

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033783**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.25

(51) Int. Cl. **C12N 5/02 (2006.01)**
C12N 5/16 (2006.01)

(21) Номер заявки
201690600

(22) Дата подачи заявки
2014.10.10

(54) МЕТАБОЛИЧЕСКИ ОПТИМИЗИРОВАННАЯ КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА

(31) **61/889,815**

(32) **2013.10.11**

(33) **US**

(43) **2016.09.30**

(86) **PCT/US2014/059993**

(87) **WO 2015/054554 2015.04.16**

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

(72) Изобретатель:
**Лоуренс Шон, Ким Энн, Джонсон Эми
(US)**

(74) Представитель:
**Карпенко О.Ю., Лыу Т.Н., Угрюмов
В.М., Дементьев В.Н., Глухарёва
А.О., Клюкин В.А., Строкова О.В.,
Христофоров А.А. (RU)**

(56) LE H. et al.: "Multivariate analysis of cell culture bioprocess data - lactate consumption as process indicator", Journal of Biotechnology, 2012, vol. 162, pages 210-223, abstract; page 211, paragraphs 3 and 4; page 214, paragraph 4; page 218, paragraph 6 to page 221, paragraph 2; page 222, paragraphs 3-5; figure 2D and 9
US-B2-8470552

SHEIKHOLESLAMI Z. et al.: "The impact of the timing of induction on the metabolism and productivity of CHO cells in culture", Biochemical Engineering Journal, 2013, vol. 79, pages 162-171; published online on 08 August 2013, abstract; figure 1, page 168, paragraph 3, page 169, paragraph 4

MA N. et al.: "A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: improved productivity and lactate metabolism", Biotechnology Progress, 2009, vol. 25, No. 5, pages 1353-1363, abstract; page 1356, paragraph 5 to page 358, paragraph 2; figures 2-4

(57) Предусмотрен улучшенный способ крупномасштабного получения белков и/или полипептидов в клеточной культуре. Согласно изобретению способ предусматривает культивирование клеток, в которых произошел метаболический сдвиг. Применение такого способа или системы обеспечивает высокие уровни производства белка или полипептида и снижает накопление такого нежелательного отхода метаболизма, как лактат. Белки и полипептиды, экспрессированные согласно настоящему изобретению, могут успешно применяться в получении фармацевтических, иммуногенных или других коммерческих биологических композиций, таких как антитела.

B1**033783****033783****B1**

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 USC § 119(e) в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 61/889815, поданной 11 октября 2013 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к клеткам, которые характеризуются метаболическим сдвигом на потребление лактата в клеточной культуре. Переход на метаболический профиль потребления лактата в культуре в системе посевных ферментеров характеризуется благоприятными эффектами на производственную культуру. При инокуляции производственного реактора клетки проявляют более эффективный метаболизм лактата с низкой скоростью производства лактата, низкими максимальными содержаниями лактата, ранним переходом на потребление лактата и, следовательно, повышенной продуктивностью в периодической культуре клеток млекопитающего с подпиткой. Таким образом, предусмотрен улучшенный способ крупномасштабного производства белков и/или полипептидов в клеточной культуре.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Биологические средства, в частности белки и полипептиды, все чаще разрабатываются в качестве новых фармацевтических продуктов. Сконструированные клетки, которые производят нетипично высокие содержания конкретного представляющего интерес белка, становятся критически важными для успешного коммерческого производства указанных фармацевтических средств. Контроль и оптимизация условий культивирования клеток подвергаются изменениям и оказывают значительное влияние на содержание и качество произведенного в культуре терапевтического белка.

Общепринятым является производство белков посредством клеточной культуры в способе периодических культур или периодических культур с подпиткой. Ранние стадии роста инокулята после оттаивания флакона включают в себя культивирование клеток в затравочной культуре. Как правило, клетки выращивают при экспоненциальной скорости роста, такой как в биореакторах с системой посевных ферментеров, для обеспечения непрерывного увеличения размера и/или объема клеточной популяции.

После пропорционального увеличения клеточной массы в результате прохождения через несколько стадий в биореакторе клетки переносят в производственный биореактор, пока клетки все еще находятся в фазе экспоненциального роста (фаза логарифмического роста) (Gambhir A. et al., 2003, J Bioscience Bioeng 95(4): 317-327). Как правило, считается нежелательным позволять клеткам в периодической культуре, например затравочной культуре, переходить в стационарную фазу, минуя фазу логарифмического роста. Согласно рекомендациям культуры необходимо пересевать, пока они находятся в фазе логарифмического роста, до того, как клетки, например прилипающие клетки, достигают конfluence вследствие контактного торможения, или накопление отходов ингибирует рост клеток, среди прочих причин (Cell Culture Basics, Gibco/Invitrogen Online Handbook, www.invitrogen.com; ATCC® Animal Cell Culture Guide, www.atcc.org).

После переноса в периодическую культуру с подпиткой клетки культивируют в течение определенного периода времени, при этом осуществляют мониторинг и контроль за составом среды для обеспечения возможности производства представляющего интерес белка или полипептида. После достижения определенного выхода продукта или уровня жизнеспособности клеток накопление отходов или истощение питательных веществ является определяющим для решения о прекращении культивирования, и осуществляют выделение произведенного белка или полипептида. За последнее десятилетие были осуществлены многочисленные значительные достижения, направленные на улучшение выхода рекомбинантного белка, который в настоящее время достигает титров порядка граммов на литр. Достижения в способах производства белка, а также в конструировании клеточных линий и разработке сред для клеточных культур и систем подпитки вносят свой вклад в увеличении выхода белка.

Производство с использованием периодической культуры с подпиткой предусматривает добавление небольших объемов подпитки для восполнения питательных веществ, находящихся в биореакторе, по мере роста клеток и производства продукта. Следует понимать, что клетки млекопитающего, как правило, характеризуются тенденцией осуществлять непрерывный метаболизм углеводов, что приводит к накоплению лактата, таким образом, требуя добавления основания для нейтрализации молочной кислоты. Добавление основания повышает осмолярность в клеточной среде, что в свою очередь сильно ограничивает общую достижимую жизнеспособность и/или продуктивность клеток в биореакторе. Накопление лактата в среде негативно влияет на рост клеток и является одним из распространенных факторов, ограничивающих максимальную продуктивность, которая может быть достигнута в периодической культуре. В типичной периодической клеточной культуре рост и продуктивность ингибируются после того, как концентрация лактата в культуре достигает приблизительно 30-50 mM, и/или концентрация аммиака достигает 3-5 mM (Ozturk S.S., Riley M.R. and Palsso B.O. 1992. Biotechnol. and Bioeng. 39: 418-431). В настоящее время широко применяемые схемы предусматривают восполнение питательных веществ и разработку бессывороточных сред с установленным химическим составом для поддержки непрерывного клеточного роста и оптимальной секреции продукта.

Попытки, относящиеся, в частности, к снижению выхода отходов метаболизма, таких как накопление лактата, в клеточной культуре, улучшили общее количество конечных титров белка. Указанные по-

пытки сфокусированы на способах с применением периодической культуры с подпиткой с контролируемым содержанием глюкозы или ограниченным содержанием питательных веществ (см., например, WO 2004104186; US8192951B2), улучшенных условиях среды для культивирования клеток (например, US7390660; Zagari, et al., 2013, *New Biotechnol.* 30(2):238-45) или клеточной инженерии, включая в себя направление ферментов в гликолитический путь (например, Kim S.H. and Lee G.M., 2007, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 152-159; Kim S.H. and Lee G.M., 2007, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 659-665; Wlaschin K.F. and Hu, W-S., 2007, *J. Biotechnol.* 131,168-176).

Контролируемая подпитка клеток используется в попытке достичь более эффективного метаболического фенотипа (Europa, A. F. et al., 2000, *Biotechnol. Bioeng.* 67:25-34; Cruz et al. 1999, *Biotechnol Bioeng.* 66(2):104-113; Zhou et al., 1997, *Cytotechnology* 24, 99-108; Xie and Wang, 1994, *Biotechnol Bioeng.* 43: 1174-89). Тем не менее, это осложняется тем фактом, что недостаточность питательных веществ, а также быстрые изменения, например, концентрации аммиака, наблюдаемые в периодической культуре с подпиткой с высокой плотностью клеток, могут индуцировать апоптоз ("программируемую клеточную смерть") (Newland et al., 1994, *Biotechnol. Bioeng.* 43(5):434-8). Следовательно, общепринятый подход к оптимизации состоит в том, чтобы выращивать клетки до умеренно высокой плотности в периодической культуре с подпиткой и затем преднамеренно индуцировать пролонгированную, продуктивную стационарную фазу, например, путем изменения температуры или pH (Quek et al., 2010, *Metab Eng* 12(2): 161-71. doi: 10.1016/j.ymben. 2009.09.002. Epub 2009 Oct 13).

