

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035266**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.22

(21) Номер заявки
201691548

(22) Дата подачи заявки
2015.03.02

(51) Int. Cl. **C12N 15/09** (2006.01)

(54) ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ КОНСТРУКЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ОТБОРА КЛЕТОК-ХОЗЯЕВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ПОЛИПЕПТИДЫ

(31) **14157324.6**

(32) **2014.02.28**

(33) **EP**

(43) **2017.02.28**

(86) **PCT/EP2015/054331**

(87) **WO 2015/128509 2015.09.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИКНОС САЙЕНСИЗ СА (CH)

(72) Изобретатель:
**Эбишер-Гуми Кристель, Моретти
Пьер, Бертшингер Мартин (CH)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2009151605

WO-A1-2007131774

BENHAR ITAI: "Design of synthetic antibody libraries", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, INFORMA HEALTHCARE, UK, vol. 7, no. 5, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 763-779, XP009113525, ISSN: 1744-7682, DOI: 10.1517/14712598.7.5.763, the whole document

(57) Изобретение относится к экспрессирующей конструкции для экспрессии растворимых полипептидов в клетках-хозяевах и для экспрессии полипептидов на поверхности клеток-хозяев с применением альтернативного сплайсинга. Количество экспрессии полипептидов, таких как антитела, фрагменты антитела и биспецифичные антитела, на мембране клетки может непосредственно коррелировать с количеством экспрессируемого растворимого полипептида. В случае биспецифичных антител экспрессия на клеточной мембране гетеродимерных и гомодимерных продуктов может непосредственно коррелировать с экспрессией данных растворимых продуктов, что облегчает отбор желаемого клона продуцента.

B1

035266

035266

B1

Область техники

Изобретение относится к экспрессирующим конструкциям и способам для экспрессии фракции секретируемого белка, представляющего интерес, на поверхности эукариотических клеток с применением альтернативного сплайсинга. Настоящее изобретение также относится к способам отбора клетки или клеток, которые экспрессируют секретируемый белок, представляющий интерес, на желаемом уровне, посредством обнаружения уровня мембранной экспрессии белка, представляющего интерес. Настоящее изобретение также относится к отбору клетки или клеток, которые экспрессируют секретируемые гетеромультимерные белки, представляющие интерес, посредством обнаружения уровня мембранной экспрессии гетеромультимерного белка, представляющего интерес.

Уровень техники

Для наработки белка в эукариотической клетке ДНК, кодирующая данный белок, должна быть транскрибирована в матричную РНК (мРНК), которая, в свою очередь, будет транслирована в белок. Сначала мРНК транскрибируется в ядре в виде пре-мРНК, содержащей интроны и экзоны. В процессе созревания пре-мРНК в зрелую мРНК интроны вырезаются ("сплайсируются") аппаратом клетки, который называют сплайсосомой. Экзоны сливаются вместе, и мРНК модифицируется посредством добавления так называемого "кэпа" на 5'-конец и хвоста полиаденилирования (поли(А)) на 3'-конец. Зрелая мРНК экспортируется в цитоплазму и выступает в качестве матрицы для трансляции белков.

Альтернативный сплайсинг представляет собой термин, описывающий, что один и тот же транскрипт может быть сплайсирован различным образом, что приводит к появлению различных зрелых мРНК, а в некоторых случаях - различных белков. Данный механизм используется в природе для изменения уровня экспрессии белков или в процессе разработки для модификации активности определенных белков (Cooper TA & Ordahl CP (1985), J. Biol. Chem., 260(20): 11140-8). Альтернативный сплайсинг обычно контролируется посредством сложных взаимодействий многих факторов (Orengo J.P. et al., (2006) Nucleic Acids Res., 34(22): e148).

Альтернативный сплайсинг делает возможным образование двух (или более) различных РНК-транскриптов с той же матрицы ДНК. Данное свойство можно использовать для получения двух (или более) изоформ одного и того же белка или полипептида. По всей настоящей спецификации термины "белок" и "полипептид" используются взаимозаменяемо.

В природе альтернативный сплайсинг представляет собой в высшей степени контролируемый процесс, используемый, например, в процессе продукции антител активированными В-клетками в иммунной системе человека. Большинство антител секретируется во внеклеточное пространство, но фракция продуцированного антитела перенаправляется с секреторного пути на внешнюю мембрану клетки в форме мембраносвязанных изоформ.

Мембраносвязанные изоформы содержат ту же аминокислотную последовательность и структуру, что и антитело, секретируемое во внеклеточное пространство. Различие заключается в С-концевом удлинении тяжелой цепи секретируемого антитела трансмембранной областью, содержащей трансмембранный домен. В В-клетках длина данного домена может составлять приблизительно от 40 до 75 аминокислот (Major J.G. et al., (1996) Mol. Immunol. 33: 179-87).

Экспрессирующие системы для продукции рекомбинантных полипептидов хорошо известны в данной области техники. Для продукции полипептидов и белков, используемых в фармацевтических препаратах, обычно применяют клетки-хозяева млекопитающих, такие как CHO, ВНК, NSO, Sp2/0, COS, НЕК и PER.C6. Для крупномасштабной продукции терапевтических белков должна быть создана высокопродуктивная клеточная линия. После трансфекции клеточной линии-хозяина геном, кодирующим полипептид, представляющий интерес, получают множество клонов с различными характеристиками и проводят отбор. Отбор проводят общепринятым способом с применением, например, селективного маркера, амплификации генов и/или репортерных молекул. Отбор соответствующего клона с желаемыми свойствами, например высокопродуктивного клона, занимает много времени, часто является нестандартным и вследствие этого дорогим процессом.

В случае экспрессии гетеромультимерных белков, таких как биспецифичные антитела, получение подходящей клеточной линии-хозяина становится еще более сложным. Субъединицы белка, которые составляют мультимер, могут экспрессироваться в отдельных клеточных линиях, а затем быть сведены воедино для ассоциации в мультимерный белок, либо, в качестве альтернативы, различные субъединицы можно экспрессировать в одной клеточной линии. Экспрессия субъединиц в одной клеточной линии сопряжена с недостатками, заключающимися в том, что не все субъединицы белка будут ассоциировать в правильной форме, что приводит к получению смеси различных форм. При получении биспецифичных антител вместо желаемого гетеродимера часто образуются значительные уровни гомодимеров, что в значительной степени влияет на выход продукции биспецифичного антитела. И хотя нежелательные гомодимеры можно удалить посредством различных методик очистки, предпочтительно наличие клеточной линии-хозяина, в которой гетеродимеры экспрессируются на более высоких уровнях, чем гомодимеры, для сокращения напрасной траты времени и средств при последующем процессинге.

Таким образом, существует потребность в системе экспрессии, которую можно использовать для отбора клона или клонов клеток, экспрессирующих продукт, представляющий интерес, на высоком

уровне, т.е. для количественного отбора. Также существует потребность в способности отобрать клон или клоны клеток, которые экспрессируют продукт, представляющий интерес, желаемого качества, т.е. потребность в качественном отборе, например, на основании экспрессии гетеромультимерного белка, представляющего интерес.

Краткое описание изобретения

Изобретение относится к экспрессирующей конструкции или совокупности конструкций, предназначенных для экспрессии растворимого полипептида, представляющего интерес, посредством альтернативного сплайсинга, причем часть растворимого пептида секретируется во внеклеточное пространство, а часть экспонируется на внешней мембране клетки или клеток.

Настоящее изобретение также включает способы отбора клеток-хозяев, содержащих одну или более конструкций согласно настоящему изобретению, которые на желаемом уровне экспонируют полипептид, представляющий интерес, на внешней мембране.

Настоящее изобретение также относится к отбору клетки или клеток, которые экспрессируют секретируемые гетеродимерные белки, представляющие интерес, посредством обнаружения экспонирования гетеродимерного белка, представляющего интерес, на мембране клетки или клеток, содержащих одну или более конструкций согласно настоящему изобретению.

Согласно первому аспекту в настоящем изобретении предложена экспрессирующая конструкция, содержащая в направлении от 5' к 3':

промотор;

первый экзон, кодирующий полипептид, представляющий интерес;

донорный сайт сплайсинга, интрон и акцепторный сайт сплайсинга, причем первый стоп-кодон расположен между донорным сайтом сплайсинга и акцепторным сайтом сплайсинга в пределах указанного интрона;

второй экзон, кодирующий трансмембранную область, которая представляет собой модифицированную трансмембранную область иммуноглобулина или трансмембранную область, отличную от трансмембранной области иммуноглобулина;

второй стоп-кодон; и

сайт полиаденилирования,

причем после поступления в клетку-хозяин транскрипция первого и второго экзонов приводит к экспрессии полипептида, представляющего интерес, и экспонированию части полипептида, представляющего интерес, на внешней мембране клетки-хозяина.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения трансмембранная область, кодируемая вторым экзоном конструкции, содержит по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 остатков аминокислот.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения трансмембранная область, кодируемая вторым экзоном конструкции, содержит не более 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26 остатков аминокислот.

В частности, трансмембранная область может содержать от 17 до 29 остатков, от 19 до 26 остатков или от 21 до 24 остатков.

Согласно настоящему изобретению модифицированная трансмембранная область иммуноглобулина или модифицированная трансмембранная область, отличная от трансмембранной области иммуноглобулина, может представлять собой любой модифицированный вариант существующей в природе трансмембранной области иммуноглобулина или трансмембранной области, отличной от трансмембранной области иммуноглобулина.

Авторы настоящего изобретения модифицировали разнообразную группу трансмембранных областей для того, чтобы изменить свойства последних и, в частности, модулировать интеграцию в мембрану клетки и вследствие этого - экспонирование полипептида, представляющего интерес. В частности, аминокислотный состав трансмембранной области можно изменить для того, чтобы уменьшить или увеличить количество негидрофобных остатков в данной области на один или более остатков, а также увеличить или уменьшить размер трансмембранной области.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что применение трансмембранной области, отличной от трансмембранной области иммуноглобулина, например, трансмембранной области B7-1 мыши (SEQ ID NO: 173), приводит к высокому уровню экспрессии на мембране клетки по сравнению с уровнями, наблюдаемыми при применении трансмембранной области IgG1.

Авторы настоящего изобретения также исследовали трансмембранные области из ACLV1 (NP_001070869.1) SEQ ID NO: 174, ANTR2 (NP_477520.2) SEQ ID NO: 175, CD4 (NP000607.1) SEQ ID NO: 176, PTPRM (NP002836.3) SEQ ID NO: 177, TNFR5 (NP001241.1) SEQ ID NO: 178, ITB1 (NP596867.1) SEQ ID NO: 179, IGF1R (NP_000866.1) SEQ ID NO: 181, IB07 (NP_005505.2) SEQ ID NO: 180, TRMB (NP_000352.1) SEQ ID NO: 182, IL4RA (NP_000409.1) SEQ ID NO: 183, LRP6 (NP_002327.2) SEQ ID NO: 184, GrA (NP_002090) SEQ ID NO: 185, PTCRA (NP_001230097.1) SEQ ID NO: 186, а также модифицированные варианты данных трансмембранных областей, и продемонстрировали, что данные трансмембранные области являются подходящими для применения в конструкции или конструкциях согласно

настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения первый стоп-кодон расположен с 3'-конца от донорного сайта сплайсинга интрона.

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении также предложены способы изменения соотношения сплайсинга, наблюдаемого для данной конструкции, для того чтобы на мембране клетки экспонировалось достаточное количество полипептида, которое позволит проводить отбор клеток, в то время как большая часть полипептида экспрессируется в растворимой форме.

Авторы настоящего изобретения исследовали различные компоненты заявленных экспрессирующих конструкций, которые позволяли модулировать экспонирование белка, представляющего интерес, на мембране.

Согласно настоящему изобретению уровень экспрессии растворимого полипептида можно увеличить посредством добавления сайта поли(А) в интрон экспрессирующей конструкции, описанной в настоящей заявке.

Согласно аспекту настоящего изобретения конструкция может содержать конститутивный интрон, расположенный между промотором и первым экзоном.

Согласно настоящему изобретению силу акцептора сплайсинга и донора сплайсинга можно модифицировать для того, чтобы увеличить или уменьшить количество белка, представляющего интерес, экспонированного на мембране клетки.

В частности, консенсусную последовательность донорного сайта сплайсинга можно модифицировать посредством уменьшения или увеличения % идентичности или подобия последовательности донорного сайта сплайсинга, присутствующего в конструкции, консенсусной последовательности донорного сайта сплайсинга (C/A)AGGT(A/G)AGT (SEQ ID NO: 345).

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения консенсусную последовательность донорного сайта сплайсинга модифицируют с целью уменьшения силы донора сплайсинга. Консенсусную последовательность донорного сайта сплайсинга можно модифицировать посредством применения альтернативного кодона, например, посредством замены AAA, кодирующего лизин, на AAG, кодирующий лизин. Такая замена уменьшит уровень мембранной экспрессии. И наоборот, увеличение % идентичности или подобия донорного сайта сплайсинга консенсусной последовательности донорного сайта сплайсинга (C/A)AGGT(A/G)AGT (SEQ ID NO: 345) увеличит силу донорного сайта сплайсинга в конструкции и увеличит уровень мембранной экспрессии.

Согласно аспекту настоящего изобретения донорный сайт сплайсинга перекрывает 3'-конец первого экзона и 5'-конец интрона, и акцепторный сайт сплайсинга интрона расположен на 3'-конце интрона.

Согласно аспекту настоящего изобретения первый стоп-кодон расположен с 3'-конца от донорного сайта сплайсинга.

