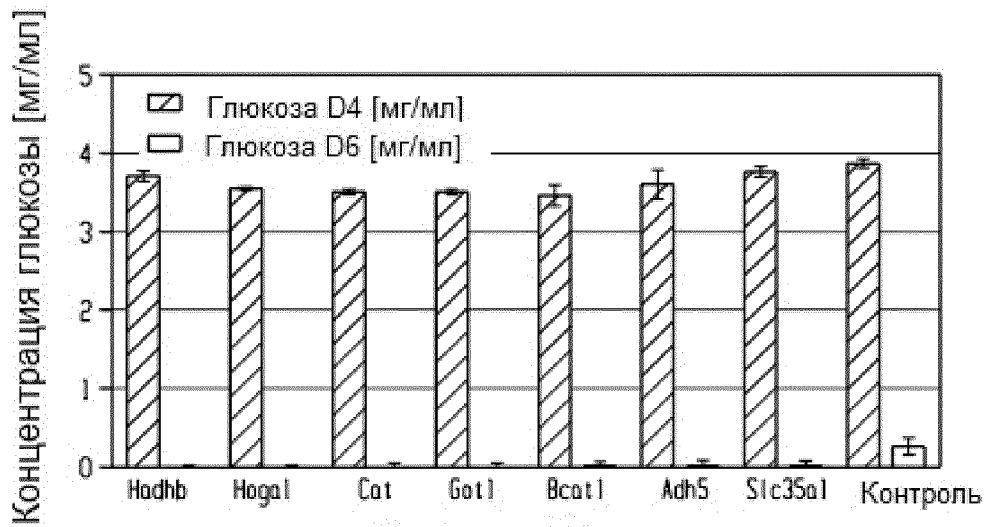
Фиг. 20В



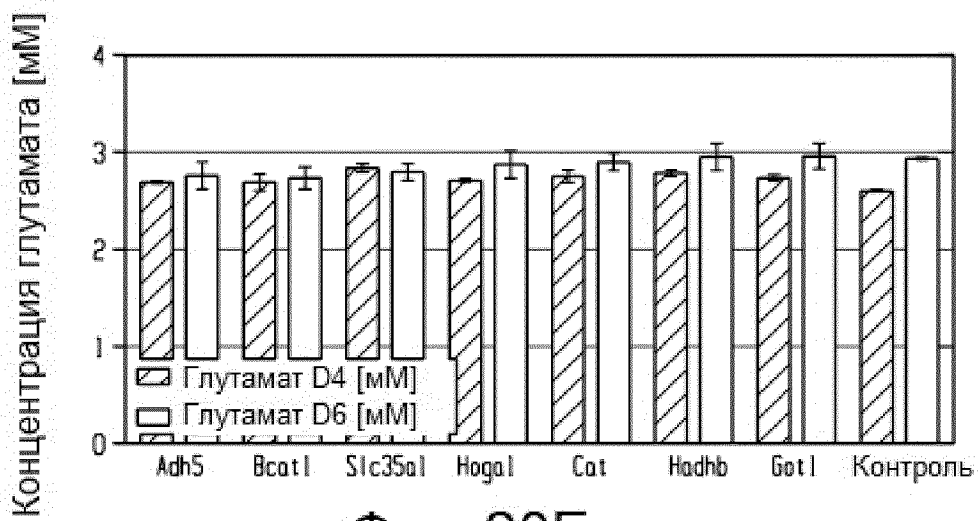
Фиг. 20С



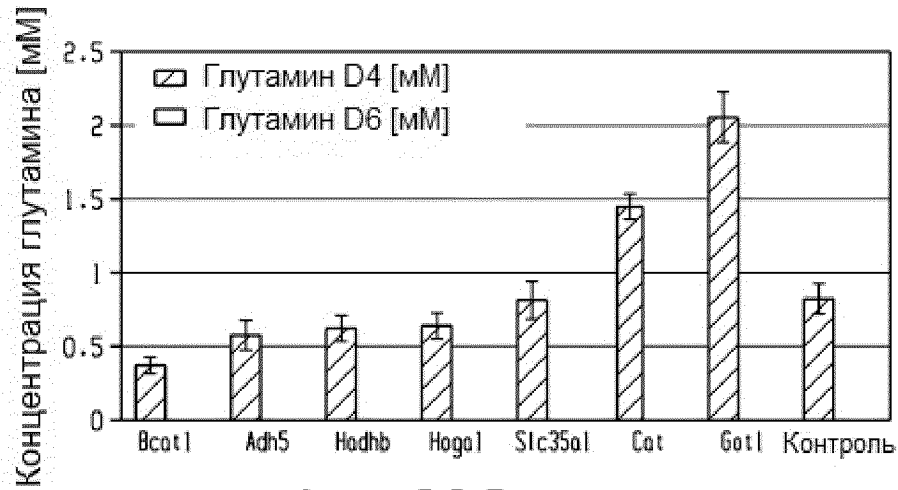
Фиг. 20D



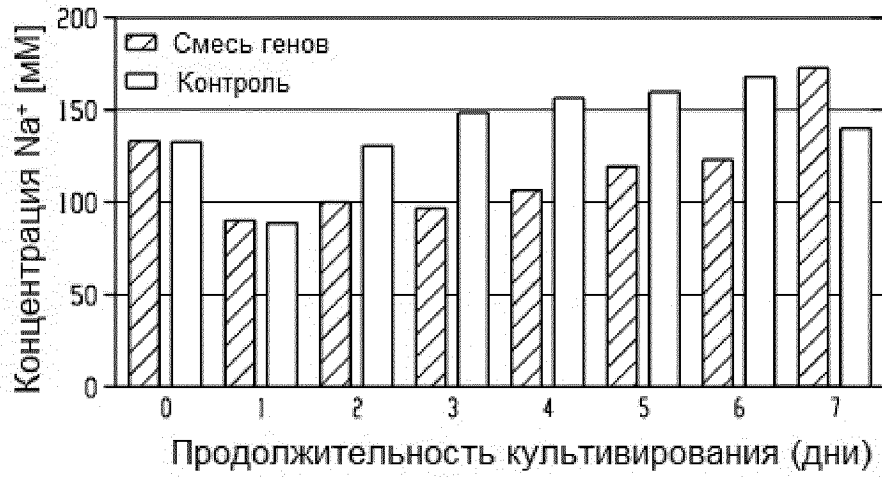