Обсуждаемые выше техники оптимизации были сфокусированы на периодической культуре с подпиткой клеточная, и этот зависимый от питательных веществ способ необходимо адаптировать для каждой клетки-хозяина, сконструированной для производства представляющего интерес полипептида. Способы адаптации клеток к потребителям лактата в культуре крайне необходимы в процессе производства биологических терапевтических средств. Оптимизация клеточной линии с метаболическим фенотипом, характеризующимся потреблением лактата, оказалась бы полезной для коммерческого производства полипептидов.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Согласно настоящему изобретению предусмотрены клетки и способы культивирования клеток, в которых произошел метаболический сдвиг на потребление лактата. Метаболически адаптированные клетки являются оптимальными для крупномасштабного производства белка.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ культивирования клеток, предусматривающий перенос клеток из первой клеточной культуры во вторую клеточную культуру после того, как в первой культуре произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ культивирования клеток, предусматривающий культивирование клеток в первой клеточной культуре, определение того, что метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках произошел в первой клеточной культуре, и перенос клеток во вторую клеточную культуру после того, как произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках, причем концентрация лактата во второй клеточной культуре показывает чистое потребление лактата во время культивирования второй культуры. Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает уменьшение накопления лактата во второй клеточной культуре по сравнению с указанным параметром, определенным в идентичной в других отношениях клеточной культуре при идентичных в других отношениях условиях за исключением того, что перенос клеток во вторую клеточную культуру происходит до того, как в первой клеточной культуре произошел метаболический сдвиг.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ получения белка, предусматривающий перенос клеток из первой клеточной культуры во вторую клеточную культуру после того, как произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках, и поддержание второй клеточной культуры в течение некоторого периода времени так, чтобы белок накапливался в клеточной культуре. Согласно родственному аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ производства белка, предусматривающий культивирование клеток в первой клеточной культуре, определение того, что метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках произошел в первой клеточной культуре, перенос клеток во вторую клеточную культуру после того, как произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках, и поддержание второй клеточной культуры в течение некоторого периода времени так, чтобы белок накапливался в клеточной культуре. Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает увеличение продуктивности во второй клеточной культуре по сравнению с указанным параметром, определенным в идентичной в других отношениях клеточной культуре при идентичных в других отношениях условиях за исключением того, что перенос клеток во вторую клеточную культуру происходит до того, как в первой клеточной культуре произошел метаболический сдвиг.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предусмотрен улучшенный способ культивирования клеток, при котором клетки содержат ген, кодирующий представляющий интерес полипептид, предусматривающий следующие стадии: культивирование клеток в первой клеточной культуре, поддержание первой клеточной культуры при условиях, которые обеспечивают наращивание клеточной массы, перенос клеток во вторую клеточную культуру после того, как произошел метаболический сдвиг на по-

ребление лактата в клетках, поддержание второй клеточной культуры при условиях, которые обеспечивают экспрессию представляющего интерес полипептида, и сбор представляющего интерес полипептида из второй клеточной культуры. Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает определение того, что в первой клеточной культуре произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках.

Согласно четвертому аспекту настоящего изобретения предусмотрен улучшенный способ получения полипептида в клеточной культуре, предусматривающий следующие стадии: трансфекция клеток ДНК, кодирующей представляющий интерес полипептид, культивирование клеток в первой клеточной культуре, перенос клеток во вторую клеточную культуру после того, как произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках, причем представляющий интерес полипептид экспрессируется при условиях второй клеточной культуры, и поддержание второй клеточной культуры в течение некоторого периода времени так, чтобы полипептид накапливался в клеточной культуре. Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает определение того, что в первой клеточной культуре произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках.

Согласно пятому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ получения характеризующейся метаболическим сдвигом клеточной линии, предусматривающий следующие стадии: поддержание клеточной популяции в первой клеточной культуре при условиях, которые обеспечивают наращивание клеточной массы, определение того, когда произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках, перенос фракции клеточной популяции из первой клеточной культуры во вторую клеточную культуру после того, как произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках, поддержание клеточной популяции во второй клеточной культуре в течение некоторого периода времени, и необязательно сбор клеток, тем самым получая характеризующуюся метаболическим сдвигом клеточную линию.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрена характеризующаяся метаболическим сдвигом клеточная линия, полученная любым из раскрытых в настоящем документе способов согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам осуществления характеризующаяся метаболическим сдвигом клетка содержит последовательность нуклеиновой кислоты, стабильно интегрированную в клеточный геном, причем последовательность нуклеиновой кислоты кодирует представляющий интерес полипептид или белок. Согласно другим вариантам осуществления характеризующаяся метаболическим сдвигом клетка содержит экспрессионный вектор, кодирующий представляющий интерес полипептид или белок.

Согласно одному варианту осуществления метаболический сдвиг на потребление лактата обнаруживают с помощью измерений pH, содержания лактата или основания в первой клеточной культуре. Согласно другим вариантам осуществления клетки переносят во вторую клеточную культуру, когда обнаруживают потребление лактата. Согласно другим вариантам осуществления метаболический сдвиг на потребление лактата обнаруживают после повышения pH в первой среде для культивирования клеток без добавления основания. Согласно другим вариантам осуществления метаболический сдвиг на потребление лактата обнаруживают, когда уровни содержания лактата в первой клеточной культуре выходят на плато. Согласно другим вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает определение метаболического сдвига, предусматривающее следующее: измерение pH в первой клеточной культуре, добавление основания для поддержания значения pH выше заданного нижнего предела, определение того, что значение pH выше заданного нижнего предела в течение последовательных временных интервалов и прекращение добавления основания, тем самым определяя, что в первой клеточной культуре произошел метаболический сдвиг на потребление лактата.

Согласно другим вариантам осуществления метаболический сдвиг на потребление лактата обнаруживают с помощью индикаторов или продуктов клеточного метаболизма, включая в себя без ограничения потребление кислорода и такие метаболиты, как глицин, триптофан, фенилаланин, аденин, пальмитиновая кислота, глутаминовая кислота, метионин и аспарагин. Согласно другому варианту осуществления метаболический сдвиг на потребление лактата обнаруживают с помощью метаболомического анализа или протеомного анализа.

Согласно одному варианту осуществления метаболический сдвиг происходит, когда клетки выходят из фазы логарифмического (т.е. экспоненциального) роста в первой клеточной культуре. Согласно другому варианту осуществления клетки переносят после того, как клетки выходят из фазы логарифмического роста в первой клеточной культуре.

Согласно другому варианту осуществления метаболический сдвиг происходит, когда клетки достигли фазы стационарного роста в первой клеточной культуре. Согласно другому варианту осуществления клетки переносят после того, как клетки достигли фазы стационарного роста в первой клеточной культуре.

Согласно одному варианту осуществления метаболический сдвиг происходит в первой клеточной культуре на 3 день или через 3 дня роста клеток в первой клеточной культуре. Согласно другому варианту осуществления метаболический сдвиг происходит в первой клеточной культуре на 3,5 день или через 3,5 дня роста клеток в первой клеточной культуре.

Согласно некоторым вариантам осуществления первая клеточная культура представляет собой заправочную культуру. Согласно некоторым вариантам осуществления вторая клеточная культура представляет собой периодическую культуру с подпиткой. Согласно другим вариантам осуществления вторая клеточная культура представляет собой производственную культуру. Согласно другим вариантам осуществления культивирование второй клеточной культуры осуществляют в производственном биореакторе.

Согласно другим вариантам осуществления клетки переносят во вторую клеточную культуру при начальной плотности клеток, составляющей больше чем или равной приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки переносят во вторую клеточную культуру при начальной плотности клеток, составляющей приблизительно $0,5-3,0 \times 10^6$ клеток/мл.

Согласно некоторым вариантам осуществления концентрация лактата во второй клеточной культуре показывает чистое потребление лактата, например чистое потребление лактата достигается на 2, 3, 4 или 5 день или через 2 дня, 3 дня, 4 дня или 5 дней роста клеток во второй клеточной культуре. Согласно другим вариантам осуществления уменьшение накопления лактата представляет собой снижение максимальной концентрации лактата во второй клеточной культуре. Согласно другим вариантам осуществления снижение максимальной концентрации лактата происходит во второй клеточной культуре на 5 день или через 5 дней роста клеток во второй клеточной культуре. Согласно другим вариантам осуществления максимальная концентрация лактата во второй клеточной культуре составляет меньше чем приблизительно 6, 5, 4, 3, 2 г/л или меньше чем приблизительно 1 г/л.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения клетка или клетки выбраны из группы, состоящей из следующего: клетка CHO, COS, ретинальная клетка, клетка Vero, CV1, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431, CV-1, U937, 3T3, клетка L, клетка C127, SP2/0, NS-0, MMT, PER.C6, мышинные лимфоидные клетки и клетки мышины гибридомы.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: Посевной сосуд с производящей слитый белок клеточной линией CHO использовали для инокуляции производственных биореакторов в параллелях при (фиг. 1A) трех различных метаболических состояниях (измерение pH в режиме реального времени и измерение содержания лактата в автономном режиме) и количествах жизнеспособных клеток (VCC). Также показано потребление основания, нормированное к 1 для посевного сосуда. Параметры (время, pH, содержание лактата, VCC и содержание основания) для каждой клеточной культуры (условие № 1, № 2 и 3), для которой клетки переносили в производственные биореакторы, указаны белыми прямоугольниками (пунктирная линия). Все производственные биореакторы функционировали при одинаковых условиях эксплуатации. Показано воздействие каждой системы посевных ферментеров и ее метаболического состояния на титр белка (фиг. 1B) и лактата (фиг. 1C) в производственном биореакторе. Линии, отражающие основную тенденцию, характерную для производственного биореактора, представляют собой среднее значение от биореакторов в двух параллелях, при этом планки погрешностей представляют $\pm$ одно стандартное отклонение.

Фиг. 2: Посевной сосуд с производящей антитело клеточной линией CHO использовали для инокуляции производственных биореакторов в параллелях в химически установленном способе при (фиг. 2A) четырех различных метаболических состояниях (измерение значения pH и содержания лактата в автономном режиме) и количествах жизнеспособных клеток. Параметры (время, pH, содержание лактата и VCC) для каждой клеточной культуры (условие №№ 1, 2, 3 и 4), для которой клетки переносили в производственные биореакторы, указаны белыми прямоугольниками (пунктирные линии). Все производственные биореакторы функционировали при одинаковых условиях эксплуатации. Условие № 1 утрачивалось через одну неделю. Также показано воздействие каждой системы посевных ферментеров и ее метаболического состояния на титр белка (фиг. 2B) и накопление лактата (фиг. 2C) в производственном биореакторе. Линии, отражающие основную тенденцию, характерную для производственного биореактора, представляют собой среднее от биореакторов в двух параллелях, при этом планки погрешностей представляют $\pm$ одно стандартное отклонение.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, представлена исключительно с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предусмотрено, чтобы она являлась ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения определяется формулой изобретения.

Используемые в настоящем описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки на формы множественного числа, если только контекст ясно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на "способ" включает в себя один или несколько способов и/или стадий типа, описанного в настоящем документе и/или который станет очевидным специалистам в настоящей области техники при чтении настоящего раскрытия.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют такое же значение, которое в большинстве случаев понятно специалисту в настоящей области

техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя при практическом осуществлении настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем документе, далее описаны конкретные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Клеточная культура

Используемая в настоящем документе фраза "периодическая культура" или "периодический режим" представляет собой фразу, которая относится к установке (например, сосуду для культивирования), которая заполнена клетками и характеризуется исходным полным рабочим объемом среды, которая никогда не заменяется. В такой периодической культуре все компоненты для культивирования клеток поставляют в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования. Культивирование, как правило, происходит до тех пор, пока не исчерпаются питательные вещества или отходы не достигнут токсических уровней и клетки прекратят расти.