Согласно интрон экспрессирующей конструкции необязательно содержит поли(Y)-участок, включенный в акцепторный сайт сплайсинга. Содержание Y в поли(Y)-участке, включенном в акцепторный сайт сплайсинга интрона экспрессирующей конструкции, можно модифицировать. Изменение количества пиримидиновых оснований (Y) в поли(Y)-участке можно использовать для уменьшения или увеличения экспрессии полипептида, представляющего интерес, на клеточной мембране. В случае полипептида, представляющего интерес, с высоким уровнем мембранной экспрессии клеткой уменьшение количества Y в поли(Y)-участке уменьшит уровень мембранной экспрессии. В случае полипептида с низким уровнем мембранной экспрессии клеткой увеличение количества Y в поли(Y)-участке увеличит уровень мембранной экспрессии.

В частности, содержание поли(Y) в акцепторе сплайсинга можно понизить для уменьшения силы акцепторного сайта сплайсинга посредством изменения содержания поли(Y) в акцепторном сайте сплайсинга, что уменьшит экспонирование на мембране полипептида, представляющего интерес.

В качестве альтернативы, содержание поли(Y) в акцепторе сплайсинга можно повысить для увеличения силы акцепторного сайта сплайсинга посредством изменения содержания поли(Y) в акцепторном сайте сплайсинга, тем самым увеличивая экспонирование полипептида, представляющего интерес, на мембране.

Помимо модификаций, описанных выше, на событие альтернативного сплайсинга, которое приводит к экспонированию полипептида на мембране, можно также повлиять посредством модификации последовательности ДНК (и, вследствие этого, РНК) области точки разветвления. Нуклеотид области точки разветвления инициирует событие сплайсинга посредством атаки на первый нуклеотид интрона на 5'-сайте сплайсинга, тем самым образуя промежуточную структуру типа "лассо". Изменение последовательности области точки разветвления относительно консенсусной последовательности (CTRAYY SEQ ID NO: 347) может оказывать влияние на эффективность инициации события сплайсинга и, вследствие этого, на соотношение секретируемого полипептида и полипептида, экспонированного на мембране.

Также на соотношение сплайсинга может повлиять длина интрона. Было продемонстрировано, что вероятность включения альтернативного экзона в CD44 возрастает, когда интрон, расположенный непосредственно "выше по течению" от экзона, является укороченным (Bell M., Cowper A., Lefranc M., Bell J. and Screaton G. (1998). Influence of Intron Length on Alternative Splicing of CD44 Mol. Cell Biol. 18(10):

5930-5941.). В связи с этим следующим способом модификации конструкций является укорачивание длины интрона в конструкциях на основе альтернативного сплайсинга для увеличения фракции экспонированного на мембране полипептида, или наоборот.

Дополнительный механизм влияния на событие сплайсинга заключается в коэкспрессии РНК-связывающих белков, которая приводит к включению или пропуску экзона. Например, было показано, что белки CUG-BP (учетный № Uniprot: Q5F3T7) и muscleblind-подобный белок 3 (muscle-blind like 3, MBNL) (учетный № Uniprot: Q5ZKW9) оказывают влияние на соотношение сплайсинга в конструкции, экспрессирующей EGFP и dsRED (Orengo et al., 2006).

Вследствие этого в настоящем изобретении также предложена дополнительно модифицированная конструкция, содержащая экспрессируемые OPC (открытые рамки считывания), кодирующие РНК-связывающие белки, которые вызывают включение или пропуск экзона, а также способы, включающие котрансфекцию конструкциями согласно настоящему изобретению, содержащими экспрессируемые OPC, кодирующие РНК-связывающие белки, которые вызывают включение или пропуск экзона, и/или отдельные конструкции, содержащие такие OPC.

Кроме того, большинство мембранных белков проходят через эндоплазматический ретикулум (ЭР) и комплекс Гольджи, прежде чем достигнут поверхности клетки. Экспорт из ЭР представляет собой селективный процесс, опосредуемый транспортными пузырьками комплекса коатомера II (COPII), которые отделяются от участков выхода из ЭР. Взаимодействия между компонентами транспортных пузырьков COPII и короткими аминокислотными последовательностями с линейными двуионными гидрофобными и ароматическими мотивами или структурными мотивами в цитоплазматическом домене белков, заякоренных в мембрану, концентрируют транспортные белки в участках выхода из ЭР и усиливают поступление транспортируемых веществ в пузырьки COPII. Данные короткие линейные или структурные мотивы аминокислотной последовательности называют сигналами экспорта из ЭР.

Вследствие этого другой подход для корректировки экспонирования белка, представляющего интерес, на мембране заключается во введении либо отсутствии введения сигнала экспорта из ЭР для модификации прохождения полипептида, представляющего интерес, слитого с трансмембранной областью, через ЭР. Модификацию сигнала экспорта из ЭР, содержащегося в конструкции, для увеличения экспорта из ЭР используют с целью увеличения экспонирования белков, характеризующихся коротким периодом полужизни либо другими ограничениями стабильности или деградации, на мембране, и наоборот.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что количество полипептида, представляющего интерес, экспонированного на мембране клетки, прямо пропорционально уровню экспрессии растворимого полипептида. Вследствие этого клетки-хозяева, экспрессирующие полипептид, представляющий интерес, с высоким титром, экспонируют больше полипептида на мембране, чем клетки-хозяева, экспрессирующие полипептид с низким титром. Данный факт делает возможным непосредственное обнаружение и выделение высокопродуктивных рекомбинантных клеток-хозяев.

Согласно аспекту настоящего изобретения полипептид, кодируемый экспрессирующей конструкцией, может представлять собой часть белка-мультимера, например, гетеромультимерного полипептида, такого как рекомбинантное антитело или фрагменты рекомбинантного антитела. Фрагменты антитела могут быть выбраны из перечня, включающего: Fab, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂ и scFv. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, который экспрессирует экспрессирующая конструкция, может представлять собой тяжелую цепь антитела или фрагменты тяжелой цепи антитела.

Согласно следующему аспекту настоящего изобретения экспрессирующую конструкцию можно использовать для экспрессии биспецифичного антитела в клетке-хозяине. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессируемый полипептид представляет собой тяжелую цепь антитела. В качестве альтернативы, экспрессируемый полипептид представляет собой фрагмент антитела, присоединенный к Fc-области антитела. Фрагмент антитела может быть выбран из перечня, включающего: Fab, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂ и scFv. Предпочтительно фрагмент антитела представляет собой Fab или scFv. Более предпочтительно, фрагмент антитела представляет собой scFv. С целью эффективной экспрессии биспецифичного антитела также может быть обеспечена отдельная экспрессирующая конструкция для экспрессии легкой цепи антитела. Коэкспрессия экспрессирующих конструкций, кодирующих тяжелую цепь антитела и фрагмент антитела-Fc, с экспрессирующей конструкцией, кодирующей легкую цепь антитела, в клетках-хозяевах, приводит к экспрессии биспецифичного антитела. Как обсуждается выше, экспрессия биспецифичного антитела в клетках-хозяевах приводит к образованию множества нежелательных гомодимерных видов помимо желаемого гетеродимера. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения экспонирование компонентов данного биспецифичного антитела на мембране клетки делает возможным проведение непосредственного отбора клетки-хозяина, экспрессирующей преимущественно гетеродимерные антитела.

В настоящем изобретении также предложен способ изменения соотношения сплайсинга для экспонирования достаточного количества полипептида на мембране клетки, что делает возможным проведение отбора клеток, в то время как большая часть полипептида экспрессируется в растворимой форме.

Согласно данному аспекту настоящего изобретения способ включает измерение экспонирования полипептида, представляющего интерес, на мембране, а затем модификацию компонентов конструкции

на основании наблюдаемого экспонирования полипептида, представляющего интерес, на мембране для увеличения или уменьшения экспонирования на мембране с целью обеспечения лучшего отбора клетки или клеток, которые экспрессируют полипептид, представляющий интерес.

В настоящем изобретении также предложен способ отбора клетки или клеток, содержащих по меньшей мере одну конструкцию согласно настоящему изобретению, включающий отбор клетки или клеток посредством обнаружения уровня мембранной экспрессии белка, представляющего интерес, или гетеромультимерного белка, содержащего белок, представляющий интерес.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - схематический чертеж конструкции на основе альтернативного сплайсинга согласно настоящему изобретению. В результате альтернативного сплайсинга полипептида образуются два продукта сплайсинга. В случае продукта сплайсинга 1 кодоны, кодирующие две последние аминокислоты глицин (G) и лизин (K), включены в мРНК, и полипептид секретируется из клетки. В случае продукта сплайсинга 2 полипептид не содержит две аминокислоты G и K, но удлинен на трансмембранную область, которая содержит необязательную соединительную область, трансмембранный домен и необязательный небольшой внутриклеточный домен, и полученный в результате полипептид не секретируется, но презентуется на внешней мембране клетки;

фиг. 2 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением различных трансмембранных областей. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (ктрл). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных различными конструкциями на основе альтернативного сплайсинга, представлено в виде закрашенной гистограммы, и окрашивание контрольных клеток, трансфицированных несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1, представлено в виде наложенной черной линии (A-D). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (E) и средней флуоресценции окрашивания (G) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (H);

фиг. 3 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG4. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG4 (IgG4). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга, представлено в виде закрашенной гистограммы, и окрашивание контрольных клеток, трансфицированных несплайсируемой конструкцией, кодирующей секретируемое антитело IgG4, представлено в виде наложенной черной линии (A). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (B) и средней флуоресценции окрашивания (D) конструкции на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (C);

фиг. 4 - специфичное обнаружение биспецифичного антитела, экспонированного на мембране клетки с применением технологии альтернативного сплайсинга. Клетки окрашивали через 1 день после трансфекции. Fc-фрагменты (scFv-Fc и HC, тяжелая цепь) обнаруживали с применением антитела козы, специфичного к Fc-гамма человека, конъюгированного с ФЭ (фикоэритрином) (A-C, J-L). Легкие цепи каппа обнаруживали с применением антитела мыши против LC (легкой цепи) каппа человека, меченного АФЦ (аллофикоцианином) (D-F, M-O). Окрашивание scFv-Fc проводили с применением белка А, меченного ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианатом). Окрашивание, которое проводили для трансфицированных клеток, представлено в виде закрашенной гистограммы. В случае первого коктейля для трансфекции (A, D, G) профиль, полученный для нетрансфицированных клеток, представлен в виде наложения (черная линия). Для всех других экспериментов (B, C, E, F и H-R) отрицательные контроли (профили, полученные для трансфицированных клеток без трансмембранного домена) представлены в виде наложения (пунктирные линии);

фиг. 5 - титры секретируемой гомодимерной молекулы BEAT® и scFv-Fc через 6 дней после временной трансфекции;

фиг. 6 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1, содержащими различные трансмембранные области и различные модификации экспрессирующей конструкции. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (контроль);

фиг. 7 - нормированные уровни экспрессии различных конструкций на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1, которыми трансфицировали клетки CHO-S. Супернатант анализировали с применением прибора Octet QK и биозондов на основе белка А ("Стандартная HC": контроль без альтернативного сплайсинга);

фиг. 8 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе аль-

тернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембранной области B7-1 и различного содержания Y в поли(Y)-участке акцептора сплайсинга. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (ктрл). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных различными конструкциями на основе альтернативного сплайсинга, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных несплайсируемой конструкцией, кодирующей секретируемое антитело IgG1, представлено в виде наложенной черной линии (A-G). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (H) и средней флуоресценции окрашивания (J) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (I);

фиг. 9 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембранной области B7-1 и модификации консенсусной последовательности донора сплайсинга. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемый IgG1 (ктрл). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных различными конструкциями на основе альтернативного сплайсинга, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1, представлено в виде наложенной черной линии (A-C). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (D) и средней флуоресценции окрашивания (F) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (E);

фиг. 10 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембранной области B7-1 с различными трансмембранными доменами, состоящими из 22-23 гидрофобных аминокислот. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве положительного контроля проводили трансфекцию конструкцией на основе альтернативного сплайсинга, кодирующей секретируемый и экспонированный на мембране IgG1 с трансмембранной областью B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1 (заполненная гистограмма на (A)), и в качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (наложенная черная линия на (A)). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями, кодирующими секретируемый и экспонированный на мембране IgG1, с применением различных трансмембранных доменов, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных конструкцией с применением трансмембранной области B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1, представлено в виде наложенной черной линии (B-G). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (H) и средней флуоресценции окрашивания (I) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (G);

фиг. 11 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембранной области B7-1 с различными трансмембранными доменами, состоящими из 21-24 гидрофобных аминокислот и содержащими гидрофобные, полярные и заряженные остатки. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве положительного контроля клетки трансфицировали конструкцией на основе альтернативного сплайсинга, кодирующей секретируемый и экспонированный на мембране IgG1 с трансмембранной областью B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1 (заполненные гистограммы на (A)), и в качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (наложенная черная линия на (A)). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями, кодирующими секретируемый и экспонированный на мембране IgG1, с применением различных трансмембранных доменов, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных конструкцией с применением трансмембранной области B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1, представлено в виде наложенной черной линии (B-H). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями, кодирующими секретируемый и экспонированный на мембране IgG1, с применением трансмембранных доменов PTCRA, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1, представлено в виде наложенной черной линии (I). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (J) и средней флуоресценции окрашивания (L) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (K);

фиг. 12 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембран-

ной области B7-1, содержащей трансмембранный домен PTCRA, с вариацией количества гидрофобных остатков в трансмембранном домене PTCRA. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве положительного контроля клетки трансфицировали конструкцией на основе альтернативного сплайсинга, кодирующей секретируемый и экспонированный на мембране IgG1 с трансмембранной областью B7-1 и трансмембранным доменом PTCRA дикого типа (заполненные гистограммы на (A)), и в качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (наложенная черная линия на (A)). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями, кодирующими секретируемый и экспонированный на мембране IgG1, с применением различных модификаций трансмембранных доменов PTCRA, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных конструкцией с применением трансмембранной области B7-1 с трансмембранным доменом PTCRA дикого типа, представлено в виде наложенной черной линии (B-H). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (I) и средней флуоресценции окрашивания (K) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (J);