Фиг. 20E



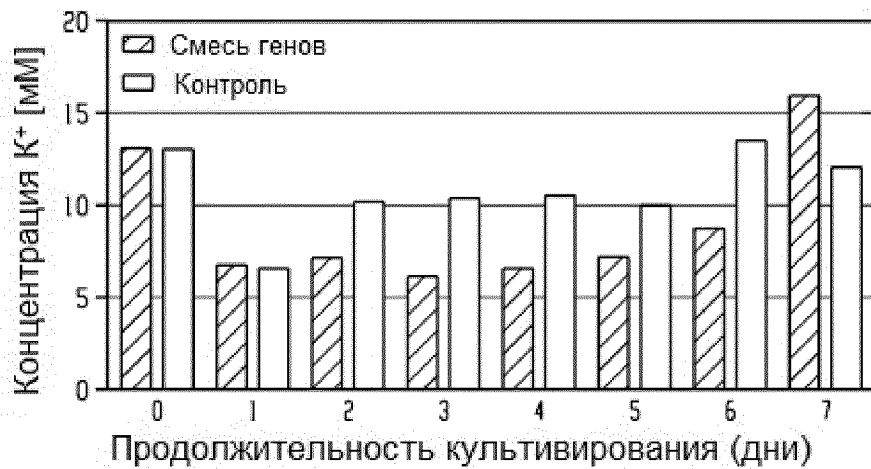
Фиг. 20F



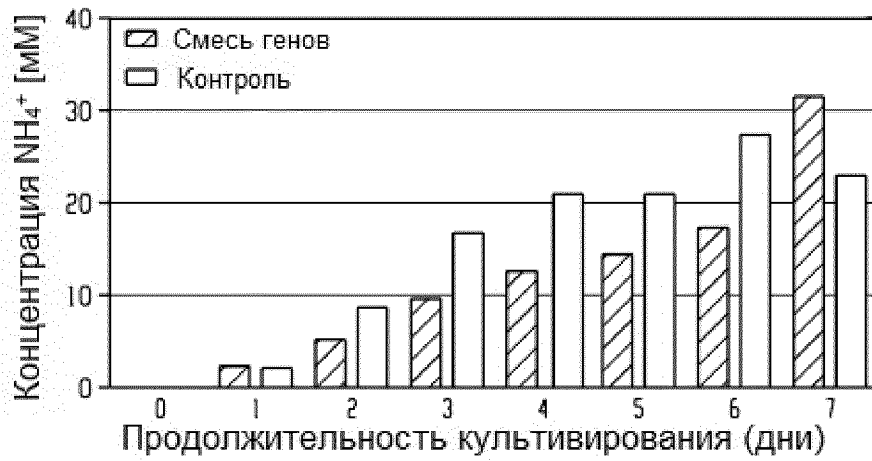
Фиг. 20G



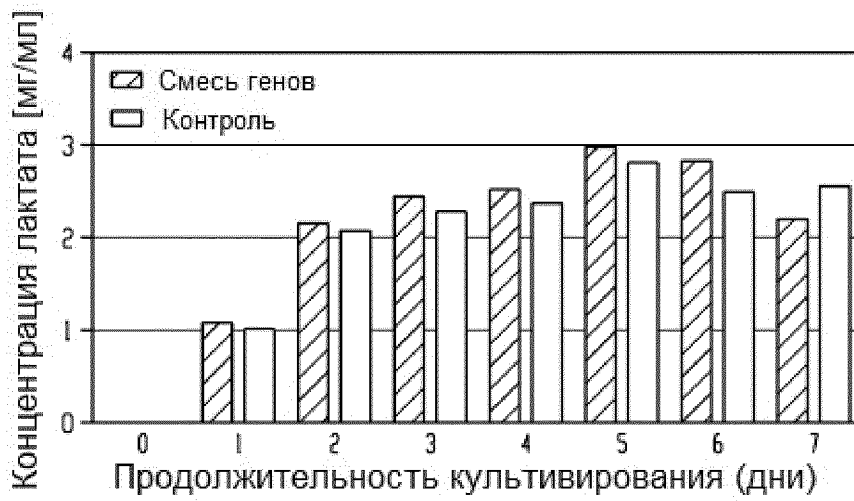
Фиг. 21А