Используемая в настоящем документе фраза "затравочная культура" или "система посевных ферментеров" (которая также называется "система для инокуляции") включает в себя источник инокуляции клеточной популяции, который, как предусмотрено, размножается в периодической культуре, или серии периодических культур, пока они не будут готовы к промышленному масштабу. Процесс наращивания клеток в системе посевных ферментеров представляет начальную фазу роста клеток, или фазу роста инокулята, после оттаивания замороженных клеток. Интервал между оттаиванием клеток и накоплением достаточной клеточной массы, чтобы инокулировать производственный биореактор, составляет фазу наращивания в системе посевных ферментеров. Клеточная масса может пропорционально увеличиваться, проходя через несколько стадий в биореакторе в затравочной культуре, и клетки выращивают в среде для культивирования клеток при условиях, благоприятных для выживания, роста и жизнеспособности клеточной культуры. Следует понимать, что система посевных ферментеров предусмотрена для того, чтобы сделать максимальной фазу экспоненциального роста, или достичь максимальной скорости роста для конкретного типа клеток, подлежащего культивированию. Следовательно, пассирование клеток из одного биореактора или сосуда в другой может представлять собой один путь достижения максимальной скорости роста. Точные условия будут варьировать в зависимости от типа клеток, организма, из которого происходят клетки, и природы и характера экспрессированного полипептида или белка. Сдвиг на метаболизм, характеризующийся потреблением лактата, может происходить или может быть обнаружен в любом из сосудов в системе наращивания клеток в посевных ферментерах.

Используемая в настоящем документе фраза "периодическая клеточная культура с подпиткой" или "периодическая культура с подпиткой" относится к периодической культуре, для которой характерно то, что клетки животного и культуральную среду поставляют в сосуд для культивирования изначально и дополнительные питательные вещества для культивирования медленно добавляют, непрерывно или с дискретными шагами приращения, в культуру во время культивирования, с периодическим сбором клеток и/или продукта перед прекращением культивирования или без него. Периодическая культура с подпиткой включает в себя "полунепрерывную периодическую культуру с подпиткой", которая характеризуется тем, что периодически всю культуру (которая может включать в себя клетки и среду) удаляют и заменяют свежей средой. Периодическая культура с подпиткой отличается от простой "периодической культуры", поскольку в периодической культуре все компоненты для культивирования клеток (включая в себя клетки животного и все питательные вещества для культивирования) поставляют в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования. Периодическая культура с подпиткой может дополнительно отличаться от перфузионного культивирования тем, что супернатант не удаляют из сосуда для культивирования во время процесса, тогда как в перфузионном культивировании клетки удерживают в культуре, например, с помощью фильтрации, и культуральную среду непрерывно или периодически вводят и удаляют из сосуда для культивирования. Тем не менее, предусмотрено удаление образцов с целью исследования во время периодического культивирования клеток с подпиткой. Процесс периодического культивирования с подпиткой продолжается, пока не определят, что достигнут максимальный рабочий объем и/или производство белка.

Используемая в настоящем документе фраза "непрерывная клеточная культура" относится к технике, используемой для выращивания клеток непрерывно, как правило, в конкретной фазе роста. Например, если требуется постоянная подача клеток или требуется получение конкретного представляющего интерес полипептида или белка, может быть необходимо, чтобы клеточная культура поддерживалась в конкретной фазе роста. Таким образом, условия необходимо непрерывно подвергать мониторингу и регулировать соответствующим образом для поддержания клеток в этой конкретной фазе.

Используемая в настоящем документе фраза "фаза логарифмического роста" означает период роста клеток, как правило, характеризующийся удвоением количества клеток. Фразы "фаза экспоненциального роста" или "экспоненциальная фаза" используются взаимозаменяемо с "фазой логарифмического роста". В фазе логарифмического роста количество новых клеток, появившихся в единицу времени, пропорционально существующей клеточной популяции, следовательно, график зависимости натурального логарифма количества клеток от времени представляет собой прямую линию. Если рост не ограничивают,

удвоение будет продолжаться с постоянной скоростью, следовательно, как количество клеток, так и скорость роста популяции увеличивается вдвое за каждый последующий период времени.

Используемая в настоящем документе фраза "стационарная фаза" относится к точке, где скорость роста клеток равна скорости гибели клеток. При построении графика стационарную фазу представляют как плато или "сглаженную", горизонтальную линейную часть кривой.

Используемый в настоящем документе термин "клетка" включает в себя любую клетку, которая является подходящей для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают в себя клетки эукариот, такие как клетки не являющегося человеком животного, клетки млекопитающего, клетки человека или слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квадromы. Согласно определенным вариантам осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, не относящейся к человекообразным, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. Согласно другим вариантам осуществления клетка выбрана из следующих клеток: клетки CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), ретинальные клетки, клетки Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, NaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальные клетки), CV-1, U937, 3T3, клетка L, клетка C127, SP2/0, NS-O, клетка MMT, опухолевая клетка и клеточная линия, полученная из вышеупомянутой клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка содержит один или несколько вирусных генов, например, ретинальная клетка, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6®). Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой клетку CHO. Согласно другим вариантам осуществления клетка представляет собой клетку CHO K1.

Используемый в настоящем документе термин "клеточная линия" относится к клетке или клеткам, полученным из конкретной линии дифференцировки через серийное пассирование или субкультивирование клеток. Термин "клетки" используется взаимозаменяемо с термином "клеточная популяция".

Принимая во внимание современные стратегии подпитки, соответствующие последним достижениям, клетки CHO достигают такого количества клеток, как 11×10^6 клеток/мл (на 8 день) и титров, составляющих, например, 2,3 г/л IgG человека (собранного на 14 день), количества, которые представляют собой типичные промышленные значения для периодических культур клеток CHO с подпиткой (Kim BJ, et al. *Biotechnol Bioeng.* 2012 Jan; 109(1): 137-45. doi: 10.1002/bit. 23289. Epub 2011 Oct 3). Сообщалось о производстве антитела, составляющем даже больше чем 10 г/л, из клеток CHO, которые стали общепризнанными в качестве важной промышленной клеточной линией млекопитающего (Omasa et al, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 11:233-240).

Термины "среда для культивирования клеток" и "культуральная среда" относятся к питательному раствору, используемому для выращивания клеток млекопитающего, который, как правило, обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как углеводный источник энергии, незаменимые аминокислоты, микроэлементы, витамины и т.д. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например, сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые обеспечивают сырьевые материалы, поддерживающие рост клеток. Среды могут содержать дрожжевые или соевые экстракты вместо экстрактов животного происхождения. Среда с установленным химическим составом относится к среде для культивирования клеток, в которой все химические компоненты являются известными. Среда с установленным химическим составом абсолютно не содержит компонентов животного происхождения, таких как пептоны из сыворотки или пептоны животного происхождения.

Один аспект настоящего изобретения относится к фазе роста, на которой условия культивирования клеток модифицируют для усиления роста рекомбинантных эукариотических клеток. На фазе роста основную культуральную среду и клетки подают в сосуд для культивирования периодически.

Сосуд для культивирования инокулируют клетками. Подходящая плотность посева для начальной фазы роста клеток варьирует в зависимости от исходной клеточной линии, например, в диапазоне, составляющем $0,2-3 \times 10^6$ клеток/мл. Сосуды для культивирования включают в себя без ограничения луночные планшеты, Т-колбы, встряхиваемые колбы, сосуды с мешалкой, роллерные колбы, полволоконные биореакторы, биореакторы с воздушным подъемом и подобное. Подходящий сосуд для культивирования клеток представляет собой биореактор. Биореактор относится к любому сосуду для культивирования, который произведен или сконструирован для управления окружающими условиями или их контроля. Такие сосуды для культивирования хорошо известны в настоящей области техники.

Процессы и системы биореакторов были разработаны для оптимизации газообмена, для подачи достаточного количества кислорода для поддержания роста и продуктивности клеток и для удаления CO₂. Поддержание эффективности газообмена является важным критерием для обеспечения успешного пропорционального увеличения клеточной культуры и производства белка. Такие системы хорошо известны специалисту в настоящей области техники.

За фазой экспоненциального роста или затравочной культурой (т.е. первой клеточной культурой), как правило, следует отдельная вторая культура, известная как фаза производства полипептида. Согласно одному варианту осуществления клетки, подвергающиеся метаболическому сдвигу на потребление лактата в первой клеточной культуре, переносят во вторую клеточную культуру. Согласно одному вари-

анту осуществления культивирования второй клеточной культуры проводят в другом сосуде для культивирования, чем фазу роста клеток или затравочную культуру. Согласно некоторым вариантам осуществления культивирования второй клеточной культуры происходит в производственном биореакторе. В этом контексте перенос клеток относится к экстракции фракции клеточной популяции из сосуда с первой клеточной культурой и помещению фракции клеточной популяции в сосуд для второй клеточной культуры для закладки второй клеточной культуры.

Согласно другим аспектам перенос клеток может относиться к объему клеток, содержащему клетки первой клеточной культуры, который помещают в другой сосуд, и объем инокулята представляет собой фракцию конечного объема второй клеточной культуры, например, приблизительно 20, 30, 40, или 50, или 60, или 70, или 80% конечного объема. Согласно другим аспектам перенос клеток может относиться к объему клеток, содержащему клетки первой клеточной культуры, который остался в исходном сосуде, и среду добавляют так, чтобы исходный объем (первая клеточная культура) представлял собой фракцию конечного объема второй клеточной культуры. В этом контексте, первую клеточную культуру разводят, тем самым осуществляя перенос клеток во вторую клеточную культуру.

Используемая в настоящем документе фраза "выходят из" или "выходит из" относится к переключению с одной фазы на другую фазу, или событиям, относящимся к переключению с одной фазы на другую фазу. Выход из конкретной фазы, например, фазы роста, включает в себя период времени, когда измерения указывают на то, что первая фаза замедляется или почти завершена, и начинается следующая фаза. Выход из фазы логарифмического роста, например, указывает на то, что клетки заканчивают фазу логарифмического роста, и/или начинают или достигли стационарной фазы. Фазы роста, как правило, измеряют по концентрации жизнеспособных клеток.