фиг. 13 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембранной области B7-1 с различными трансмембранными доменами, состоящими из 17-19 гидрофобных аминокислот и содержащими гидрофобные, полярные и заряженные остатки. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве положительного контроля клетки трансфицировали конструкцией на основе альтернативного сплайсинга, кодирующей секретируемый и экспонированный на мембране IgG1 с трансмембранной областью B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1 (заполненные гистограммы на (A)), и в качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (наложенная черная линия на (A)). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями, кодирующими секретируемый и экспонированный на мембране IgG1, с применением различных трансмембранных доменов, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных конструкцией с применением трансмембранной области B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1, представлено в виде наложенной черной линии (B-D). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (E) и средней флуоресценции окрашивания (G) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (F);

фиг. 14 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембранной области B7-1 с различными трансмембранными доменами, состоящими из 26-27 гидрофобных аминокислот и содержащими гидрофобные, полярные и заряженные остатки. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве положительного контроля клетки трансфицировали конструкцией на основе альтернативного сплайсинга, кодирующей секретируемый и экспонированный на мембране IgG1 с трансмембранной областью B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1 (заполненные гистограммы на (A)), и в качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (наложенная черная линия на (A)). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями, кодирующими секретируемый и экспонированный на мембране IgG1, с применением различных трансмембранных доменов, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных конструкцией с применением трансмембранной области B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1, представлено в виде наложенной черной линии (B-E). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (F) и средней флуоресценции окрашивания (H) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (G);

фиг. 15 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембранной области B7-1 с укороченными или удлинёнными трансмембранными доменами B7-1. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве положительного контроля клетки трансфицировали конструкцией на основе альтернативного сплайсинга, кодирующей секретируемый и экспонированный на мембране IgG1 с трансмембранной областью B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1 дикого типа (заполненные гистограммы на (A)), и в качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (наложенная черная линия на (A)). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями, кодирующими секретируемый и экспонированный на мембране IgG1, с применением различных трансмембранных доменов, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных конструкцией с применением трансмембранной области B7-1, содержащей трансмембранный домен B7-1 дикого типа, представлено в виде наложенной черной линии (B-E). Гистограммы использо-

вали для определения процента окрашенных клеток (F) и средней флуоресценции окрашивания (H) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после временной экспрессии с применением прибора Octet (G);

фиг. 16 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембранной области B7-1 с различными цитозольными хвостами. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве положительного контроля клетки трансфицировали конструкцией на основе альтернативного сплайсинга, кодирующей секретируемый и экспонированный на мембране IgG1 с трансмембранной областью B7-1, содержащей цитозольный хвост B7-1 (заполненные гистограммы на (A)), и в качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (наложенная черная линия на (A)). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями, кодирующими секретируемый и экспонированный на мембране IgG1, с применением различных цитозольных хвостов, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных конструкцией с применением трансмембранной области B7-1, содержащей цитозольный хвост B7-1, представлено в виде наложенной черной линии (B-N). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (O) и средней флуоресценции окрашивания (Q) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (P);

фиг. 17 - профили окрашивания клеток CHO-S, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования и секреции антитела IgG1 с применением трансмембранной области M1M2 с различными цитозольными хвостами. Анализ проводили через день после трансфекции. В качестве положительного контроля клетки трансфицировали конструкцией на основе альтернативного сплайсинга, кодирующей секретируемый и экспонированный на мембране IgG1 с трансмембранной областью M1M2, содержащей цитозольный хвост M1M2 (заполненные гистограммы на (A)), и в качестве отрицательного контроля клетки CHO-S трансфицировали несплайсируемыми конструкциями, кодирующими секретируемое антитело IgG1 (наложенная черная линия на (A)). Окрашивание, которое проводили для клеток, трансфицированных конструкциями, кодирующими секретируемый и экспонированный на мембране IgG1, с применением трансмембранной области M1M2 с цитозольным хвостом B7-1, представлено в виде закрашенной гистограммы; окрашивание клеток, трансфицированных конструкцией с применением трансмембранной области M1M2, включая цитозольный хвост M1M2, представлено в виде наложенной черной линии (B). Гистограммы использовали для определения процента окрашенных клеток (C) и средней флуоресценции окрашивания (E) конструкций на основе альтернативного сплайсинга и контроля. Титры секретируемого антитела определяли через 4 дня после трансфекции с применением прибора Octet (D);

фиг. 18 - варианты сборки трех субъединиц биспецифичного антитела BEAT;

фиг. 19 - пример точечной диаграммы, полученной после двойного окрашивания легкой цепи (LC) каппа и Fc-фрагмента отобранного стабильного пула клеток. Потенциальные молекулы, обнаруженные на мембране клетки посредством окрашивания, представлены справа. Fc-фрагмент был обнаружен с применением специфичного антитела козы против Fc-гамма человека, конъюгированного с ФЭ. Легкие цепи каппа обнаруживали с применением антитела мыши против LC каппа человека, меченного АФЦ;

фиг. 20 - корреляция между поверхностным окрашиванием и профилями секреции стабильных пулов, трансфицированных векторами на основе альтернативного сплайсинга. Отложенный на графике процент Q6* и Q7* составляет 100%, что представляет собой полную продуцирующую популяцию клеток (за исключением Q8);

фиг. 21 - точечная диаграмма, полученная после поверхностного окрашивания стабильного пула клеток перед сортировкой клеток. Для окрашивания использовали растворимые мишень 1 и 2 с целью обнаружения связывающих сайтов, экспонированных на поверхности клеток. Потенциальные молекулы, обнаруженные на мембране клетки посредством окрашивания, показаны в соответствующих квадрантах;

фиг. 22 - корреляция между фракцией молекулы BEAT, обнаруженной в супернатантах подпитываемой культуры в период времени 14 дней, и фракцией клеток, экспонирующих фенотип BEAT® на поверхности клетки;

фиг. 23 - пример измеренного профиля поверхности Fc, полученного для выбранного стабильного пула клеток, трансфицированных конструкциями на основе альтернативного сплайсинга. IgG, презентируемые на мембране клетки, обнаруживали с применением специфичного антитела козы против Fc-гамма человека, конъюгированного с ФЭ. Данные о живых клетках наносили на точечную диаграмму с осями FSC (forward side scatter, прямое рассеивание) и SSC (side scatter, боковое рассеивание) (g1 в A), чтобы продемонстрировать распределение флуоресценции исследованных пулов на основе альтернативного сплайсинга (заполненные гистограммы, B). Окрашивание клон, секретирующий IgG, в котором отсутствовала конструкция на основе альтернативного сплайсинга, использовали в качестве отрицательного контроля и представляли в виде наложения (пунктирная линия);

фиг. 24 - корреляция между интенсивностью поверхностного окрашивания и уровнем экспрессии секретирующих клеток, проанализированных в течение периодического процесса культивирования: кор-

реляция между поверхностной интенсивностью и титром IgG в день 1 культивирования серии с добавками (А) и корреляция между поверхностной интенсивностью в день 1 и qP (удельной продуктивностью), измеренной в течение экспоненциальной фазы (день 1-3) (В);

фиг. 25 - интенсивность поверхностного окрашивания в день 1 позволяет прогнозировать аккумулярованный секреторируемый IgG в день 7;

фиг. 26 - отбор высокопродуктивных клеток на основании экспонирования IgG на поверхности. Клетки, демонстрирующие "низкую", "среднюю" и "высокую" плотность IgG на мембране, отбирали посредством сортировки клеток методом проточной цитометрии (А). Распределение поверхностной флуоресценции определяли через две недели после сортировки (В), и удельную продуктивность отсортированных клонов оценивали в серии, культивируемой с добавками (С).

Подробное описание изобретения

В изобретении предложены экспрессирующие конструкции и способы для экспрессии полипептидов, в особенности, гетеромультимерных полипептидов, на мембране клетки. В частности, белок, представляющий интерес, может представлять собой рекомбинантные антитела или фрагменты рекомбинантных антител или биспецифичные антитела, в клетках-хозяевах с применением альтернативного сплайсинга. Уровень экспонирования на мембране клетки свидетельствует об уровне секреции полипептида в рекомбинантных клетках-хозяевах, а в случае гетеродимерных антител, экспонированных на мембране клетки, также свидетельствует о профиле секреции, т.е. экспрессии гетеродимера или гомодимера.

Термины "экспрессирующая конструкция" или "конструкция", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, включают полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который будет экспрессирован, и последовательность, контролирующую экспрессию указанной последовательности, такую как последовательность промотора и необязательно энхансера, включая любую комбинацию действующих в цис-положении контрольных элементов транскрипции. Последовательность, контролирующую экспрессию гена, т.е. транскрипцию гена и трансляцию продукта транскрипции, обычно называют регуляторной единицей. Большинство частей регуляторной единицы расположены "выше по течению" от кодирующей последовательности гена и функционально связаны с последней.

Экспрессирующая конструкция, расположенная "ниже по течению", может также содержать 3'-нетранслируемую область, содержащую поли(А)-сайт.

Регуляторная единица согласно настоящему изобретению функционально связана с геном, который будет экспрессирован, т.е. с единицей транскрипции, или отделена от гена промежуточной ДНК, такой как, например, 5'-нетранслируемая область (5'UTR) гетерологичного гена. Предпочтительно экспрессирующая конструкция фланкирована одним или более подходящими сайтами рестрикции для обеспечения возможности встраивания экспрессирующей конструкции в вектор и/или вырезания экспрессирующей конструкции из вектора. Таким образом, экспрессирующую конструкцию согласно настоящему изобретению можно использовать для конструирования вектора экспрессии, в частности, вектора экспрессии млекопитающего.

Термин "полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид", в настоящей заявке включает ДНК, кодирующую ген, предпочтительно, гетерологичный ген, экспрессирующий полипептид.

Термины "гетерологичная кодирующая последовательность", "гетерологичная последовательность гена", "гетерологичный ген", "рекомбинантный ген" или "ген" используются взаимозаменяемо. Данные термины означают последовательность ДНК, кодирующую рекомбинантный полипептид, в частности, искомым рекомбинантный гетерологичный белковый продукт, который будет экспрессирован в клетке-хозяине, предпочтительно, в клетке млекопитающего, и собран для последующего применения. Продукт гена может представлять собой полипептид, гликопептид или липогликопептиды. Гетерологичная последовательность гена может не присутствовать в клетке-хозяине в природе и может быть получена из организма того же или другого вида, а также может являться генетически модифицированной. В качестве альтернативы, гетерологичная последовательность гена присутствует в клетке-хозяине в природе.

Термины "белок" и "полипептид" используются взаимозаменяемо и включают совокупность остатков аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями, образованными между альфа-аминогруппой и карбоксильной группой соседних остатков.

Термин "промотор" в настоящей заявке означает регуляторную последовательность ДНК, которая, как правило, расположена "выше по течению" от гена и которая опосредует инициацию транскрипции посредством направления РНК-полимеразы к связыванию с ДНК и инициации синтеза РНК. Промоторы для применения в настоящем изобретении включают, например, промоторы вирусов, млекопитающих, насекомых и дрожжей, которые обеспечивают высокие уровни экспрессии, например, промотор цитомегаловируса млекопитающих или CMV, промотор SV40 или любой промотор, известный в данной области техники, подходящий для экспрессии в эукариотических клетках. Промоторы, в особенности подходящие для применения в экспрессирующей конструкции согласно настоящему изобретению, можно выбрать из перечня, включающего: промотор SV40, промотор tk человека, промотор MPSV, CMV мыши, CMV человека, CMV крысы, EF1 альфа человека, EF1 альфа китайского хомячка, GAPDH человека, гибридные промоторы, включая промотор MYC, HUK и CX, синтетические промоторы на основе реаранжировки сайтов связывания фактора транскрипции. В особенности предпочтительным промотором соглас-

но настоящему изобретению является промотор CMV мыши.

Термин "5'-нетранслируемая область (5'UTR)" относится к нетранслируемому участку на 5'-конце пре-мРНК или зрелой мРНК. На зрелой мРНК 5'UTR, как правило, несет на своем 5'-конце "кэп" 7-метилгуанозина и участвует во многих процессах, таких как сплайсинг, полиаденилирование, экспорт мРНК в цитоплазму, идентификация 5'-конца аппаратом трансляции мРНК и защита мРНК от деградации (Cowling VH (2010) Biochem J., 425:295-302).

Термин "интрон" означает участок некодирующей последовательности нуклеиновой кислоты, который транскрибируется и присутствует в пре-мРНК, но вырезается аппаратом сплайсинга на основании последовательностей донорного сайта сплайсинга и акцепторного сайта сплайсинга, соответственно, на 5'- и 3'-концах интрона, и вследствие этого не присутствует в транскрипте зрелой мРНК.

Как правило, интроны содержат внутренний сайт, называемый точкой разветвления, расположенный на 20-50 нуклеотидов "выше по течению" от 3'-сайта сплайсинга. Длина интрона, используемого в настоящем изобретении, может составлять от 50 до 10000 нуклеотидов. Более короткий интрон может содержать 50 или более нуклеотидов.

Полноразмерный интрон может содержать более 10000 нуклеотидов. Интроны, подходящие для применения в экспрессирующей конструкции согласно настоящему изобретению, можно выбрать из перечня, включающего: синтетические или искусственные интроны; или существующие в природе интроны, такие как химерный интрон β -глобина/IgG, интрон β -глобина, интрон IgG, первый интрон CMV мыши, первый интрон CMV крысы, первый интрон CMV человека, интрон варибельной области Ig и акцепторного сайта сплайсинга (Bothwell et al., (1981) Cell, 24: 625-637; US5,024,939), интроны гена TNT курицы и первый интрон EF1 альфа или модифицированные варианты указанных интронов.