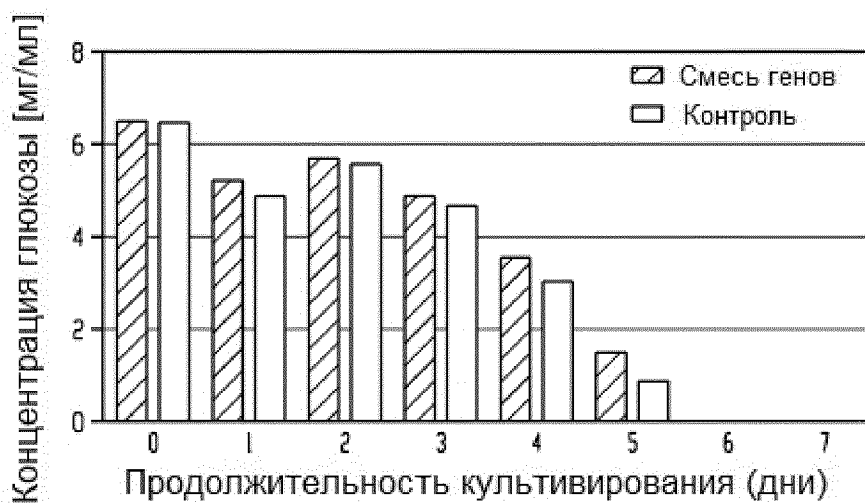
Фиг. 21В



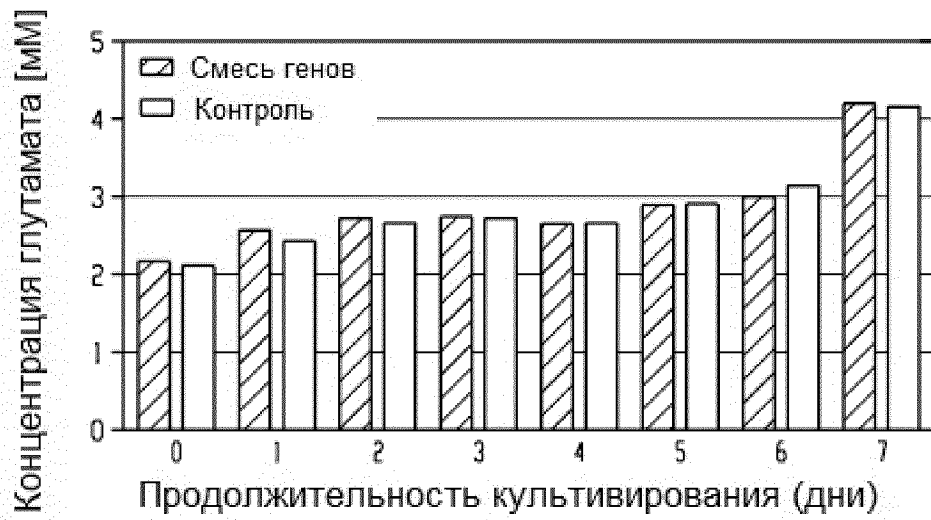
Фиг. 21С



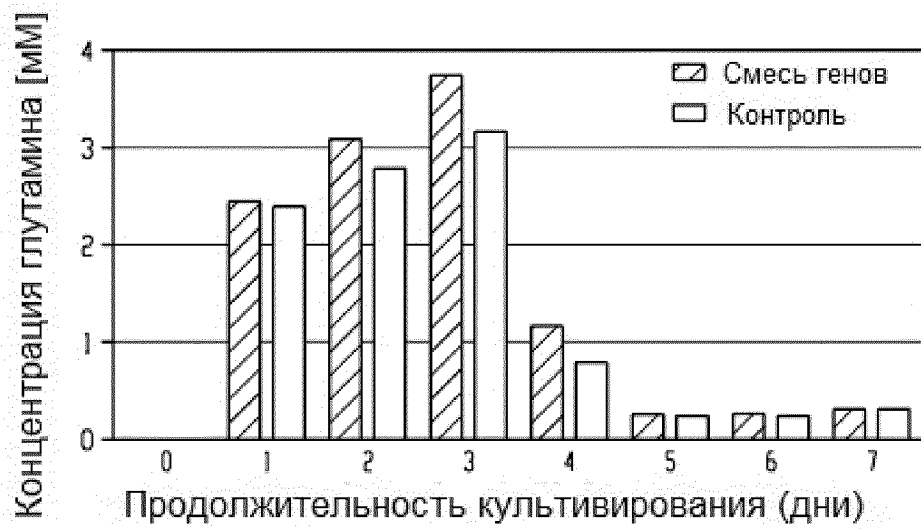
Фиг. 21D



Фиг. 21Е



Фиг. 21F



Фиг. 21G