Фраза "плотность клеток" относится к количеству клеток на объем образца, например, в виде количества общих (жизнеспособных и мертвых) клеток на мл. Количество клеток можно подсчитать вручную или автоматически, например, с помощью проточного цитометра. Автоматизированные счетчики клеток были адаптированы к подсчету количества жизнеспособных или мертвых клеток или как жизнеспособных, так мертвых клеток с использованием, например, стандартной техники поглощения трипанового синего. Фраза "плотность жизнеспособных клеток" или "концентрация жизнеспособных клеток" относится к количеству жизнеспособных клеток на объем образца (которое также называется "число жизнеспособных клеток"). Любое количество хорошо известных неавтоматизированных или автоматизированных техник можно использовать для определения плотности клеток. Можно проводить измерения биомассы культуры в режиме реального времени, где емкость или оптическая плотность коррелируют с количеством клеток на единицу объема.

Конечная плотность клеток в первой клеточной культуре, такая как плотность в системе посевных ферментеров, варьирует в зависимости от исходной клеточной линии, например, в диапазоне, составляющем приблизительно $1,0\text{--}10 \times 10^6$ клеток/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления конечная плотность в системе посевных ферментеров достигает $1,0\text{--}10 \times 10^6$ клеток/мл перед переносом клеток во вторую клеточную культуру. Согласно другим вариантам осуществления конечная плотность в системе посевных ферментеров достигает $5,0\text{--}10 \times 10^6$ клеток/мл переносом клеток во вторую клеточную культуру.

Согласно некоторым вариантам осуществления фракцию клеточной популяции в первой клеточной культуре переносят во вторую клеточную культуру. Согласно другим вариантам осуществления клеточную популяцию в первой клеточной культуре переносят во вторую клеточную культуру так, что первая клеточная культура представляет собой фракцию второй клеточной культуры. Начальная плотность клеток второй культуры может быть выбрана специалистом в настоящей области техники. Согласно некоторым вариантам осуществления начальная плотность клеток во второй клеточной культуре составляет приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток/мл - приблизительно $3,0 \times 10^6$ клеток/мл. Согласно другим вариантам осуществления начальная плотность клеток во второй клеточной культуре составляет приблизительно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или $3,0 \times 10^6$ клеток/мл.

Согласно определенным вариантам осуществления клеточный супернатант или клеточный лизат собирают после фазы образования продукта. Согласно другим вариантам осуществления представляющий интерес полипептид или белок извлекают из культуральной среды или клеточного лизата с использованием техник, хорошо известных в настоящей области техники.

Свойства клеток и локализация производимого продукта диктуют способ, используемый для выращивания и производства и, следовательно, определяют выбор подходящего типа биореактора или сосуда для культивирования. (Bleckwenn NA and Shiloach, J. 2004 "Large-scale cell culture" Curr Protoc Immunol. 59: Appendix 1U.1-Appendix 1U.44.)

Метаболический сдвиг

Используемая в настоящем документе фраза "метаболический сдвиг" относится к изменению в клеточном метаболизме, или использованию углеродных источников питательных веществ, от производства лактата на чистое потребление лактата. Не связываясь с какой-либо теорией, наиболее распространенные углеродные источники питательных веществ в бессывороточных средах представляют собой глюкозу и

глутамин, которые поддерживают быстрый рост клеток. Глюкоза может полностью окисляться до CO_2 и H_2O или, исходя из доступности кислорода, может превращаться в лактат, например, в аэробном гликолизе. Быстрорастущие клетки быстро потребляют глюкозу и глутамин, что приводит к неполному окислительному метаболизму и, следовательно, к избытку производства лактата. Метаболизм углеводов может переходить на потребление лактата и, таким образом, снижать накопление лактата.

Используемая в настоящем документе фраза "потребление лактата" относится к использованию лактата в качестве источника углерода в клеточном метаболизме.

Используемая в настоящем документе фраза "чистое потребление лактата" относится к потреблению лактата, при котором клетки одновременно потребляют лактат и производят лактат в качестве побочного продукта клеточного метаболизма, и общая скорость потребления больше или равна скорости производства лактата. Если чистое потребление лактата увеличивается, общее накопление лактата в среде для культивирования клеток уменьшается.

При закладке периодической культуры с подпиткой накопление лактата и, возможно, аммиака, вызывает быстрое снижение жизнеспособности клеток. Сообщалось, что в периодических культурах с подпиткой, которые не характеризовались метаболическим сдвигом, невозможно достичь выше 90% жизнеспособности, когда концентрация клеток достигла своего максимума. (Xie and Wang, 1994, *Biotechnol. Bioeng.* 43(11): 1175-1189). Такой метаболический сдвиг, несмотря на то, что он является желательным для оптимального осуществления процесса, не является типичным, кроме того, его нелегко контролировать (Zagari et al., 2013, *New Biotechnol.* 30(2): 238-245). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что время и условия переноса клеток из первой периодической культуры (например, затравочной культуры) во вторую периодическую культуру (например, периодическую культуру с подпиткой или производственную культуру) оказывают существенное воздействие на конечный титр белка. Неожиданно определили, что клетки, культивируемые в течение более длительного периода времени в первой периодической культуре, будут переходить на потребление лактата и обеспечивать метаболическое предпочтение, или метаболический фенотип, характеризующийся потреблением лактата. Целью настоящего изобретения является создание клеток в состоянии постоянного метаболического сдвига, а значит, клеток с метаболической памятью на потребление лактата. Способ согласно настоящему изобретению хорошо подходит для предварительного приведения клеток в состояние метаболического сдвига так, чтобы клетки можно было использовать в любой второй или последующей клеточной культуре, где потребление лактата является предпочтительным.

Согласно одному варианту осуществления общее накопление лактата уменьшается во второй клеточной культуре. Согласно некоторым вариантам осуществления чистое потребление лактата достигается во время второй клеточной культуры, например чистое потребление лактата достигается на 2, 3, 4 или 5 день или через 2 дня, 3 дня, 4 дня или 5 дней роста клеток во второй клеточной культуре. В других вариантах осуществления уменьшение накопления лактата представляет собой снижение максимальной концентрации лактата во второй клеточной культуре. Согласно другим вариантам осуществления снижение максимальной концентрации лактата происходит во второй клеточной культуре на 5 день или через 5 дней роста клеток во второй клеточной культуре. Согласно другим вариантам осуществления максимальная концентрация лактата во второй клеточной культуре составляет меньше чем приблизительно 6, 5, 4, 3, 2 или меньше чем приблизительно 1 г/л.

Согласно некоторым вариантам осуществления характеризующиеся метаболическим сдвигом клетки производят по меньшей мере в 2 раза, или в 3 раза, или в 4 раза, или в 5 раз, или вплоть до в 10 раз более низкие значения концентрации лактата во второй клеточной культуре. Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления пониженные значения концентрации лактата во второй клеточной культуре или общее уменьшенное накопление лактата во второй клеточной культуре сравнивают с указанным параметром, определенным в идентичной в других отношениях клеточной культуре при идентичных в других отношениях условиях за исключением того, что перенос клеток во вторую клеточную культуру происходит до того, как в первой клеточной культуре произошел метаболический сдвиг. Согласно другим вариантам осуществления общее накопление лактата уменьшается во второй клеточной культуре на 5 день или через 5 дней роста клеток во второй клеточной культуре.

Согласно другому варианту осуществления общий титр продукта увеличивается во второй клеточной культуре. Согласно другим вариантам осуществления характеризующиеся метаболическим сдвигом клетки производят по меньшей мере в 2 раза, или в 2,5 раза, в 3 раза, или в 4 раза, или в 5 раз, или вплоть до в 10 раз более высокий титр продукта во второй клеточной культуре. Согласно другим вариантам осуществления повышенные значения титра белка во второй клеточной культуре сравнивают с указанным параметром, определенным в идентичной в других отношениях клеточной культуре при идентичных в других отношениях условиях за исключением того, что перенос клеток во вторую клеточную культуру происходит до того, как в первой клеточной культуре произошел метаболический сдвиг.

Оптимизация метаболического контроля за клетками в культуре до периодической культуры с подпиткой или стадии образования продукта обладает множеством преимуществ. Метаболический сдвиг на потребление лактата в первой культуре можно определить по многочисленным параметрам. Определение метаболического сдвига предусматривает ряд способов, известных специалисту в настоящей области

техники для определения метаболического статуса растущих клеток.

Измерение значений концентрации лактата в первой клеточной культуре можно осуществить с помощью разнообразных биоаналитических систем и наборов, хорошо известных специалисту в настоящей области техники, таких как анализаторы с применением электрохимии (например, Bioprofile® Flex, Nova Biomedical, Waltham, MA), или спектроскопии комбинационного рассеяния, и их можно использовать для автономного мониторинга или мониторинга в режиме реального времени накопления лактата в клеточной культуре.

Следует понимать, что накопление лактата оказывает неблагоприятное действие на клеточную культуру и, следовательно, оказывает отрицательное действие на выход белкового продукта.

Согласно одному варианту осуществления метаболический сдвиг определяют в первой клеточной культуре, когда чистое накопление лактата замедляется или прекращается.

Согласно одному варианту осуществления метаболический сдвиг на потребление лактата обнаруживают с помощью измерений лактата в первой клеточной культуре. Согласно некоторым вариантам осуществления метаболический сдвиг определяют в первой клеточной культуре, когда определяют плато или, по существу, горизонтальную линию на графике, представляющем измерение следующих подряд значений концентрации лактата в культуре. Согласно другим вариантам осуществления значение концентрации лактата остается ниже верхнего предела допустимых значений для следующих подряд измерений. Согласно другим вариантам осуществления верхний предел допустимых значений для концентрации лактата не превышает 4 г/л. Следует понимать, что содержания лактата достигают плато, когда клетки испытывают чистое потребление лактата.

Согласно другим вариантам осуществления определение метаболического сдвига предусматривает измерение лактата в первой клеточной культуре с интервалами, и определение того, что содержание лактата находится ниже заданного верхнего предела в течение последовательных временных интервалов, тем самым, определяя, что произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках.