Интрон, используемый в настоящем изобретении, может содержать акцепторные и донорные сайты сплайсинга из различных интронов, например, интрон может содержать донорный сайт сплайсинга из интрона IgG человека, например, донорный сайт сплайсинга гена *ighg1*, и акцепторный сайт сплайсинга из интрона 4 cTNT курицы.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения интрон содержит донорный сайт сплайсинга из интрона IgG человека и акцепторный сайт сплайсинга из интрона 4 cTNT курицы. Более предпочтительными являются интроны, содержащие донорный сайт сплайсинга из интрона IgG человека и акцепторный сайт сплайсинга, который выбран из группы, включающей интрон 4 TNT курицы (SEQ ID NO: 69) и конструкции, полученные из интрона 4 TNT курицы (SEQ ID NO: 70-78).

Термин "экзон" означает участок последовательности нуклеиновой кислоты, который транскрибируется в мРНК и сохраняется в зрелой мРНК после сплайсинга.

Термин "сайт сплайсинга" означает специфичные последовательности нуклеиновой кислоты, способные распознаваться аппаратом сплайсинга эукариотической клетки как подходящие для вырезания и/или лигирования с соответствующим сайтом сплайсинга. Сайты сплайсинга позволяют проводить вырезание интронов, присутствующих в транскрипте пре-мРНК. Как правило, 5'-участок сайта сплайсинга называют донорным сайтом сплайсинга, а соответствующий 3'-конец сайта сплайсинга называют акцепторным сайтом сплайсинга. Термин "сайт сплайсинга" включает, например, существующие в природе сайты сплайсинга, сконструированные сайты сплайсинга, например, синтетические сайты сплайсинга, канонические или консенсусные сайты сплайсинга и/или неканонические сайты сплайсинга, например, скрытые сайты сплайсинга. Донорные или акцепторные сайты сплайсинга, подходящие для применения в экспрессирующей конструкции согласно настоящему изобретению, можно выбрать из перечня, включающего: донор и акцептор сплайсинга химерного интрона β -глобина/IgG, донор и акцептор сплайсинга интрона β -глобина, донор и акцептор сплайсинга интрона IgG, донор и акцептор сплайсинга первого интрона мыши CMV, донор и акцептор сплайсинга первого интрона крысы CMV, донор и акцептор сплайсинга первого интрона человека CMV, донор и акцептор сплайсинга интрона варибельной области Ig и последовательность акцептора сплайсинга (Bothwell et al., (1981) Cell, 24: 625-637; US 5024939), донор и акцептор сплайсинга интронов гена TNT курицы и донор и акцептор сплайсинга первого интрона гена EF1 альфа или слитые конструкции указанных белков. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения донорный сайт сплайсинга получен из интрона IgG человека, и акцепторный сайт сплайсинга выбран из группы, включающей интрон 4 TNT курицы (SEQ ID NO: 69) и конструкции, полученные из интрона 4 TNT курицы (SEQ ID NO: 70-78).

Термин "консенсусная последовательность области донора сплайсинга" в настоящей заявке означает последовательность

(C/A)AGGU(A/G)AGU

(подчеркнутые последовательности являются частью интрона) SEQ ID NO: 345, как описано в книге "Molecular Biology of the Cell" (Alberts et al., Garland Publishing, New York 1995). Термин "консенсусная последовательность области акцептора сплайсинга" в настоящей заявке означает последовательность

CTRAYY- - - поли(Y)-участок- - - NCAGG

(подчеркнутые последовательности являются частью интрона; курсив: области точки разветвления) SEQ ID NO: 346, как описано в книге "Molecular Biology of the Cell" (Alberts et al., Garland Science, New

York 2002).

Термин "стоп-кодон" означает любой из трех стоп-кодонов, которые являются сигналами окончания синтеза белка (TAA (PHK: UAA), TAG (PHK: UAG) и TGA (PHK: UGA)). Во избежание неполной эффективности терминации или "утечки" стоп-кодона в качестве сигнала терминации синтеза белка можно использовать 2, 3 или несколько стоп-кодонов.

Термин "трансмембранная область" означает полипептид или белок, который кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты и который содержит необязательную внеклеточную часть, трансмембранный домен и необязательный цитозольный хвост. Трансмембранный домен представляет собой любую трехмерную белковую структуру, которая является термодинамически стабильной в мембране и обычно содержит одну трансмембранную альфа-спираль трансмембранного белка, преимущественно состоящую из гидрофобных аминокислот. Длина трансмембранного домена составляет, в среднем, 21 аминокислоту, но может варьировать от 4 до 48 аминокислот (Baeza-Delgado et al., 2012). Трансмембранная область содержит необязательное N-концевое внеклеточное соединительное удлинение аминокислот и трансмембранный домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранная область может дополнительно содержать C-концевое цитоплазматическое удлинение аминокислот или внутриклеточный домен. Трансмембранная область, обнаруженная, например, в гене *ighg1* человека, содержит соединительное удлинение аминокислот, за которым следуют два домена M1 и M2 (данную трансмембранную область называют трансмембранной областью "M1M2" или "IgG1"). Трансмембранные области для применения в настоящем изобретении включают, но не ограничены указанными, трансмембранную область гена рецептора фактора роста тромбоцитов человека (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) (запись в Swissprot P16234), асиалогликопротеинового рецептора человека (запись в Swissprot P07306), B7-1 человека и мыши (человека: запись в Swissprot P33681 и мыши: запись в Swissprot Q00609), ICAM-1 человека (запись в Swissprot P05362), *erbb1* человека (запись в Swissprot P00533), *erbb2* человека (запись в Swissprot P04626), *erbb3* человека (запись в Swissprot P21860), *erbb4* человека (запись в Swissprot Q15303), рецепторов фактора роста фибробластов человека, таких как FGFR1 (запись в Swissprot P11362), FGFR2 (запись в Swissprot P21802), FGFR3 (запись в Swissprot P22607), FGFR4 (запись в Swissprot P22455), VEGFR-1 человека (запись в Swissprot P17948), VEGFR-2 человека (запись в Swissprot P35968), рецептора эритропоэтина человека (запись в Swissprot P19235), PRL-R человека, рецептора пролактина (запись в Swissprot P16471), EphA1 человека, рецептора 1 эфрина типа A (запись в Swissprot P21709), рецептора инсулина человека (запись в Swissprot P06213), рецептора инсулиноподобного фактора роста человека (IGFR1, запись в Swissprot P08069, SEQ ID NO: 181), рецептороподобных тирозинфосфатаз белков человека (записи в Swissprot Q12913, P23471, P23467, P18433, P3470, P23469, P23468), нейропиллина человека (запись в Swissprot P014786), главного комплекса гистосовместимости класса II человека (цепи альфа и бета), интегринов человека (семейства альфа и бета), синдеканов человека, белка миелина человека, кадгерин человека, синаптобревина-2 человека (запись в Swissprot P63027), гликофорина-A человека (GrA, запись в Swissprot P02724, SEQ ID NO: 185), *Snip3* человека (запись в Swissprot Q12983), APP человека (запись в Swissprot P05067), белка-предшественника амилоида (запись в Swissprot P0DJ18), гена рецептора T-клеток альфа (PTCRA, запись в Swissprot PQ6ISU1, SEQ ID NO: 186) и рецептора T-клеток бета человека, CD3 гамма (запись в Swissprot P09693), CD3 дельта (запись в Swissprot P04234), CD3 дзета (запись в Swissprot P20963) и CD3 эпсилон (CD3E, запись в Swissprot P07766, SEQ ID NO: 197), рецептора R3 сериновой/треониновой протеинкиназы человека (ACVL1, запись в Swissprot P37023, SEQ ID NO: 174), рецептора сибиреязвенного токсина 2 человека (ANTR2, запись в Swissprot P58335, SEQ ID NO: 175), поверхностного гликопротеина CD4 T-клеток человека (CD4, запись в Swissprot P01730, SEQ ID NO: 176), фосфатазы белка тирозина типа рецептора *tni* человека (PTPRM, запись в Swissprot P28827, SEQ ID NO: 177), члена 5 суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли человека (TNFR5, запись в Swissprot P25942, SEQ ID NO: 178), интегрин бета-1 человека (ITB1, запись в Swissprot P05556, SEQ ID NO: 179), антигена гистосовместимости HLA класса I человека, альфа-цепи B-7 (запись в Swissprot P01889, SEQ ID NO: 180), тромбомодулина человека (TRBM, запись в Swissprot P07204, SEQ ID NO: 182), альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-4 человека (IL4RA, запись в Swissprot P24394, SEQ ID NO: 183), белка человека, родственного рецептору липопротеинов низкой плотности 6 (LRP6, запись в Swissprot 075581, SEQ ID NO: 184), альфа-субъединицы высокоаффинного рецептора иммуноглобулина эпсилон человека (FCERA, запись в Swissprot P12319, SEQ ID NO: 194), иммуноглобулиноподобного рецептора 2DL2 клеток-киллеров человека (KI2L2, запись в Swissprot P43627, SEQ ID NO: 195), общей субъединицы бета цитокинового рецептора человека (IL3RB, запись в Swissprot P32927, SEQ ID NO: 196), интегрин альфа-IIb человека (ITA2B, запись в Swissprot P08514, SEQ ID NO: 198), T-клетка-специфичного поверхностного гликопротеина человека CD28 (CD28, запись в Swissprot P10747, SEQ ID NO: 199).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения трансмембранную область, используемую в настоящем изобретении, выбирают из группы, включающей трансмембранную область B7-1 человека, трансмембранную область B7-1 мыши, трансмембранную область PDGFR, трансмембранную область асиалогликопротеинового рецептора человека и трансмембранную область *erbb-2*. Более предпочтительной является трансмембранная область B7-1 мыши, наиболее предпочти-

тельной является трансмембранная область B7-1 мыши, представленная в SEQ ID NO: 66.

Трансмембранная область иммуноглобулина включает трансмембранную область генов иммуноглобулина человека IGHA1 (код доступа NCBI: M60193), IGHA2 (код доступа NCBI: M60194), IGHD (код доступа NCBI: K02881), IGHE (код доступа NCBI: X63693), IGHG1 (код доступа NCBI: X52847), IGHG2 (код доступа NCBI: AB006775), IGHG3 (код доступа NCBI: D78345), IGHG4 (код доступа NCBI: AL928742), IGHGP (код доступа NCBI: X52849), IGHM (код доступа NCBI: X14940), а также трансмембранные области генов иммуноглобулина IGHA1 мыши (код доступа NCBI: K00691), IGHD (код доступа NCBI: J00450), IGHE (код доступа NCBI: X03624, U08933), IGHG1 (код доступа NCBI: J00454, J00455), IGHG2A (код доступа NCBI: J00471), IGHG2B (код доступа NCBI: J00462, D78344), IGHG3 (код доступа NCBI: X00915, V01526), IGHM (код доступа NCBI: J00444).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения используемая трансмембранная область представляет собой трансмембранную область, отличную от трансмембранной области иммуноглобулина, которая не содержит трансмембранных областей, кодируемых генами иммуноглобулина, в частности, трансмембранную область, отличную от трансмембранной области иммуноглобулина, которая не содержит трансмембранных областей, кодируемых генами иммуноглобулина человека IGHA1 (код доступа NCBI: M60193), IGHA2 (код доступа NCBI: M60194), IGHD (код доступа NCBI: K02881), IGHE (код доступа NCBI: X63693), IGHG1 (код доступа NCBI: X52847), IGHG2 (код доступа NCBI: AB006775), IGHG3 (код доступа NCBI: D78345), IGHG4 (код доступа NCBI: AL928742), IGHGP (код доступа NCBI: X52849), IGHM (код доступа NCBI: X14940), и не содержит трансмембранных областей, кодирующих гены иммуноглобулина мыши IGHA1 (код доступа NCBI: K00691), IGHD (код доступа NCBI: J00450), IGHE (код доступа NCBI: X03624, U08933), IGHG1 (код доступа NCBI: J00454, J00455), IGHG2A (код доступа NCBI: J00471), IGHG2B (код доступа NCBI: J00462, D78344), IGHG3 (код доступа NCBI: X00915, V01526), IGHM (код доступа NCBI: J00444).

Термин "поли(Y)-участок" означает протяженность нуклеиновых кислот, обнаруженную между точкой разветвления интрона и границей интрон-экзон. Данная протяженность нуклеиновых кислот содержит избыток пиримидинов (Y), означающий избыток пиримидиновых оснований C или T.

Термин "3'-нетранслируемая область (3'UTR)" означает нетранслируемый участок на 3'-конце пре-мРНК или зрелой мРНК. На зрелой мРНК данная область несет поли(A)-хвост и, как известно, играет множество ролей в стабилизации мРНК, инициации трансляции и экспорте мРНК (Jia J. et al., (2013) Curr. Opin. Genet. Dev., 23(1): 29-34).

Термин "энхансер" в настоящей заявке означает нуклеотидную последовательность, действие которой направлено на потенцирование транскрипции генов вне зависимости от характеристик гена, положения последовательности относительно гена или ориентации последовательности. Векторы согласно настоящему изобретению необязательно содержат энхансеры.

Термин "сигнал полиаденилирования" или "поли(A)-сигнал", или "поли(A)", или "поли(A)-сайт" означает последовательность нуклеиновой кислоты, присутствующую в транскриптах мРНК, которая в присутствии поли(A)-полимеразы позволяет осуществлять полиаденилирование транскриптов в сайте полиаденилирования, расположенном на 10-30 оснований "ниже по течению" от поли(A)-сигнала. В данной области техники известно множество поли(A)-сигналов, которые могут быть пригодными в настоящем изобретении. Примеры включают вариант поли(A)-сигнала гормона роста человека, поздний поли(A)-сигнал SV40 и поли(A)-сигнал гормона роста крупного рогатого скота.

Термины "функционально связанный" и "операционно связанный" используются взаимозаменяемо и означают функциональную связь между двумя или более участками ДНК, в частности, последовательностями гена, который будет экспрессирован, и последовательностями, контролирующими экспрессию указанных последовательностей. Например, последовательность промотора и/или энхансера, включая любую комбинацию действующих в цис-положении контрольных элементов транскрипции, функционально связана с кодирующей последовательностью, если указанная последовательность стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или в другой экспрессионной системе. Регуляторные последовательности промотора, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью гена, являются физически прилежащими к транскрибируемой последовательности.

"Ориентация" означает порядок нуклеотидов в данной последовательности ДНК. Например, ориентация последовательности ДНК в обратном направлении относительно другой последовательности ДНК является таковой, в которой 5'-3' направление последовательности относительно другой последовательности является обратным по сравнению с исходной точкой в ДНК, из которой была получена последовательность. Такие исходные точки могут включать направление транскрипции других специфичных последовательностей ДНК в исходной ДНК и/или точку начала репликации реплицируемых векторов, содержащих последовательность.

Термин "гомология последовательности нуклеиновой кислоты" или "гомология нуклеотидной последовательности" в настоящей заявке включает процент нуклеотидов в последовательности-кандидате, которые являются идентичными последовательности нуклеотидов в последовательности сравнения после выравнивания последовательностей и, при необходимости, введения разрывов для достижения макси-

мального процента идентичности последовательности. Таким образом, идентичность последовательности можно определить стандартными способами, которые общепринято используют для сравнения подобию положения нуклеотидов двух нуклеотидных последовательностей.

Термин "вектор экспрессии" в настоящей заявке включает выделенную и очищенную молекулу ДНК, которая после трансфекции в соответствующую клетку-хозяин обеспечивает соответствующий уровень экспрессии рекомбинантного продукта гена в клетке-хозяине. Помимо последовательности ДНК, кодирующей рекомбинантный продукт или продукт гена, вектор экспрессии содержит регуляторные последовательности ДНК, необходимые для эффективной транскрипции кодирующей последовательности ДНК в мРНК и для эффективной трансляции мРНК в белки в клеточной линии-хозяине.

Термины "клетка-хозяин" или "клеточная линия-хозяин" в настоящей заявке включают любые клетки, в частности клетки млекопитающих, способные расти в культуре и экспрессировать желаемый рекомбинантный продукт-белок.

Рекомбинантные полипептиды и белки можно продуцировать в различных экспрессирующих системах, таких как прокариотические (например, *E.coli*), эукариотические системы (например, на основе дрожжей, насекомых, позвоночных, млекопитающих) и экспрессирующие системы *in vitro*. Наиболее широко используемые способы крупномасштабной продукции белковых биологических препаратов основаны на введении генетического материала в клетки-хозяева посредством трансфекции векторами ДНК. Временной экспрессии полипептидов можно достичь благодаря временной трансфекции клеток-хозяев. Встраивание ДНК вектора в геном клетки-хозяина приводит к получению клеточной линии, которая является стабильно трансфицированной, и размножение такой стабильной клеточной линии можно использовать для крупномасштабной продукции полипептидов и белков.

Способы продукции нескольких полипептидов в эукариотической клетке посредством альтернативного сплайсинга описаны в международной заявке WO 2005/089285. Две различные экспрессионные кассеты находятся под контролем одного промотора, причем экспрессионные кассеты содержат сайты сплайсинга, которые позволяют проводить альтернативный сплайсинг и экспрессию указанных экспрессионных кассет в виде двух или более независимых продуктов гена в желаемом соотношении.

Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что данный подход является ограниченным в случае экспрессии растворимого варианта полипептида и варианта, связанного с плазматической мембраной, поскольку будут продуцироваться два полностью независимых белка и, следовательно, вариант, связанный с плазматической мембраной, не будет представлять желаемое качество продукта растворимого варианта полипептида.

Способы отбора эукариотических клеток, экспрессирующих гетерологичный белок, а также экспрессия растворимого варианта полипептида и варианта, связанного с плазматической мембраной, из альтернативно сплайсируемой нуклеиновой кислоты описаны в международной заявке WO 2007/131774. Вариант, который связан с плазматической мембраной и присоединен к клетке, экспрессирующей указанный вариант, можно использовать в качестве маркера для выделения успешно трансфицированных клеток.

Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что данный подход является ограниченным, поскольку способы контроля соотношения экспрессии растворимого полипептида и полипептида, экспонированного на мембране, отсутствуют. Альтернативный сплайсинг, как отмечено выше, представляет собой процесс, посредством которого могут быть экспрессированы различные варианты полипептида, но, поскольку механизмы альтернативного сплайсинга являются в высшей степени вариabельными и не предполагают какой-либо возможности контролировать соотношение сплайсинга, количества экспрессируемых вариантов полипептида будут варьировать.

Вследствие этого система клеточной экспрессии, посредством которой часть экспрессируемого полипептида перенаправляется для экспрессии на мембране клетки, будет характеризоваться уменьшенными титрами растворимого полипептида. Несмотря на то что экспрессия полипептидов на мембране клетки является ценным маркером для выделения высокоэкспрессирующих клонов, при отсутствии какой-либо формы контроля количества полипептида, экспрессированного на мембране клетки, титры растворимого полипептида могут значительно уменьшиться. Более того, невозможно найти два полипептида, экспрессируемые на одинаковом уровне в одинаковых условиях культивирования; вследствие этого маловероятно, что способ, разработанный для экспрессии одного полипептида в растворимой форме и в форме, экспонированной на мембране клетки, будет подходящим для всех полипептидов.

В отличие от подходов на основе альтернативного сплайсинга, описанных ранее, авторы настоящего изобретения разработали подход на основе альтернативного сплайсинга для экспрессии как растворимого, так и экспонированного на мембране клетки полипептида, в котором компоненты экспрессирующей конструкции можно модифицировать для оптимизации количества экспрессируемого растворимого полипептида, и при этом обеспечивать экспрессию полипептида на мембране клетки в количестве, достаточном для проведения отбора клонов клеток.

В иллюстративной экспрессирующей конструкции согласно настоящему изобретению для экспрессии тяжелой цепи антитела константная область тяжелой цепи IgG1 содержит слабый донор сплайсинга "выше по течению" от стоп-кодона, завершающего открытую рамку считывания секретируемой тяжелой

цепи. Акцепторный сайт сплайсинга и последовательность ДНК, кодирующая трансмембранную область, за которой следуют стоп-кодон и поли(А)-сайт, расположены с 3'-конца от стоп-кодона, в результате чего после сплайсинга трансмембранная область находится в рамке с открытой рамкой считывания тяжелой цепи IgG1. Полученные в результате альтернативные открытые рамки считывания завершаются стоп-кодоном и поли(А)-сайтом, соответственно. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что посредством модификации данной экспрессирующей конструкции можно изменять соотношение сплайсинга и, вследствие этого, количество растворимого полипептида по сравнению с полипептидом, экспонированным на мембране.

Данные модификации могут включать, например, применение гетерологичной трансмембранной области. Существующие в природе трансмембранные области IgG1 содержат соединительное удлинение аминокислот и домены M1 и M2. Посредством замены трансмембранной области IgG1 трансмембранной областью, которая представляет собой трансмембранную область, отличную от трансмембранной области иммуноглобулина, например, посредством замены трансмембранной областью B7-1 мыши, количество экспонированного на мембране полипептида можно увеличить. Как представлено на фиг. 2 примера 2, практически 40% временно трансфицированных клеток были положительными в отношении экспонированного на мембране IgG1, что представляет собой значительное увеличение относительно процента клеток, трансфицированных конструкцией, содержащей трансмембранную область IgG1 (до 20%). Данный результат является неожиданным, поскольку, как можно было ожидать, применение природной трансмембранной области IgG1, а не гетерологичной трансмембранной области, должно было являться наиболее эффективным для экспонирования IgG1 на мембране клетки. Предпочтительно, трансмембранная область, применяемая в экспрессирующей конструкции согласно настоящему изобретению, содержит трансмембранную область, которая выбрана из группы, включающей трансмембранную область гена рецептора фактора роста тромбоцитов человека (PDGFR), асиалогликопротеинового рецептора человека, B7-1 человека и мыши, ICAM-1 человека, erbb1 человека, erbb2 человека, erbb3 человека, erbb4 человека, рецепторов фактора роста фибробластов человека, таких как FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, VEGFR-1 человека, VEGFR-2 человека, рецептора эритропоэтина человека, PRL-R человека, рецептора пролактина, EphA1 человека, рецептора 1 эфрина типа A, рецепторов инсулина, IGF-1 человека, рецептороподобных тирозинфосфатаз белков человека, нейропиллина человека, главного комплекса гистосовместимости класса II человека (альфа и бета цепи), интегринов человека (семейства альфа и бета), синдеканов человека, белка миелина человека, кадгерин человека, синаптобревина-2 человека, гликофорина-A человека, Vnpr3 человека, APP человека, белка-предшественника амилоида, рецептора Т-клеток альфа (PTCRA) и рецептора Т-клеток бета человека, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 дзета и CD3 эпсилон. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения трансмембранная область, используемая в настоящем изобретении, выбрана из группы, включающей трансмембранную область B7-1 человека, трансмембранную область B7-1 мыши, трансмембранную область PDGFR, трансмембранную область асиалогликопротеинового рецептора человека и трансмембранную область erbb-2. Более предпочтительной является трансмембранная область B7-1 мыши, представленная в SEQ ID NO: 66.

Дополнительные модификации для изменения соотношения сплайсинга количества секретируемого полипептида по сравнению с полипептидом, экспонированным на мембране, включают изменение количества пиримидиновых оснований в полипиримидиновом (поли(Y)) участке "выше по течению" от экзона, кодирующего трансмембранную область, и/или модификацию консенсусных последовательностей донора и акцептора сплайсинга. Уменьшение количества пиримидиновых оснований (Y), как было продемонстрировано в примере 3, вызывает смещение соотношения сплайсинга в сторону секретируемого белка. Если в конструкцию не включены пиримидиновые основания, поверхностная экспрессия белка, представляющего интерес, отсутствует. Такой механизм для смещения соотношения сплайсинга от экспрессии на мембране клетки может быть полезным для белка, который экспрессируется строго на мембране клетки, но демонстрирует более слабую экспрессию растворимой формы. Количество пиримидиновых оснований в поли(Y)-участке может составлять от 0 до 30 оснований. Предпочтительно, поли(Y)-участок содержит 20 пиримидиновых оснований или менее, более предпочтительно, 15 оснований или менее, еще более предпочтительно, 10 оснований или менее.

Поскольку увеличение количества экспонированного на мембране белка может оказывать отрицательное влияние на титры растворимого полипептида, авторы настоящего изобретения разработали модификации в экспрессирующей конструкции, способные увеличить экспрессию растворимого полипептида в клетке-хозяине без влияния на количество экспонированного на мембране полипептида. Было обнаружено, что добавление поли(А)-сайта в интрон увеличивает титр растворимого полипептида максимум на 50% (для трансмембранной области M1M2), и при этом поддерживает достаточный уровень экспонирования на мембране клетки. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения поли(А)-сайт расположен в интроне экспрессирующей конструкции.

Согласно аспекту настоящего изобретения экспрессирующая конструкция является подходящей для мультимеров полипептидов и белков, например, антители или фрагментов антители, либо биспецифичных антители или фрагментов биспецифичных антители.

Термин "антитело" в настоящей заявке включает целые антитела и любые антиген-связывающие фрагменты или отдельные цепи антител. "Антитело" означает гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные дисульфидными связями, или антиген-связывающий фрагмент указанного гликопротеина. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящей заявке VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящей заявке VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL можно далее разделить на области гиперпеременности, называемые областями, определяющими комплементарность (complementarity determining regions, CDR), последовательность которых является гиперпеременной и/или которые вовлечены в распознавание антигена и/или обычно образуют структурно определенные петли, разделенные областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (framework regions, FR или FW). Каждая VH и VL содержит три CDR и четыре FW, расположенные от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. В настоящей заявке аминокислотные последовательности FW1, FW2, FW3 и FW4 все вместе образуют "область, отличную от CDR", или "область, отличную от протяженной CDR", VH или VL.

Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антитела могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Антитела разделяют на классы, также называемые изотипами, которые определяются генетическим образом константной областью. Константные области легких цепей человека подразделяют на легкие цепи каппа (Cκ) и лямбда (Cλ). Тяжелые цепи, которые подразделяют на мю (μ), дельта (δ), гамма (γ), альфа (α) или эпсилон (ε), определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. В терапевтических целях наиболее широко используют класс IgG. У людей данный класс содержит подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Термин "Fab" или "область Fab" в настоящей заявке включает полипептиды, которые содержат домены иммуноглобулина VH, CH1, VL и CL. Fab может означать данную область саму по себе или данную область в контексте полноразмерного антитела либо фрагмента антитела.