Управление и контроль pH представляет собой важный аспект содержания клеток в культуре биореактора. Рост большинства клеток является оптимальным в пределах узких границ pH. Как правило, клеточную культуру содержат при нейтральном значении pH, составляющем 7,0, в пределах диапазона верхних и нижних установленных значений. Установленные значения определяются специалистом в настоящей области техники в зависимости от конкретной клеточной линии в культуре, состава среды и оптимальных условий роста для данной клетки. Используемое в настоящем документе выражение "нейтральное значение pH" означает значение pH, составляющее приблизительно 6,85 - приблизительно 7,4. Выражение "нейтральное значение pH" включает в себя значения pH, составляющие приблизительно 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

Мониторинг pH и добавление основания в режиме онлайн, или "в режиме реального времени", можно осуществить с помощью любого количества способов, хорошо известных специалисту в настоящей области техники. В онлайн системе, измерения биологических и химических параметров в клеточной культуре в режиме реального времени путем прямого соединения с анализатором обеспечивает обратную связь для проведения дополнительных действий, например, добавления основания или добавления питательных веществ в культуральную среду. Также можно проводить автономные измерения, при которых имеет место периодический забор образцов и неавтоматизированные манипуляции оператора. Непрерывное измерение pH обеспечивает мониторинг клеточной среды и добавление основания, например, если кислотность достигает нижнего установленного значения за пределами допустимых значений. Если pH достигает установленных верхних пределов допустимых значений (т.е. становится слишком основной), можно добавить CO₂.

Мониторинг в режиме реального времени можно осуществить с помощью разнообразных способов. Электроды, такие как проточные электроды, широко используют для измерения значения pH или других параметров, таких как содержание растворенного O₂ (dO₂) и температура, в среде для культивирования клеток. Такие проточные электроды подключают напрямую в любой стандартный ленточный самописец для непрерывной записи или можно соединить с любым стандартным лабораторным pH-метром или милливольтметром. pH также можно измерять с помощью оптического измерения с использованием зоны флуоресцентного сенсора, установленной в биореакторе.

Любая такая система мониторинга будет интегрировать предел допустимых значений (или зону нечувствительности датчика) вблизи установленных верхних и нижних значений. Зона нечувствительности датчика предохраняет систему дозирования от слишком быстрого включения и выключения. Во время контроля за значением pH не будет происходить дозирование или титрование, если отклонение значения pH от установленного значения находится в пределах допустимых значений. Если измеренные значения pH превышают нижний предел допустимых значений (кислотный), тогда добавляют жидкое основание (например, KOH, NaOH, NaHCO₃) или газообразный NH₃. Если измеренные значения pH превышают верхний предел допустимых значений (основной), тогда добавляют кислоту или газ CO₂. Установленные значения pH и стратегия контроля, например зона нечувствительности датчика, связаны с многочисленными параметрами, таким как содержание растворенного CO₂, потребление основания для контроля за значением pH, и, следовательно, осмолярностью. (См., например, Li, F., et al., 2010, mAbs 2(5): 466-479.)

Согласно одному варианту осуществления метаболический сдвиг определяют в первой клеточной культуре, когда прекращают добавление (т.е. титрование) основания. Тенденция изменения содержания основания включает в себя тенденцию изменения в режиме реального времени, причем автоматизированный способ мониторинга можно использовать для определения значения pH и периодического добавления основания. Согласно настоящему способу установленные значения pH могут варьировать, но повышение значения pH за пределы нижней границы зоны нечувствительности указывает на метаболический сдвиг в первой клеточной культуре. Способы в режиме реального времени и неавтоматизированные способы измерения тенденции изменения содержания основания известны в настоящей области техники, включая в себя способы мониторинга массы сосуда, или объемной скорости потока насоса для обнаружения добавления основания или остановки добавления основания.

Согласно другому варианту осуществления метаболический сдвиг определяют в первой клеточной культуре, если добавление основания больше не требуется для повышения значения pH выше нижнего предела допустимых значений.

Согласно некоторым вариантам осуществления метаболический сдвиг определяют в первой культуре, если значение pH увеличивается без добавления основания. Согласно другим вариантам осуществления значение pH увеличивается выше нижнего предела допустимых значений для последовательных измерений.

Согласно другим вариантам осуществления определение метаболического сдвига предусматривает следующее: (a) настройка показывающего pH прибора на обнаружение уровня шума в первой клеточной культуре, (b) непрерывное измерение pH в первой клеточной культуре с регулярными интервалами, (c) добавление основания при необходимости для поддержания pH выше заданного нижнего предела, (d) определение того, что значение pH находится выше заданного нижнего предела в течение нескольких последовательных временных интервалов, и (e) прекращение добавления основания, тем самым, определяя, что произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках.

Согласно одному варианту осуществления нижний предел допустимых значений представляет собой значение pH, составляющее приблизительно 6,5, 6,55, 6,6, 6,65, 6,7, 6,75, 6,8, 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05 или приблизительно 7,1.

Согласно некоторым вариантам осуществления метаболический сдвиг на потребление лактата обнаруживают с помощью индикаторов или продуктов клеточного метаболизма в первой клеточной культуре. Один такой индикатор клеточного метаболизма представляет собой потребление кислорода (Zagari, et al., 2013, *New Biotechnol.* 30(2):238-245). Точное измерение скорости истощения кислорода в среде для культивирования клеток можно использовать для определения присутствия жизнеспособных клеток в культуре после инокуляции, а также скорости роста клеток в культуре (см., например, патенты США №№ 6165741 и 7575890). Измерение потребления кислорода хорошо известно в настоящей области техники.

Другие индикаторы клеточного метаболизма, такие как ферменты и метаболиты, можно измерить с помощью протеомных или метаболомных техник, таких как иммунологические чипы, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) или масс-спектрометрия. Отмечали корреляцию содержания таких метаболитов, как глицин, триптофан, фенилаланин, аденин, пальмитиновая кислота, глутаминовая кислота, метионин и аспарагин, с увеличением клеточной биомассы (см., например, Jain M., et al, *Science*. 2012 May 25; 336(6084): 1040-1044. doi: 10.1126/science. 1218595; и De la Luz-Hdez, K., 2012, *Metabolomics and Mammalian Cell Culture*, Metabolomics, Dr Ute Roessner (Ed.), ISBN: 978-953-51-0046-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/metabolomics/metabolomics-and-mammalian-cell-cultures>). Любое количество молекулярных изменений, которые совпадают или напрямую ведут к метаболическому сдвигу в первой клеточной культуре, можно использовать для определения того, что метаболический сдвиг произошел.

Получение белка

Способы согласно настоящему изобретению предусматривают производство представляющего интерес белка или полипептида в клеточной культуре. Для обеспечения получения белка в способах согласно настоящему изобретению, клетки конструируют для того, чтобы они рекомбинантно экспрессировали представляющий интерес полипептид или белок.

Клетки переносят во вторую клеточную культуру, например, производственную культуру, после того, как произошел метаболический сдвиг на потребление лактата в клетках, и будут содержать во второй клеточной культуре в течение некоторого периода времени так, чтобы полипептид или белок накапливался в клеточной культуре.

Используемый в настоящем документе термин "полипептид" представляет собой отдельную неразветвленную полимерную цепь аминокислот, соединенную вместе с помощью пептидных связей между карбоксильными и аминогруппами смежных аминокислотных остатков. Термин "белок" также можно использовать для описания большого полипептида, такого как белок из семи трансмембранных доменов, с конкретной укладкой или пространственной структурой. Таким образом, подразумевается, что термин "белок" включает в себя четвертичные структуры, третичные структуры и другие сложные макромолекулы, состоящие по меньшей мере из одного полипептида. Если белок состоит из более чем одного поли-

пептида, которые физически связаны друг с другом, то используемый в настоящем документе термин "белок" относится к множественным полипептидам, которые физически соединены и функционируют вместе как отдельная структурная единица. Термин "белок" включает в себя полипептид.

Примеры полипептидов и белков, полученных с помощью способов согласно настоящему изобретению, включают в себя антитела, слитые белки, содержащие Fc слитые белки, рецепторы, содержащие рецептор Fc слитые белки и подобное.

Термин "иммуноглобулин" относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четверо из них могут быть взаимосвязаны с помощью дисульфидных связей. Структура иммуноглобулинов была всесторонне охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Кратко, каждая тяжелая цепь, как правило, содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно представленную в настоящем документе как V_H или VH) и константную область тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи, как правило, содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Домены C_{H1} и C_{H2} соединены с помощью шарнира. Каждая легкая цепь, как правило, содержит переменную область легкой цепи (сокращенно представленную в настоящем документе как V_L или VL) и константную область легкой цепи. Существуют два типа легких цепей у людей и других млекопитающих: каппа (κ) цепь и лямбда (λ) цепь. Константная область легкой цепи, как правило, содержит один домен (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут являться гипервариабельными в последовательности и/или могут образовывать структурно определяемые петли), которые также называются определяющие комплементарность области (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, которые называются каркасные области (FR). Каждая V_H и V_L , как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца (N-конца) к карбокси-концу (C-концу) в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk / *Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Как правило, нумерация аминокислотных остатков в этой области осуществляется согласно IMGT, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) или по системе нумерации EU согласно Kabat (также известной как "нумерация EU" или "индекс EU"), например, как в Kabat E.A. et al. *Sequences of Proteins of Immunological interest*. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991).

Термин "Fc" относится к части константной области тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере домены $CH2$ и $CH3$, которые, как правило, связываются с рецептором Fc, например, $Fc\gamma R$, а именно, $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32), $Fc\gamma RIII$ (CD16) или $FcRn$, т.е. неонатальным рецептором Fc. Следует понимать, что содержащий Fc слитый белок может содержать весь нативный домен Fc или его часть или содержать делеции, замены и/или вставки или другие модификации, которые делают его неспособным связываться с любым рецептором Fc, следовательно, делая домен нефункциональным или "лишенным функций эффектора" в отношении его типичной биологической функции, которая достигается посредством рецептора Fc.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" (Ab) относится к молекуле иммуноглобулина или ее производному, которое обладает способностью специфически связываться с антигеном. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном, как изложено выше при описании термина "иммуноглобулин". Антитело также может представлять собой биспецифическое антитело, диатело или сходную молекулу (см., например, Holliger et al., 1993, *PNAS USA* 90(14), 6444-8, в отношении описания диател). Кроме того, было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела, т.е. "антигенсвязывающими фрагментами" или "антигенсвязывающими белками". Как и полноразмерные молекулы антитела, антигенсвязывающие белки могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Примеры связывающих молекул или фрагментов, предусмотренных в пределах термин "антитело", включают в себя без ограничения следующее: (i) фрагмент Fab' или Fab , моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} , или моновалентное антитело, описанное в международной патентной публикации № WO2007059782; (ii) фрагменты $F(ab')_2$, бивалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab , связанные дисульфидным мостиком на шарнирной области; (iii) фрагмент Fd , состоящий по существу из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) фрагмент Fv , состоящий по существу из доменов V_L и V_H ; (v) фрагмент dAb (Ward et al., 1989, *Nature* 341, 544-546), который состоит по существу из домена V_H и также имеет название доменные антитела (Holt et al, 2003, *Trends Biotechnol.* 21(11): 484-90); (vi) верблюжьи антитела или нанотела (Revets et al., 2005, *Expert Opin Biol Ther.* 5(1): 111-24) и (vii) выделенная определяющая комплементарность область (CDR).