Термин "Fc" или "Fc-область" в настоящей заявке включает полипептид, содержащий константную область антитела, за исключением первого домена константной области иммуноглобулина. Таким образом, Fc означает последние два домена константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и последние три домена константной области иммуноглобулина IgE и IgM, а также подвижный шарнир, расположенный с N-конца относительно данных доменов. В случае IgA и IgM Fc может содержать цепь J. В случае IgG Fc содержит домены иммуноглобулина C гамма 2 и C гамма 3 (Cγ2 и Cγ3) и шарнир между C гамма 1 (Cγ1) и C гамма 2 (Cγ2). Несмотря на то что границы Fc-области могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяют в промежутке от остатка C226 или P230 до карбоксильного конца, где нумерация приведена в соответствии с системой нумерации EU. В случае IgG1 человека Fc-области определены в настоящей заявке в промежутке от остатка P232 до карбоксильного конца, где нумерация приведена в соответствии с системой нумерации EU (Edelman G.M. et al., (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. США, 63(1): 78-85). Fc может означать данную область саму по себе или данную область в контексте Fc полипептида, например антитела.

Термин "полноразмерное антитело" в настоящей заявке включает структуру, которая образует природную биологическую форму антитела, включая переменную и константную области. Например, у большинства млекопитающих, в том числе человека и мышей, полноразмерное антитело класса IgG представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар двух цепей иммуноглобулина, причем каждая пара содержит одну легкую и одну тяжелую цепи, и каждая легкая цепь содержит домены иммуноглобулина VL и CL, а каждая тяжелая цепь содержит домены иммуноглобулина VH, CH1 (C1), CH2 (C2) и CH3 (C3). У некоторых млекопитающих, например у верблюдов и лам, антитела IgG могут состоять лишь из двух тяжелых цепей, причем каждая тяжелая цепь содержит переменный домен, присоединенный к Fc-области.

Фрагменты антитела включают, но не ограничены указанными, (i) Fab-фрагмент, содержащий домены VL, VH, CL и CH1, включая Fab' и Fab'-SH, (ii) Fd-фрагмент, содержащий домены VH и CH1, (iii) Fv-фрагмент, содержащий домены VL и VH отдельного антитела; (iv) dAb-фрагмент (Ward E.S. et al., (1989) Nature, 341: 544-546), который содержит один переменный домен; (v) F(ab')₂-фрагменты, бивалентный фрагмент, содержащий два связанных Fab-фрагмента; (vi) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), в которых домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, позволяющим двум доменам объединяться с образованием антиген-связывающего сайта (Bird R.E. et al., (1988) Science 242: 423-426; Huston J.S. et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. США, 85: 5879-83); (vii) биспецифичные одноцепочечные Fv-димеры (PCT/US92/09965); (viii) "диатела" или "триатела", мультивалентные или мультиспецифичные

фрагменты, сконструированные в результате слияния генов (Tomlinson I. & Hollinger P. (2000) *Methods Enzymol.* 326: 461-79; WO 94/13804; Holliger P. et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-48); и (ix) scFv, слитый генетическим способом с тем же или отличным антителом (Coloma M.J. & Morrison S.L. (1997) *Nature Biotech.*, 15(2): 159-163).

Антитела и фрагменты антител, которые можно экспрессировать посредством экспрессирующей конструкции, описанной в настоящей заявке, могут связываться с антигеном, который выбран из группы, включающей: AXL, Bcl2, HER2, HER3, EGF, EGFR, VEGF, VEGFR, IGFR, PD-1, PD-1L, BTLA, CTLA-4, GITR, mTOR, CS1, CD3, CD16, CD16a, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD28, CD30, CD32b, CD33, CD38, CD40, CD52, CD64, CD79, CD89, CD137, CD138, CA125, cMet, CCR6, MUC1, антиген PЕМ, Еp-CAM, EphA2, 17-1a, CEA, AFP, HLA класса II, HLA-DR, HSG, IgE, ИЛ-12, ИЛ-17a, ИЛ-18, ИЛ-23, ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, GD2-ганглиозид, MCSP, NG2, антиген SK-I, Lag3, PAR2, PDGFR, PSMA, Tim3, TF, CTLA4, TL1A, TIGIT, SIRPa, ICOS, Trem12, NCR3, HVEM, OX40, VLA-2 и 4-1BB.

Биспецифичные или гетеродимерные антитела уже в течение многих лет являются доступными в данной области техники. Однако получение таких антител часто сопряжено с присутствием неправильно спаренных побочных продуктов, которые значительно уменьшают выход продукции желаемого биспецифичного антитела и требуют сложных процедур очистки для обеспечения гомогенности продукта. Нарушение спаривания тяжелых цепей иммуноглобулина можно уменьшить посредством применения нескольких стратегий конструктивной разработки, в ходе большинства из которых конструируют тяжелые цепи антитела для гетеродимеризации посредством разработки созданных человеком комплементарных гетеродимерных поверхностей контакта между двумя субъединицами гомодимера домена CH3. Первое сообщение о сконструированной паре гетеродимерного домена CH3 было обнародовано Carter с соавт., которые описали подход "протуберанец-в-полость" ("protuberance-into-cavity") для получения гетеродимерной группы Fc (US 5807706; "выступы-во-впадины" ("knobs-into-holes")); Merchant A.M. et al., (1998) *Nat. Biotechnol.*, 16(7):677-81). Недавно были разработаны альтернативные конструкции, которые включали конструирование новой пары модулей CH3 посредством модификации базовой структуры модулей, как описано в международной заявке WO 2007110205, или конструирование комплементарных солевых мостиков между модулями, как описано в международных заявках WO 2007147901 или WO 2009089004. Недостаток стратегий конструирования CH3 заключается в том, что данные методики все еще приводят к образованию значительного количества нежелательных гомодимеров. Более предпочтительная методика получения биспецифичных антител, в которой получают преимущественно гетеродимеры, описана в публикации РСТ № WO 2012/131555. Биспецифичные антитела можно наработать против множества мишеней, например мишени, расположенной на опухолевых клетках, и/или мишени, расположенной на эффекторных клетках.

Предпочтительно, биспецифичное антитело может связываться с двумя мишенями, которые выбраны из группы, включающей: AXL, Bcl2, HER2, HER3, EGF, EGFR, VEGF, VEGFR, IGFR, PD-1, PD-1L, BTLA, CTLA-4, GITR, mTOR, CS1, CD3, CD16, CD16a, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD28, CD30, CD32b, CD33, CD38, CD40, CD52, CD64, CD79, CD89, CD137, CD138, CA125, cMet, CCR6, MUC1, антиген PЕМ, Еp-CAM, EphA2, 17-1a, CEA, AFP, HLA класса II, HLA-DR, HSG, IgE, ИЛ-12, ИЛ-17a, ИЛ-18, ИЛ-23, ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, GD2-ганглиозид, MCSP, NG2, антиген SK-I, Lag3, PAR2, PDGFR, PSMA, Tim3, TF, CTLA4, TL1A, TIGIT, SIRPa, ICOS, Trem12, NCR3, HVEM, OX40, VLA-2 и 4-1BB.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая экспрессирующую конструкцию или вектор экспрессии, описанные выше. Клетка-хозяин может представлять собой клетку человека или клетку, отличную от клетки человека. Обычно клетка-хозяин выбрана из группы, включающей клетку млекопитающих, клетку насекомых и клетку дрожжей. Предпочтительные клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих. Предпочтительные примеры клеток-хозяев млекопитающих включают, без ограничения, эмбриональные клетки почек человека (Graham F.L. et al., (1977) *J. Gen. Virol.* 36: 59-74), фибробласты MRC5 человека, клетки меланомы человека 983M, клетки почек собаки MDCK, культивируемые фибробласты легких крысы RF, выделенные из крыс Спрэг-Дули, клетки меланомы мыши B16BL6, клетки мастоцитомы мыши P815, клетки аденокарциномы молочной железы MT1 A2 мыши, клетки PER:C6 (Leiden, Нидерланды) и клетки или клеточные линии яичников китайского хомячка (CHO) (Puck T.T. et al., (1958), *J. Exp. Med.* 108: 945-955).

Согласно в особенности предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку или клеточную линию яичников китайского хомячка (CHO). Подходящие клеточные линии CHO включают, например, CHO-S (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), CHO K1 (ATCC CCL-61), CHO pro3-, CHO DG44, CHO P12 или клеточную линию CHO DUK-BII dhfr⁻ (Urlaub G & Chasin LA (1980) *PNAS* 77(7): 4216-4220), DUXBII (Simonsen CC & Levinson AD (1983) *PNAS* 80(9): 2495-2499) или CHO-K1SV (Lonza, Базель, Швейцария).

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложен способ отбора клетки-хозяина, экспрессирующей полипептид, представляющий интерес, причем указанный способ включает трансфекцию клетки-хозяина экспрессирующей конструкцией или вектором экспрессии, описанными выше, культивирование клетки-хозяина, обнаружение экспрессии полипептида, представляющего интерес, на мембране клетки, и отбор клона клетки-хозяина с желаемой экспрессией на мембране клетки. На следующем

этапе полипептид, представляющий интерес, можно восстановить из клетки-хозяина. Полипептид представляет собой предпочтительно гетерологичный полипептид, более предпочтительно, полипептид человека. Как показано в примерах, уровень экспрессии полипептида, представляющего интерес, на мембране клетки прямо пропорционален уровню экспрессии растворимого полипептида. Вследствие этого данный подход делает возможным проведение количественного отбора клона клетки-хозяина, экспрессирующего высокие уровни полипептида, представляющего интерес.

Согласно предпочтительному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ *in vitro* для отбора клетки-хозяина, экспрессирующей мультимерный белок, предпочтительно гетеродимерное антитело, посредством трансфекции клетки-хозяина экспрессирующими конструкциями или векторами экспрессии, описанными выше, культивирования клетки-хозяина, обнаружения экспрессии мультимерного белка, представляющего интерес, на мембране клетки, и отбора клона клетки-хозяина с желаемой экспрессией на мембране клетки. На следующем этапе мультимерный белок, представляющий интерес, например гетеродимерное антитело, можно восстановить из клетки-хозяина. Как показано в примерах, можно легко отобрать клетку-хозяина, которая демонстрирует больше гетеродимерного антитела по сравнению с нежелательными формами гомодимерного антитела, т.е. обеспечить качественный отбор клона клетки-хозяина.

Для трансфекции клетки-хозяина экспрессирующей конструкцией или вектором экспрессии согласно настоящему изобретению можно применять любую методику трансфекции, такую как методики, хорошо известные в данной области техники для данного типа клетки-хозяина, например электропорацию, копреципитацию с фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную катионным полимером, липофекцию, при необходимости. Следует отметить, что клетку-хозяин, трансфицированную экспрессирующей конструкцией или вектором экспрессии согласно настоящему изобретению, конструируют в форме временно или стабильно трансфицированной клеточной линии. Таким образом, согласно настоящему изобретению экспрессирующая конструкция или вектор экспрессии согласно настоящему изобретению могут поддерживаться эпизодически, т.е. являться временно трансфицированными, либо могут быть стабильно интегрированными в геном клетки-хозяина, т.е. являться стабильно трансфицированными.

Временная трансфекция характеризуется неприменимостью любого давления отбора для вектора, несущего селективный маркер. В экспериментах по временной экспрессии, которые обычно длятся от двух до десяти дней после трансфекции, трансфицированная экспрессирующая конструкция или вектор экспрессии поддерживаются в форме эпизодических элементов и уже не являются интегрированными в геном. Иными словами, трансфицирующая ДНК обычно не интегрируется в геном клетки-хозяина. Клетки-хозяева имеют тенденцию утрачивать трансфицирующую ДНК, и клетки, утратившие трансфицирующую ДНК, склонны расти быстрее трансфицированных клеток в популяции после культивирования пула временно трансфицированных клеток. Вследствие этого экспрессия является наибольшей в период сразу после трансфекции и уменьшается со временем. Предпочтительно, временный трансфектант согласно настоящему изобретению означает клетку, которая поддерживается в культуре клеток при отсутствии давления отбора в течение периода времени от двух до десяти дней после трансфекции.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения клетка-хозяин, например клетка-хозяин СНО, стабильно трансфицирована экспрессирующей конструкцией или вектором экспрессии согласно настоящему изобретению. Стабильная трансфекция означает, что вновь введенная чужеродная ДНК, такая как вектор ДНК, становится встроенной в геномную ДНК, обычно в результате случайных событий негомологичной рекомбинации. Количество копий вектора ДНК и сопутствующее количество продукта гена можно увеличить посредством отбора клеточных линий, в которых последовательности вектора были амплифицированы после встраивания в ДНК клетки-хозяина. Вследствие этого возможно, что такое стабильное встраивание после воздействия последующего увеличения давления отбора для амплификации гена является причиной появления в клетках СНО двойных микрохромосом. Более того, стабильная трансфекция может привести к утрате частей последовательности вектора, непосредственно не связанных с экспрессией рекомбинантного продукта гена, таких как, например, бактериальные области контроля количества копий, которые становятся излишними после встраивания в геном. Следовательно, трансфицированная клетка-хозяин интегрировала по меньшей мере часть или различные части экспрессирующей конструкции или вектора экспрессии в геном.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложено применение экспрессирующей конструкции или вектора экспрессии, описанных выше, для экспрессии гетерологичного полипептида в клетке-хозяине млекопитающих, в частности применение экспрессирующей конструкции или вектора экспрессии, описанных выше, для экспрессии гетерологичного полипептида *in vitro* в клетке-хозяине млекопитающих. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения экспрессирующие конструкции или векторы экспрессии, описанные выше, используют для экспрессии гетеродимерного антитела *in vitro* в клетке-хозяине млекопитающих.

Экспрессирующую конструкцию, описанную в настоящем изобретении, можно использовать в способе для отбора рекомбинантной клетки-хозяина, экспрессирующей полипептид или белок, представляющий интерес. Предпочтительно, белок, представляющий интерес, представляет собой антитело. Указанный способ включает:

(i) котрансфекцию клетки-хозяина:

(a) экспрессирующей конструкцией, содержащей в направлении от 5' к 3': промотор; экзон, кодирующий тяжелую цепь антитела;

донорный сайт сплайсинга, интрон и акцепторный сайт сплайсинга, причем первый стоп-кодон расположен между донорным сайтом сплайсинга и акцепторным сайтом сплайсинга в пределах указанного интрона;

второй экзон, кодирующий трансмембранную область, которая выбрана из модифицированной трансмембранной области иммуноглобулина или модифицированной или немодифицированной трансмембранной области, отличной от трансмембранной области иммуноглобулина;

второй стоп-кодон; и

поли(А)-сайт,

(b) экспрессирующей конструкцией, кодирующей легкую цепь антитела,

(ii) культивирование трансфицированной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела;

(iii) обнаружение экспрессии антитела на клеточной мембране; и (iv) отбор клетки-хозяина, экспонирующей антитело на поверхности мембраны клетки.

Более того, подробно описанный способ можно использовать для отбора рекомбинантной клетки-хозяина, экспрессирующей биспецифичное антитело, причем клетку-хозяина котрансфицируют третьей экспрессирующей конструкцией, кодирующей scFv-Fc, или третьей экспрессирующей конструкцией, кодирующей scFv-Fc, со сплайсингом трансмембранной области, отличной от трансмембранной области иммуноглобулина, такой как трансмембранная область B7-1 мыши.

Отбор желаемой клетки-хозяина можно проводить согласно способам, известным в данной области техники. Такие способы включают флуоресценцию, ELISA, вестернблоттинг, электрофорез в полиакриламидном геле с ДСН (додецилсульфатом натрия), радиоиммуноанализ или применение антител или специфичных молекул, таких как аптамеры, которые распознают белок, представляющий интерес, и связываются с ним. Предпочтительно, белок, представляющий интерес, экспонированный на мембране клетки-хозяина, обнаруживают с применением флуоресцентного зонда или присоединяют к флуоресцентной метке, что позволяет проводить отбор с применением метода сортировки флуоресцентно-активированных клеток (fluorescence activated cell sorting, FACS).

Экспрессию и восстановление белка можно проводить согласно способам, известным специалисту в данной области техники.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложено применение экспрессирующей конструкции или вектора экспрессии, описанных выше, для получения лекарственного препарата для лечения нарушения.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложена экспрессирующая конструкция или вектор экспрессии, описанные выше, для применения в качестве лекарственного препарата для лечения нарушения.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложена экспрессирующая конструкция или вектор экспрессии, описанные выше, для применения в генной терапии.

Примеры

Пример 1. Клонирование векторов.

Введение.

Конструкции на основе альтернативного сплайсинга, которые были получены, содержали последовательность донора сплайсинга гена *ighg1* человека. Интроны (содержащие акцепторный сайт сплайсинга) были получены из интрона 4 cTNT курицы, тогда как экзон был получен из трансмембранной области гена *ighg1* (далее обозначается M1M2), трансмембранной области рецептора Т-клеток альфа (PTCRA) или гена B7-1 мыши. В нескольких конструкциях трансмембранный домен B7-1 мыши заменяли другими трансмембранными доменами, в том числе существующими в природе трансмембранными доменами и их модификациями. Более того, цитозольный хвост B7-1 в трансмембранной области B7-1 заменяли несколькими другими цитозольными хвостами с сигналом экспорта из ЭР или без такового.

Для экспрессии полноразмерного антитела формата IgG1 или IgG4 была необходима одновременная экспрессия тяжелой и легкой цепей. Все субъединицы экспрессировали с применением отдельных плазмид с помощью стратегии котрансфекции. Конструкцию на основе альтернативного сплайсинга использовали для экспрессии тяжелой цепи IgG1 или IgG4. Легкую цепь IgG1 или IgG4 клонировали в тот же скелет вектора экспрессии, но без альтернативного сплайсинга.

Для экспрессии форматов биспецифичного антитела собственной разработки (технология BEAT®; описана в международной заявке WO 2012/131555) клетки следовало трансфицировать тремя различными субъединицами: тяжелой цепью, легкой цепью и scFv-Fc. С целью оценки наилучшей стратегии для экспонирования на мембране формата биспецифичного антитела сплайсированные и альтернативно сплайсированные конструкции клонировали для экспрессии тяжелой цепи и scFv-Fc. Легкую цепь клонировали в тот же скелет вектора экспрессии, но без альтернативного сплайсинга.

В табл. 1 обобщены все конструкции, полученные в данном примере.

Таблица 1. Сводная информация обо всех полученных конструкциях (*)

Название плазмиды	Номер серии плазмиды	SEQ ID NO последовательности ДНК	SEQ ID NO последовательности белка
pGLEX41_IgG4-HC	GSB59	79	126
pGLEX41_HC	GSC314	48	286
pGLEX41_LC	GSC315	294	295
pGLEX41_IgG4-LC	GSC3704	319	320
pGLEX41_HC-AS	GSC3836	287	288
pGLEX41_HC-сTNTintron4	GSC3848	289	288
pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2	GSC3899	36	290
pGLEX41_HC-I4(0Y)-M1M2-M1M2-M1M2	GSC4398	37	290
pGLEX41_HC-I4(poly A)-M1M2-M1M2-M1M2	GSC4401	38	290
pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2-SV40ter	GSC4402	39	290
pGLEX41_BEAT-HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2	GSC5537	50	299
pGLEX41_scFv-Fc-I4-M1M2-M1M2-M1M2	GSC5538	52	301
pGLEX41_BEAT-LC	GSC5540	302	303
pGLEX41_BEAT-HC-His	GSC5607	296	297
pGLEX41_scFv-Fc	GSC5608	51	300
pGLEX41_BEAT-HC	GSC5644	49	298
pGLEX41_HC-I4-PTCRA	GSC5854	40	291
pGLEX41_HC-I4(0Y)-PTCRA	GSC5855	41	291
pGLEX41_HC-I4-PTCRA-SV40ter	GSC5856	43	291
pGLEX41_HC-I4(poly A)-PTCRA	GSC5857	42	291
pGLEX41_HC-I4-M1M2-PTCRA-M1M2	GSC6030	44	292
pGLEX41_HC-I4-M1M2-PTCRA-M1M2-SV40ter	GSC6046	47	292
pGLEX41_HC-I4(poly A)-M1M2-PTCRA-M1M2	GSC6047	46	292
pGLEX41_HC-I4(0Y)-M1M2-PTCRA-M1M2	GSC6048	45	292
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7	GSC7056	55	293
pGLEX41_HC-I4(0Y)-B7-B7-B7	GSC7057	53	293
pGLEX41_HC-I4(poly A)-B7-B7-B7	GSC7058	54	293
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7-SV40ter	GSC7059	56	293

pGLEX41_HC-I4(5Y)-I4-B7-B7-B7	GSC9763	61	293
pGLEX41_HC-SD_CCC-I4-B7-B7-B7	GSC9764	58	293
pGLEX41_HC-SD_GGC-I4-B7-B7-B7	GSC9765	57	293
pGLEX41_HC-I4(5Y-5)-I4-B7-B7-B7	GSC9768	60	293
pGLEX41_HC-I4(3Y)-I4-B7-B7-B7	GSC9770	62	293
pGLEX41_HC-I4(9Y)-I4-B7-B7-B7	GSC9949	59	293
pGLEX41_HC-I4(15Y-3')-I4-B7-B7-B7	GSC9950	63	293
pGLEX41_scFv-Fc-I4-B7-B7-B7	GSC10487	323	324
pGLEX41_BEAT-HC-I4-B7-B7-B7	GSC10488	321	322
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_K13V-B7	GSC11203	95	142
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA-B7	GSC11204	93	140
pGLEX41_HC-I4-B7-PTPMR-B7	GSC11205	84	131
pGLEX41_HC-I4-M1M2-PTCRA-M1M2_version 1	GSC11206	284	285
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-6His	GSC11207	112	159
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_K13V_D18V-B7	GSC11208	99	146
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-KCFCK	GSC11209	113	160
pGLEX41_HC-I4-B7-CD4-B7	GSC11210	83	130
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_D18V-B7	GSC11211	96	143
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V_K13V-B7	GSC11212	97	144
pGLEX41_HC-I4-B7-ACVL1-B7	GSC11213	81	128
pGLEX41_HC-I4-B7-ANTR2-B7	GSC11214	82	129
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V-B7	GSC11216	94	141
pGLEX41_HC-I4-B7-TNR5-B7	GSC11217	85	132
pGLEX41_IgG4-HC-B7-B7-B7	GSC11218	80	127
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V_K13V_D18V-B7	GSC11291	100	147
pGLEX41_HC-I4-B7-B7(26)-B7	GSC11292	111	158
pGLEX41_HC-I4-B7-IGF1R-B7	GSC11295	88	135
pGLEX41_HC-I4-B7-1B07-B7	GSC11296	87	134
pGLEX41_HC-I4-B7-FCERA-B7	GSC11297	101	148
pGLEX41_HC-I4-B7-KI2L2-B7	GSC11298	102	149
pGLEX41_HC-I4-B7-M1M2-B7	GSC11389	107	154
pGLEX41_HC-I4-B7-TRBM-B7	GSC11390	89	136
pGLEX41_HC-I4-B7-IL4RA-B7	GSC11391	90	137
pGLEX41_HC-I4-B7-LRP6-B7	GSC11392	91	138
pGLEX41_HC-I4-B7-IL3RB-B7	GSC11393	103	150
pGLEX41_HC-I4-B7-CD3E-B7	GSC11394	104	151
pGLEX41_HC-I4-B7-ITA2B-B7	GSC11395	105	152
pGLEX41_HC-I4-B7-CD28-B7	GSC11396	106	153

pGLEX41_HC-I4-B7-GpA-B7	GSC11397	92	139
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V_D18V-B7	GSC11398	98	145
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-GAT1noER	GSC11483	118	165
pGLEX41_HC-I4-B7-B7(24)-B7	GSC11484	110	157
pGLEX41_HC-I4-B7-B7(18)-B7	GSC11677	108	155
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-ERGIC53_noER	GSC11678	116	163
pGLEX41_HC-I4-B7-B7(20)-B7	GSC11679	109	156
pGLEX41_HC-I4-B7-ITB1-B7	GSC11756	86	133
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-MIM2	GSC11758	114	161
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-GAT1	GSC11759	117	164
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-AGTR2	GSC11760	119	166
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-AGTR2_noER	GSC11761	120	167
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-V1BR	GSC11762	121	168
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-VGLG_noER	GSC11763	124	171
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-ERGIC53	GSC11764	115	162
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-V1BR_noER	GSC11765	122	169
pGLEX41_HC-I4-B7-B7-VGLG	GSC11766	123	170
pGLEX41_HC-I4-MIM2-MIM2-B7	GSC11294	125	172

*В последовательности приведены протяженности от последних 5 аминокислот несплайсируемой ОРС до конца экспрессирующей конструкции для последовательностей ДНК и от тех же аминокислот до конца слитой трансмембранной области для последовательностей белка, за исключением GSC314 (SEQ ID NO: 48), GSC315 (SEQ ID NO: 294), GSC5607 (SEQ ID NO: 296), GSC5644 (SEQ ID NO: 49), GSC5608 (SEQ ID NO: 51), GSC5540 (SEQ ID NO: 302), GSB59 (SEQ ID NO: 79) (полная последовательность ОРС).

Материалы и методы.

Культуральные планшеты LB 500 мл воды перемешивали и кипятили с 16 г агаром LB (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) (1 литр LB содержит 10 г триптона, 5 г экстракта дрожжей и 10 г NaCl). После охлаждения в раствор добавляли соответствующий антибиотик, и раствор заливали в планшеты (планшеты с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл и планшеты с канамицином в концентрации 50 мкг/мл).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Все ПЦР проводили с применением 1 л ДНТФ (10 мМ для каждого ДНТФ; Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), 2 единиц ДНК-полимеразы Phusion® (Finnzymes Oy, Эспоо, Финляндия), 25 нмоль Праймера А (Microsynth, Бальгах, Швейцария или Operon, Эберсберг, Германия), 25 нмоль Праймера В (Microsynth, Бальгах, Швейцария или Operon, Эберсберг, Германия), 10 мкл 5X буфера HF (7,5 мМ MgCl₂, Finnzymes, Эспоо, Финляндия), 1,5 мкл диметилсульфоксида (DMSO, Finnzymes, Эспоо, Финляндия) и 1-3 мкл матрицы (10-20 нг) в 50 мкл конечного объема. Все использованные праймеры приведены в табл. 2.

ПЦР запускали начальной денатурацией при температуре 98°C в течение 3 мин, за которой следовали 35 циклов денатурации по 30 с при температуре 98°C, 30 с отжига при праймер-специфичной температуре (в зависимости от содержания GC) и элонгация в течение 2 мин при температуре 72°C. Конечную элонгацию проводили при температуре 72°C в течение 10 мин, после чего образцы охлаждали и хранили при температуре 4°C.