Используемые в настоящем документе термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклональных антител" относятся к препарату молекул антитела единого молекулярного состава. Композиция моноклональных антител проявляет единую специфичность и аффинность связывания в отношении конкретного эпитопа.

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает в себя антитела, содержащие переменную и константную области, происходящие из зародышевых последовательностей иммуноглобулина человека. Антитела человека могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые зародышевыми последовательностями иммуноглобулина человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или во время генной реаранжировки или путем соматической мутации *in vivo*). Термин "моноклональное антитело мыши, или мышинное моноклональное антитело" относится к антителам, проявляющим единую специфичность связывания, которые содержат переменную и константную области, происходящие из мышинных зародышевых последовательностей иммуноглобулина.

Используемый в настоящем документе термин "слитый белок" включает в себя содержащий Fc слитый белок и содержащий рецептор Fc слитый белок. Слитый белок может представлять собой любой полипептид, образованный путем экспрессии химерного гена, образованного путем комбинации более чем одной последовательности ДНК различного происхождения, как правило, путем клонирования одного гена в экспрессионный вектор в рамке считывания со вторым геном так, чтобы два гена кодировали один непрерывный полипептид.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предусмотрен описанный в настоящем документе способ получения рекомбинантного представляющего интерес полипептида или белка. Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный представляющий интерес полипептид или белок выбран из группы, состоящей из антитела, антигенсвязывающего белка, слитого белка, содержащего Fc слитого белка и содержащего рецептор Fc слитого белка.

Системы экспрессии клеток

Применение системы экспрессии клеток представляет собой необходимое предварительное условие для крупномасштабного получения таких полипептидов или белков в клеточной культуре.

Продукт согласно настоящему изобретению представляет собой полипептид или белок, который экспрессируют в клетках и собирают из системы культивирования, т.е. клеток и/или клеточной среды. Он может представлять собой любой представляющий интерес полипептид или белок (далее).

В экспрессионных векторах, как правило, используются сильные генные промоторы для управления транскрипцией иРНК продукта. Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, кодирующему представляющий интерес полипептид, например, антитело, антигенсвязывающий белок или слитый белок. Такие экспрессионные векторы можно использовать в способах согласно настоящему изобретению для рекомбинантного получения представляющих интерес полипептидов или белков с помощью клеточной культуры.

Экспрессионный вектор в контексте способов согласно настоящему изобретению может представлять собой любой подходящий вектор, включая в себя хромосомные, нехромосомные и синтетические нуклеиновокислотные векторы (последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая подходящий набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают в себя производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы из вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). Такие нуклеиновокислотные векторы и их применение хорошо известны в настоящей области техники (см., например, патенты США №№ 5589466 и 5973972).

Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую представляющий интерес полипептид или белок, поставляют в клетку-хозяина, причем молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с контролирующей экспрессию последовательностью, подходящей для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего.

Контролирующие экспрессию последовательности конструируют для контроля и управления транскрипцией кодирующих полипептид генов, представляющих интерес, и последующей экспрессией полипептидов или белков в различных клеточных системах. Плазмиды комбинируют экспрессируемый ген, представляющий интерес, с контролирующими экспрессию последовательностями (т.е. экспрессионными кассетами), которые содержат необходимые элементы, такие как, например, промоторы, энхансеры, селективируемые маркеры, операторы и т.д. В экспрессионном векторе молекулы нуклеиновой кислоты могут содержать или могут быть связаны с любым подходящим промотором, энхансером, селективируемым маркером, оператором, репрессорным белком, терминирующими последовательностями полиаденилирования и другими облегчающими экспрессию элементами.

Используемый в настоящем документе термин "промотор" относится к последовательности ДНК, достаточной для направления транскрипции последовательности ДНК, с которой он функционально связан, т.е. связан таким образом, чтобы контролировать транскрипцию нуклеотидной последовательности. Экспрессию нуклеотидной последовательности можно разместить под контроль любого промоторного или энхансерного элемента, известного в настоящей области техники. Примеры таких элементов включают в себя сильные промоторы экспрессии (например, промотор/энхансер IE CMV человек или главный промотор IE CMV (CMV-MIE), а также RSV, поздний промотор SV40, промоторы SL3-3, MMTV, убиквитина (Ubi), убиквитина C (UbC) и HIV LTR).

Согласно некоторым вариантам осуществления вектор содержит промотор, выбранный из группы,

состоящей из SV40, CMV, CMV-IE, CMV-MIE, RSV, SL3-3, MMTV, Ubi, UbC и HIV LTR.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие представляющий интерес полипептид или белок, также могут быть функционально связаны с эффективной терминирующей последовательностью полиаденилирования, точкой начала репликации для плазмидного продукта в *E. coli*, геном устойчивости к действию антибиотика в качестве селектируемого маркера и/или подходящим сайтом клонирования (например, полилинкером). Нуклеиновые кислоты также могут содержать регулируемый индуцируемый промотор (индуцируемый, репрессируемый, регулируемый условиями окружающей среды) в отличие от конститутивного промотора, такого как IE CMV (специалисту в настоящей области техники будет понятно, что такие термины фактически являются дескрипторами степени генной экспрессии при определенных условиях).

Селектируемые маркеры представляют собой элементы, хорошо известные в настоящей области техники. При селективных условиях могут выжить только клетки, экспрессирующие соответственный селектируемый маркер. Как правило, гены селектируемых маркеров экспрессируют белки, как правило, ферменты, которые обеспечивают устойчивость к различным антибиотикам в клеточной культуре. В других селективных условиях клетки, которые экспрессируют флуоресцентный белковый маркер, визуализируются, и их, таким образом, отбирают. Варианты осуществления включают в себя следующее: бета-лактамаза (*bla*) (ген устойчивости к антибиотику бета-лактаму или устойчивости к ампициллину, или *ampR*), *bls* (ген ацетилтрансферазы, обеспечивающий устойчивость к бластицидину), *bsd* (ген деаминазы, обеспечивающий устойчивость к бластицидину-S), *bsr* (ген устойчивости к бластицидину-S), *Sh ble* (ген устойчивости к Zeocin®), гигромицинофосфотрансфераза (*hpt*) (ген устойчивости к гигромицину), *tetM* (ген устойчивости к тетрациклину, или *tetR*), неомицинофосфотрансфераза II (*npt*) (ген устойчивости к неомицину, или *neoR*), *kanR* (ген устойчивости к канамицину), и *pac* (ген устойчивости к пуромицину). Селектируемые (или селективные) маркеры, как правило, используют в разработке стабильных клеточных линий.

Согласно определенным вариантам осуществления вектор содержит один или несколько генов селектируемых маркеров, выбранных из группы, состоящей из *bla*, *bls*, *BSD*, *bsr*, *Sh ble*, *hpt*, *tetR*, *tetM*, *npt*, *kanR* и *pac*. Согласно другим вариантам осуществления вектор содержит один или несколько генов селектируемых маркеров, кодирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP), синий флуоресцентный белок (CFP), усиленный синий флуоресцентный белок (eCFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) или подобное.

Для целей настоящего изобретения экспрессию генов в эукариотических клетках можно точно регулировать с использованием сильного промотора, который контролируется оператором, который, в свою очередь, регулируется регуляторным слитым белком (RFP). RFP состоит, по существу, из блокирующего транскрипцию домена и лигандсвязывающего домена, который регулирует его активность. Примеры таких экспрессионных систем описаны в US20090162901A1, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Используемый в настоящем документе термин "оператор" относится к последовательности ДНК, которую вводят в ген или рядом с геном, представляющим интерес, таким образом, чтобы ген мог регулироваться путем связывания RFP с оператором и в результате предотвращать или разрешать транскрипцию представляющего интерес гена. Ряд операторов в прокариотических клетках и бактериофагах был хорошо охарактеризован (Neidhardt, ed. *Escherichia coli* and *Salmonella*; Cellular and Molecular Biology 2d. Vol 2 ASM Press, Washington D.C. 1996). Они включают в себя без ограничения операторную область гена *LexA E. coli*, которая связывает пептид *LexA*, и операторы лактозы и триптофана, которые связывают репрессорные белки, кодируемые генами *LacI* и *trpR E. coli*. Также они включают в себя операторы бактериофагов из лямбда P_R и генов *ant/mnt* фага P22, которые связывают репрессорные белки, кодируемые лямбда *cI* и P22 *arg*. Согласно некоторым вариантам осуществления, в которых блокирующий транскрипцию домен RFP представляет собой рестрикционный фермент, такой как *NotI*, оператор представляет собой последовательность распознавания для этого фермента. Специалисту в настоящей области техники понятно, что оператор должен быть расположен рядом, или 3' относительно промотора так, чтобы он был способен контролировать транскрипцию с помощью промотора. Например, в патенте США № 5972650, который включен в настоящий документ посредством ссылки, раскрыто, что последовательности *tetO* находятся в пределах конкретного расстояния от ТАТА-бокса.

Согласно определенным вариантам осуществления оператор выбран из группы, состоящей из следующего: оператор *tet* (*tetO*), последовательность распознавания *NotI*, оператор *LexA*, оператор лактозы, оператор триптофана и оператор *Arg* (AO). Согласно некоторым вариантам осуществления репрессорный белок выбран из группы, состоящей из *TetR*, *LexA*, *LacI*, *TrpR*, *Arg*, *LambdaCI* и *GAL4*. Согласно другим вариантам осуществления блокирующий транскрипцию домен происходит из эукариотического репрессорного белка, например, репрессорного домена, происходящего из *GAL4*.

В иллюстративной системе экспрессии клеток клетки конструируют для экспрессии репрессорного белка тетрациклина (*TetR*) и представляющий интерес полипептид помещают под транскрипционный контроль промотора, чья активность регулируется *TetR*. Два tandemных оператора *TetR* (*tetO*) располагают непосредственно ниже по ходу транскрипции промотора/энхансера CMV-MIE в векторе. Транс-

крипция гена, кодирующего представляющий интерес белок, направляемая промотором CMV-MIE, в таком векторе может блокироваться с помощью TetR при отсутствии тетрациклина или другого определенного подходящего индуктора (например, доксициклина). В присутствии индуктора белок TetR не способен связываться с tetO, следовательно, происходит транскрипция и, таким образом, трансляция (экспрессия) представляющего интерес полипептида. (См., например, патент США № 7435553, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.)

Такие системы экспрессии клеток можно использовать для "запуска" производства представляющего интерес полипептида только во время культивирования производственной культуры. Таким образом, антибиотики, такие тетрациклин или другие подходящие индукторы, можно добавлять в биореактор к первой клеточной культуре.

Другая иллюстративная система экспрессии клеток включает в себя регуляторные слитые белки, такие как слитый белок TetR-ER_{LBD}T2, в котором блокирующий транскрипцию домен слитого белка представляет собой TetR, и лигандсвязывающий домен представляет собой лигандсвязывающий домен рецептора эстрогена (ER_{LBD}) с мутациями T2 (ER_{LBD}T2; Feil et al., 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:752-757). Если последовательности tetO расположены ниже по ходу транскрипции и рядом с сильным промотором CMV-MIE, транскрипция представляющей интерес нуклеотидной последовательности из промотора CMV-MIE/tetO блокировалась в присутствии тамоксифена, и это блокирование отменялось при удалении тамоксифена. В другом примере применение слитого белка Arc2-ER_{LBD}T2, слитого белка, состоящего из одноцепочечного димера, состоящего из двух белков Arc, соединенных линкером из 15 аминокислотных остатков и ER_{LBD}T2 (ранее), предусматривает оператор Arc (AO), более конкретно двух тандемные операторы а, непосредственно ниже по ходу транскрипции относительно промотора/энхансера CMV-MIE. Клеточные линии могут регулироваться с помощью Arc2-ER_{LBD}T2, причем клетки, экспрессирующие представляющий интерес белок, управляются промотором CMV-MIE/ArcO2 и индуцируются удалением тамоксифена. (См., например, US 20090162901A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.) Согласно некоторым вариантам осуществления вектор содержит гибридный промотор CMV-MIE/TetO или CMV-MIE/AO2.

Подходящие векторы, используемые в способах согласно настоящему изобретению, также могут использовать инструменты Cre-lox для технологии рекомбинации для облегчения репликации представляющего интерес гена. Стратегия Cre-lox требует наличия по меньшей мере двух компонентов: 1) рекомбиназа Cre, фермент, который катализирует рекомбинацию между двумя сайтами loxP; и 2) сайты loxP (например, специфическая последовательность из 34 п.н., состоящая из 8 п.н. сердцевинной последовательности, где происходит рекомбинация, и двух фланкирующих по 13 п.н. инвертированных повторов) или мутантных сайтов lox. (Смотрите, например, Araki et al., 1995, *PNAS* 92:160-4; Nagy, A. et al., 2000, *Genesis* 26:99-109; Araki et al., 2002, *Nuc Acids Res* 30(19):el03; и US20100291626A1, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки). Согласно другой стратегии рекомбинации дрожжевая рекомбиназа FLP может быть использована с консенсусной последовательностью FRT (см. также, например, Dymecki, S., 1996, *PNAS* 93(12): 6191-6196).

Согласно другому аспекту ген (т.е. нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес рекомбинантный полипептид) введен в усиливающую экспрессию последовательность экспрессионной кассеты и необязательно функционально связан с промотором, причем связанный с промотором ген фланкирован 5' первым сайтом распознавания рекомбиназой и 3' вторым сайтом распознавания рекомбиназой. Такие сайты распознавания рекомбиназой обеспечивают опосредованную Cre рекомбинацию в клетке-хозяине экспрессионной системы. В некоторых случаях второй связанный с промотором ген расположен по ходу транскрипции (3') относительно первого гена и фланкирован 3' вторым сайтом распознавания рекомбиназой. В других случаях второй связанный с промотором ген фланкирован 5' вторым сайтом распознавания рекомбиназой и фланкирован 3' третьим вторым сайтом распознавания рекомбиназой. Согласно некоторым вариантам осуществления сайты распознавания рекомбиназой выбраны из сайта loxP, сайта lox511, сайта lox2272 и сайта FRT. Согласно другим вариантам осуществления сайты распознавания рекомбиназой являются различными. Согласно дополнительному варианту осуществления клетка-хозяин содержит ген, способный экспрессировать рекомбиназу Cre.

Согласно одному варианту осуществления вектор содержит первый ген, кодирующий легкую цепь антитела или тяжелую цепь антитела, представляющего интерес, и второй ген, кодирующий легкую цепь антитела или тяжелую цепь антитела, представляющего интерес.

Следует понимать, что один или несколько векторов, несущих одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих и экспрессирующих представляющий интерес белок, можно использовать в такой экспрессионной системе.

Клетки согласно настоящему изобретению также можно сконструировать для увеличения экспрессии продукта посредством коэкспрессии таких белков, как шапероны, ингибиторы апоптоза, ингибиторы распада белка или другой белок, который может усиливать экспрессию или стабильность продукта.

Согласно некоторым вариантам осуществления вектор дополнительно содержит ген связывающегося с X-боксом белка 1 (mXBP1) и/или EDEM2, способный усиливать производство белка/секрецию белка посредством контроля за экспрессией генов, вовлеченных в укладку белка в эндоплазматическом рети-

кулуме (ER). (См., например, Ron D, and Walter P., 2007, Nat Rev Mol Cell Biol.8:519-529; Olivari et al., 2005, Biol. Chem. 280(4): 2424-2428, Vembar and Brodsky, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9(12): 944-957, 2008).

Применение временно трансфицированных клеток, которые быстро производят значительные количества продукта, также можно осуществить для оптимизации процесса культивирования клеток, хотя стабильную трансфекцию, как правило, используют для промышленных масштабов производства большого объема.

В контексте настоящего изобретения характеризующаяся метаболическим сдвигом клетка может содержать любой или все элементы системы экспрессии клеток, описанные в настоящем документе, необходимые для эффективного рекомбинантного производства представляющего интерес белка.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к характеризующейся метаболическим сдвигом рекомбинантной эукариотической клетке - хозяину, которая производит представляющий интерес белок. Примеры клеток-хозяев включают в себя клетки млекопитающего, такие как CHO, PER.C6, мышинные лимфоидные и мышинные гибридные клеточные линии (ранее). Например, согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение предусматривает характеризующуюся метаболическим сдвигом клетку, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, стабильно интегрированную в клеточный геном, которая содержит последовательность, кодирующую представляющий интерес белок. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение предусматривает характеризующуюся метаболическим сдвигом клетку, содержащую неинтегрированную (т.е. эписомальную) последовательность нуклеиновой кислоты, такую как плазида, космида, фагемида или линейный экспрессионный элемент, который содержит последовательность, кодирующую представляющий интерес белок.

"Сбор" или "сбор клеток" происходит в конце производственной серии в процессе накопления клеточной массы. Клетки отделяют от среды с помощью ряда способов, таких как фильтрация, инкапсулирование клеток, прилипание клеток на микрочипы, седиментация клеток или центрифугирование клеток. Очищение белка происходит в дополнительных стадиях для выделения белкового продукта. Полипептиды или белки можно собирать или из клеток, или из сред для культивирования клеток.

Стратегии очищения белков хорошо известны в настоящей области техники. Растворимые формы полипептида, такие как антитела, антител освязывающие фрагменты и Fc-содержащие белки, могут быть подвергнуты действию коммерчески доступным концентрационным фильтрам и впоследствии могут быть аффинно очищены с помощью хорошо известных способов, таких как аффинные смолы, ионообменные смолы, хроматографические колонки и подобное. Связанные с мембранами формы полипептида могут быть очищены путем получения общей мембранной фракции из экспрессирующей клетки и экстракции мембран с помощью неионного детергента, такого как TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA, USA). Цитозольные или ядерные белки можно получить путем лизиса клеток-хозяев (посредством механического воздействия, обработки ультразвуком, детергентом и т.д.), удаления фракции клеточных мембран путем центрифугирования и сохранения супернатанта.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения представляющего интерес антитела, или антигенсвязывающего белка, или слитого белка, причем указанный способ предусматривает следующие стадии а) культивирование клеток согласно способу, описанному в настоящем документе выше, б) сбор клеток и с) очищение полипептида или белка, такого как антитело, или антигенсвязывающий белок, или слитый белок, от клеток или сред для культивирования клеток.

Следующие примеры представлены для описания специалистам в настоящей области техники, как осуществить и применить способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не предусмотрено, что они ограничивают объем того, что авторы настоящего изобретения рассматривают как свое изобретение. Были предприняты попытки обеспечить точность используемых числовых выражений (например, количеств, концентраций, температуры и т.д.), однако следует принимать во внимание некоторые экспериментальные погрешности и отклонения.

Примеры

Пример 1. Определение параметров метаболического сдвига: производящая слитый белок клеточная линия

Клетки CHO трансфектировали ДНК, экспрессирующей слитый белок. Производящую слитый белок клеточную линию CHO инкубировали в культуре посевного сосуда, в патентованных средах, содержащих сою, и такие параметры, как значение pH в режиме реального времени, содержание лактата и количество жизнеспособных клеток в автономном режиме, измеряли и регистрировали для определения метаболического статуса (см. №№ 1, 2 или 3 на фиг. 1А). Использование основания также подвергали мониторингу и нормировали к 1 для указанной клеточной линии (также см. фиг. 1А).

Клетки при условии № 1 и условии № 2 использовали для инокуляции производственных биореакторов в параллелях, когда значение pH контролировалось на нижнем пределе контрольного диапазона и содержание лактата и VСС увеличивались. Клетки при условии № 3 инокулировали, когда значение pH начинало увеличиваться выше нижнего предела контрольного диапазона, т.е. прекращали использование основания, что указывало на реметаболизацию лактата (т.е. потребление). Рост клеток при условии № 3 выходил из фазы, следующей за фазой экспоненциального роста. Все производственные биореакторы

функционировали при одинаковых эксплуатационных условиях.

Титр продукта (см. фиг. 1В) и профили лактата (см. фиг. 1С) измеряли в каждом производственном биореакторе с использованием известных способов для определения воздействия метаболического статуса №№ 1, 2 или 3 в системе посевных ферментеров. Линии, отражающие основную тенденцию производственного биореактора, представляли среднее от биореакторов в двух параллелях с планками погрешностей, представляющих $\pm$ одно стандартное отклонение.

Клетки при условии № 3 характеризовались наиболее значительным эффектом на продуктивность и накопление лактата во второй клеточной культуре, давая в результате больше чем в 2 раза увеличение титра продукта (по сравнению с условиями № 1 и 2), в производственном биореакторе (см. фиг. 1В). Клетки при условии № 3 также давали в результате сниженную концентрацию лактата после переноса во вторую клеточную культуру (по сравнению с условиями № 1 и 2 - см. фиг. 1С). Клетки при условии № 3 характеризовались профилем лактата, указывающим на чистое потребление лактата (см. фиг. 1С на 8-12 дни культивирования клеточной культуры). Клетки, перенесенные из первой культуры при условии № 1 (т.е. перед метаболическим сдвигом в первой культуре) не достигают чистого потребления лактата в производственном биореакторе.

Пример 2. Определение параметров метаболического сдвига: производящая антитело клеточная линия

Сосуд для посева производящей антитело клеточной линии СНО использовали для инокуляции производственных биореакторов в параллелях аналогично примеру 1, но в среде с установленным химическим составом. Измеряли четыре различных метаболических статуса (мониторинг в автономном режиме значения pH, содержания лактата и количества жизнеспособных клеток - см. №№ 1, 2, 3 и 4 на фиг. 2А). Значение VCC продолжало увеличиваться в течение всей инкубации в посевном сосуде, если инокулировали производственные биореакторы.

Условие № 1 инокулировали очень рано в системе посевных ферментеров, когда значение pH оставалось на верхнем пределе контрольного диапазона и когда содержание лактата было низким, но увеличивалось. Условие № 2 инокулировали, когда значение pH начинало снижаться и содержание лактата увеличивалось и достигало максимальных уровней. Условие № 3 инокулировали, когда значение pH было близко нижнему пределу контрольного диапазона, и содержание лактата вышло на плато. Условие № 4 инокулировали, когда значение pH начало уменьшаться ниже нижнего предела контрольного диапазона и во время реметаболизации лактата (т.е. потребления лактата). Все производственные биореакторы функционировали при одинаковых эксплуатационных условиях. Условие № 1 утрачивалось через одну неделю.

Определяли воздействие метаболического статуса в системе посевных ферментеров на титр в производственном биореакторе (фиг. 2В) и профили лактата (фиг. 2С). Линии, отражающие основную тенденцию производственного биореактора, представляли среднее от биореакторов в двух параллелях с планками погрешностей, представляющих $\pm$ одно стандартное отклонение.

Клетки при условии №№ 3 и 4 характеризовались наиболее значительным эффектом на продуктивность во второй клеточной культуре. Клетки при условии №№ 3 и 4 также давали в результате сниженную концентрацию лактата в производственном биореакторе (по сравнению с условиями № 1 и 2), что указывает на метаболический фенотип, направленный на потребление лактата (см. фиг. 2В и 2С). Аналогично примеру 2 клетки, перенесенные из первой культуры при условии № 1, не достигают чистого потребления лактата в течение фазы образования продукта. Условия №№ 2, 3 и 4 достигают чистого потребления лактата в течение фазы образования продукта, тем не менее условие № 4 является наиболее оптимальным, поскольку чистое потребление лактата происходит раньше, чем при других условиях, и максимальное содержание лактата является наименьшим.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ культивирования клеток для получения представляющего интерес полипептида, предусматривающий:

- (а) культивирование клеток млекопитающих в первой клеточной культуре,
- (b) определение того, что в первой клеточной культуре произошел метаболический сдвиг на чистое потребление лактата, и
- (с) перенос клеток первой клеточной культуры во вторую клеточную культуру после того, как произошел метаболический сдвиг на чистое потребление лактата в клетках первой клеточной культуры, причем вторая клеточная культура проявляет чистое потребление лактата,
 - при этом первая клеточная культура представляет собой культуру в системе посевных ферментеров, а вторая клеточная культура представляет собой производственную культуру,
 - при этом представляющий интерес полипептид выбран из группы, состоящей из антитела, антиген-связывающего белка и слитого белка,
 - при этом метаболический сдвиг на чистое потребление лактата обнаруживают по увеличению значения pH в первой среде для культивирования клеток без добавления основания или

метаболический сдвиг на чистое потребление лактата обнаруживают, когда клетки выходят из фазы логарифмического роста или достигли стационарной фазы в первой клеточной культуре, или

метаболический сдвиг на чистое потребление лактата обнаруживают, когда уровни содержания лактата выходят на плато в первой клеточной культуре.

2. Способ по п.1, при котором клетки млекопитающих трансфицируют ДНК, кодирующей представляющий интерес полипептид, перед культивированием клеток в первой клеточной культуре и дополнительно предусматривающий поддержание второй клеточной культуры в условиях, которые обеспечивают экспрессию представляющего интерес полипептида и сбор представляющего интерес полипептида из второй клеточной культуры.

3. Способ по любому из пп.1, 2, при котором метаболический сдвиг на чистое потребление лактата обнаруживают в первой клеточной культуре на 3 день или через 3 дня культивирования указанных клеток в первой клеточной культуре.

4. Способ по любому из пп.1-3, при котором перенесенные клетки характеризуются инокуляционной плотностью клеток, составляющей от приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток/мл до приблизительно $3,0 \times 10^6$ клеток/мл во второй клеточной культуре.

5. Способ по любому из пп.1-4, при котором стадия определения метаболического сдвига на чистое потребление лактата предусматривает:

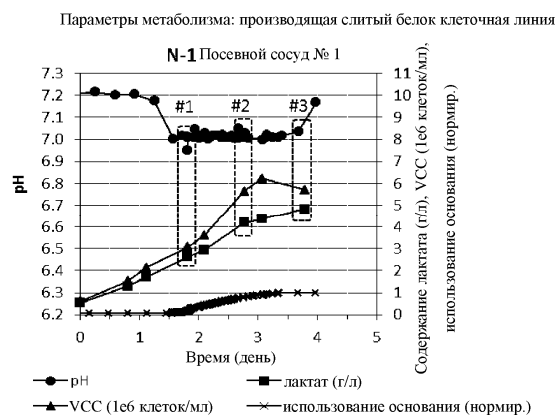
- (a) измерение pH в первой клеточной культуре,
- (b) добавление основания для поддержания pH выше заданного нижнего предела, где заданный нижний предел представляет собой значение pH от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,1,
- (c) прекращение добавления основания и
- (d) обнаружение того, что значение pH превышает заданный нижний предел в течение последовательных измерений, что свидетельствует о метаболическом сдвиге на чистое потребление лактата в первой клеточной культуре.

6. Способ по пп.1-5, при котором перенос клеток во вторую клеточную культуру предусматривает перенос клеток в производственный биореактор.

7. Способ по любому из пп.1-6, при котором клетки млекопитающих содержат одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые являются стабильно интегрированными в клеточный геном клеток, причем указанные последовательности кодируют представляющий интерес полипептид.

8. Способ по любому из пп.1-7, при котором клетки млекопитающих содержат один или несколько экспрессионных векторов, кодирующих представляющий интерес полипептид.

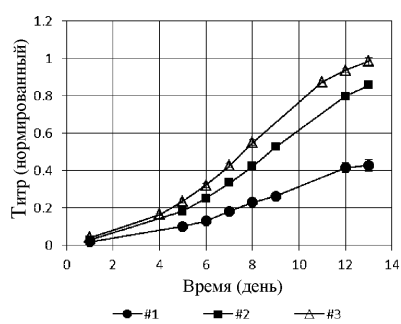
9. Способ по любому из пп.1-8, при котором клетки млекопитающих представляют собой клетки СНО.



Фиг. 1А

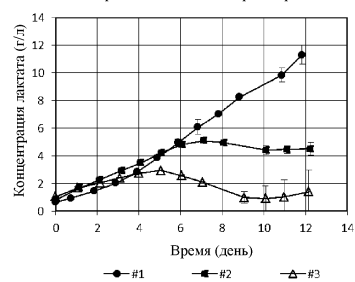
Титр белка

Производственный биореактор



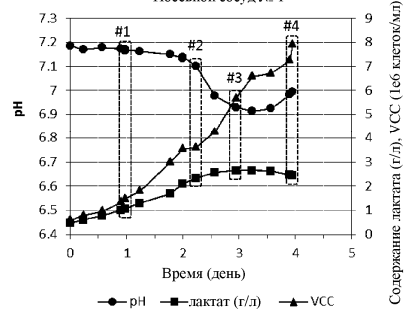
Профиль лактата

Производственный биореактор



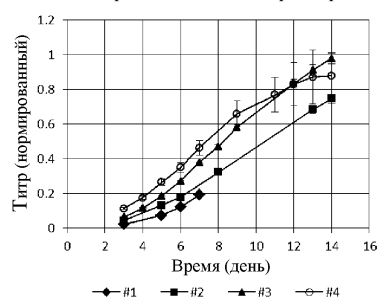
Параметры метаболизма: производящая антитело клеточная линия

Посевной сосуд № 1



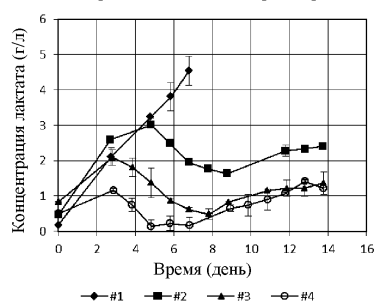
Титр белка

Производственный биореактор



Профиль лактата

Производственный биореактор



Фиг. 2С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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