Таблица 2. Сводная информация о праймерах, использованных для ПЦР. Праймеры были получены от Orogen (Эберсберг, Германия) или от Microsynth (Бальгах, Швейцария)

Название праймера	Последовательность праймера	SEQ ID NO
GlnPr269	CAGGGGGGCGGAGCCTATGG	1
GlnPr497	GCCCCCTCCGCGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG	2
GlnPr498	TTTCTAGATTCATCACTTGCCGGGGGACAGGCTC	3
GlnPr501	TATAAAGCTTCCACCATGGAGAGCCCTGCCC	4
GlnPr502	TATATCTAGATTCATCAGCACTCGCCCCGGTTG	5
GlnPr1285	CGGAAGAATTCAGCCACAGCTTTAAGGCACCTGGCTAAC	259
GlnPr1437	CCAAATCGATTTATCAGCACTCGCCCCGGTTGAAG	6
GlnPr1452	ACGTATCGATTCATCACTTGCCGGGGGACAG	327
GlnPr1487	CTGCTGCTGTGGCTGCCCCGACGGGGTGCACGCTGAGATCGTGCTGAC ACAGAG	325
GlnPr1488	CTGCTGCTGTGGCTGCCCCGACGGGGTGCACGCTCAGGTCACACTGAA AGAGTC	328
GlnPr1491	CCAAATCGATTTATCAGCACTCGCCCCGGTTGAAG	326
GlnPr1494	ACGAACTAGTCCACCATGGAAAAGCCAGCCAGCTGCTGTTCTGCT GCTGCTGTGGCTGCCCCGAC	260
GlnPr1500	CCGGGATCGATTTATCAGTGATGGTGATGGTGATG	7

GlnPr1502	GGCCGATCGATTTATCACTTGCCAGGAGACAG	8
GlnPr1516	GATGAAAGCTTGGTAGGTGATCCTCCTG	9
GlnPr1517	ATGTATTCTGAATATCTCCACCGTTGCAGCTCTGAGCCAGGGAGGAG GGAAG	10
GlnPr1518	TAAGCTAGCCCACCATGGAGAGCCCTGC	11
GlnPr1519	GAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGGTTGTGCAAGGCCTCGTGCATCACGC TG	12
GlnPr1520	CTACCAAGCTTTCATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTG CGTG	13
GlnPr1521	GGGAGCTGGACGGGCTGTGGACGACCATCACCATCTTCATCACACTC TTCTGTTAAGCGTGTGCTACAGTGCCACCGTCACCTTCTTCAAG	14
GlnPr1522	GTAGTCGGGGATGATGGTCTGCTTCAGGTCCACCACCGAGGAGAAG ATCCACTTCACCTTGAAGAAGGTGACGGTGGCACTGTAGCACACGC	15
GlnPr1523	ATATACCGGTGGAGAGCTGTGCGGAGGCGCAGGACGGGGAGCTGGA CGGGCTGTG	16
GlnPr1524	ATATTTCTGAATCACTAGGCCCCCTGTCCGATCATGTTCTGTAGTCG GGGATGATGGTC	17
GlnPr1649	TCTCCACCGTTGCAGCTCTGTTCCCTCCTCCCTCGGTTAG	18
GlnPr1650	GCGCCATCGATACAGACATGATAAGATACATTG	19
GlnPr1651	GCGCGATCGATACTTGTTATTGCAGCTTATAATGG	20
GlnPr1689	ATATGCTAGCCCACCATGCGGAGCCCTGCCAGCTGCTGTTCTGCT GCTGCTG	21
GlnPr1690	TGCTGTTCTGCTGCTGCTGTGGATCCCTGGCACCAACGCCGAGGTG CAGCTGGTCGAGTC	22
GlnPr1725	ATATACTAGTCCACCATGCGGAGCCCTGCCAGCTGCTGTTCTGCT GCTGCTG	23
GlnPr1726	CTGTTCTGCTGCTGCTGTGGATCCCTGGCACCAACGCCAGGTGCA GCTGCAGCAGTC	24
GlnPr1727	CTGTTCTGCTGCTGCTGTGGATCCCTGGCACCAACGCCATGGAGAC AGACACACTCC	25
GlnPr1735	GACTTCGAATCATCAATGATGGTGGTGGTGATGGGCGCTGGCGAGG AGCAGGTCTGAACAGGAGCAGCTTG	26
GlnPr1760	CCGCATCGATTTATCATTTACCCGGGCTCAGGCTCAG	27
GlnPr1799	ATATACCGGTGGAGGCCCTGTGGCTGGGCGTGCTGAGACTGCTGCTG TTCAAGCTGCTCCTGTTTCGACCTG	28
GlnPr1800	GTAAGCTTTCATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGCGT GAATCGGTTGTGC	29
GlnPr1801	GCGCGAAGCTTTCATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTG CGTATAATGATTG	30
GlnPr1840	ATATACCGGTGGAGGCCCTGTGGCTGGGCGTGCTG	31
GlnPr2099	TCCTCGGGGGGAGATCCACCACCACCTGAGCCAGGGAGGAGGGAAG	32
GlnPr2100	GCGCTTCGAATCATCACAGAAACACGGTCTG	33
GlnPr2101	TGGTGGTGGATCTCCCCCGAGGACCCCCCTGACTCCAAG	34
GlnPr2102	TCCTCGGGGGGAGATCCACCACCACCTGTTCCCTCCTCCCTCGGTTA G	35

GlnPr2160	CCAAGCTTTCATCATTTGCCCGGAGACAGGGAGAGG	312
GlnPr2161	CCAAGCTTTCATCATTTACCGGGAGACAGGGAGAGGCTCTTC	313
GlnPr2162	GTCCTCGGGGGGAGATCCACCACCACCTGTCCCAGAAGGAGACGGT TAG	314
GlnPr2163	GTCCTCGGGGGGAGATCCACCACCACCTGTGCAATCCTCCCAGGGTT AG	315
GlnPr2164	GTCCTCGGGGGGAGATCCACCACCACCTGTGCAATAAGGACAGGGT TAG	316
GlnPr2165	GTCCTCGGGGGGAGATCCACCACCACCTGTCCCCTCAGGTCTCGGTT AG	317
GlnPr2166	GTCCTCGGGGGGAGATCCACCACCACCTGAGCCAGGTAGCAGGGAA GGG	318
GlnPr2294	CTACCAAGCTTTCATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTG CGTGTAGTGGTTGTGCAAGGCCTCG	261
GlnPr2376	GGCCGTTTGAATCATCACTTGCAGAAGCACTTGATAATC	219
GlnPr2377	GTCATTTTGAATCATCAATGATGGTGGTGGTGTGGGCGCTGGCGAT AATCACGACGATCACGAC	220
GlnPr2378	TTGAACAGCAGCAGTCTCAGCACGCCCAGCCACAGGGCCCCGTCCA GCTCCCCGTCTG	221
GlnPr2379	CTGAGACTGCTGCTGTCAAGCTGCTCCTGTTTCGACCTGCTCCTCAA GTGGATCTTCTCCTCGGTG	222
GlnPr2380	GCTTGAACAGCAGCAGTCTCAGCACGCCCAGCCACAGGGCATTCTT GGAGTCAGGGGGGTCTCTC	223
GlnPr2381	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGAGGAGCAGGTGCAACAGGA GCAGCTTGAACAGCAGCAGTCTC	224
GlnPr2382	GCTTGAACAGCAGCAGTACCAGCACGCCCAGCCACAGGGCATTCTT GGAGTCAGGGGGGTCTCTC	225
GlnPr2383	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGAGGAGCAGGTGCAACAGGA GCAGCTTGAACAGCAGCAGTACC	226
GlnPr2384	GACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGAGGAGCAGGTGCAACAGGAGCA GCACGAACAGCAGCAGTCTC	227
GlnPr2385	GACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGAGGAGCAGGACGAACAGGAGCA GCTTGAACAGCAGCAGTCTC	228
GlnPr2386	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGAGGAGCAGGTGCAACAGGA GCAGCACGAACAGCAGCAGTACC	229
GlnPr2387	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGAGGAGCAGGACGAACAGGA GCAGCTTGAACAGCAGCAGTACC	230
GlnPr2388	GACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGAGGAGCAGGACGAACAGGAGCA GCACGAACAGCAGCAGTCTC	231
GlnPr2389	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGAGGAGCAGGACGAACAGGA GCAGCACGAACAGCAGCAGTACC	232
GlnPr2390	GGTCGTGATCGTCGTGATTATCAAGTGGATCTTCTCCTCGGTGGTGG	233
GlnPr2391	CCACCACCGAGGAGAAGATCCACTTGATAATCACGACGATCACGAC C	234
GlnPr2392	CTTCGGCGCCACCGTGGTCGTGATCGTCGTGATTATCAAGTG	235
GlnPr2393	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGATAATCACGACGATC	236
GlnPr2394	CTTCGGCGCCACCGTGATCGTCGTGATTATCAAGTGCTTC	237
GlnPr2395	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGATAATCACGAC	238
GlnPr2396	CTTCGGCGCCGTGGTCATTGTAACCGTGGTCGTGATCGTCGTG	239

GlnPr2397	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGATAATCACGACGATCACGA CCAC	240
GlnPr2398	CTTCGGCGCCGTGGTCATTGTAGTCGTAACCGTGGTCGTGATCGTCG TG	241
GlnPr2399	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGATAATCACGACGATCACGA CCACGG	242
GlnPr2400	GAGCCACCAAGTCCAGCAGAGCCAGCACAGGTCCCAGGATCAGAGC CAGATTCTTGGAGTCAGGGGGGTC	243
GlnPr2401	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTCCACAGTCCCAGCACTCCCA GAGCCACCAAGTCCAGCAG	244
GlnPr2402	CGATGCCCAGCAGCAGGAGCAACACCAGGATCACGATGATGGCGGC GATATTCTTGGAGTCAGGGGGGTC	245
GlnPr2403	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTCCAGAACCACCACATCAGGC CGATGCCCAGCAGCAGGAG	246
GlnPr2404	GATAAACAGCAGCAGGCCAGCCACTCCGCCCAGCACAAATCAGGGCC ATATTCTTGGAGTCAGGGGGGTC	247
GlnPr2405	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGAAGAAGATGCCAGGCCGA TAAACAGCAGCAGGCC	248
GlnPr2406	GTCCAATCAGCACGATGCCAGCCACCACGCCGGCCACGATAGGGAT GATATTCTTGGAGTCAGGGGGGTC	249
GlnPr2407	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTCCAGATCAGCAGCAGGGCCA GTCCAATCAGCACGATGCC	250
GlnPr2408	CCAGGAAGATGATCACGAACAGCAGGATGCCAGCGATCACGCCAGC GATATTCTTGGAGTCAGGGGGGTC	251
GlnPr2409	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTCATCACGAGCACCACGCCCA GGAAGATGATCACGAA	252
GlnPr2410	GCAGGATGGCGAACAGGATGCCGAAGATGATGGGGATCACGACCA GAGCATTCTTGGAGTCAGGGGGGTC	253
GlnPr2411	CAGGACCGGTGCTTGCAGAAGCACTTGATGAACACCAGCACCAGCA GGATGGCGAACAGGATG	254
GlnPr2412	CTTCGGCGCCGTGATTACCGTGGTCGTGATCGTCGTGATTATCAGGT CCCAGCAGGAGGCCGCCG	255
GlnPr2413	GTCATTTTGAATCATCAGAAGAACTTCTTGGCGGGCGGCTCCTGCTG GGAC	256
GlnPr2414	GTCATTTTGAATCATCACCACCACTTCTTGGCGGGCGGCTCCTGCTG GGAC	257
GlnPr2415	GGTCATTTTGAATCATCAGGAGCCCTTCAGGGTCAGGAACATGATA ATCACGACGATCACGAC	258

Расщепление рестриктазами.

Для всех процедур расщепления рестриктазами приблизительно 1 г ДНК плазмиды (количественно определяли с применением спектрофотометра NanoDrop, ND-1000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, Делавер, США)) перемешивали с 10-20 единицами каждого фермента и 4 мкл соответствующего 10X буфера NE (NEB, Ипсвич, Массачусетс, США), объем раствора доводили до 40 мкл стерильной H₂O. Реакции инкубировали в течение 1 ч при температуре, необходимой для ферментов.

После каждого препаративного расщепления скелета добавляли 1 единицу кишечной щелочной фосфатазы теленка (calf intestinal alkaline phosphatase, CIP; NEB, Ипсвич, Массачусетс, США), и смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C.

Очистка продукта ПЦР.

Для проведения расщепления все ПЦР-фрагменты очищали перед расщеплением рестриктазами с применением набора Macherey Nagel Extract II (Macherey Nagel, Энзинген, Швейцария) или набора Gel and PCR clean-up (новое торговое название того же набора) согласно руководству производителя с применением 40 мкл буфера для элюирования. Данный протокол также использовали для замены буферов в образцах ДНК.

Экстракция ДНК.

Гель-электрофорез проводили с использованием 1-2% агарозных гелей. Данные гели готовили с применением необходимого количества агарозы UltraPure™ (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) и 1X буфера Трис - уксусная кислота - EDTA (ТАЕ, pH 8,3; Bio RAD, Мюнхен, Германия). Для окрашивания ДНК к 100 мл агарозного геля добавляли 1 мкл Gel Red Dye (Biotum, Найвард, Калифорния, США). В качестве маркера размера использовали 2 мкл "лесенки" ДНК 1 kb (NEB, Ипсвич, Массачусетс, США). Электрофорез проводили в течение приблизительно 1 ч при напряжении 125 В.

Полосы, представляющие интерес, вырезали из агарозного геля и очищали с применением набора Extract II (Macherey-Nagel, Энзинген, Швейцария) или Gel and PCR clean-up kit (новое торговое название

того же набора) либо Qiaquick Gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Германия) согласно руководству производителя с применением 40 мкл буфера для элюирования.

Лигирование.

Для каждого лигирования 4 мкл вставки перемешивали с 1 мкл вектора, 400 единицами лигазы (ДНК-лигаза T4, NEB, Ипсвич, Массачусетс, США) и 1 мкл 10X буфера для лигазы (буфер для ДНК-лигазы T4; NEB, Ипсвич, Массачусетс, США). Конечный объем раствора доводили до 10 мкл водой СВЧ (сверхвысокой чистоты). Смесь инкубировали в течение 1-2 ч при к.т.

Трансформация продуктов лигирования в компетентную бактерию.

Для трансформации продуктов лигирования использовали компетентную бактерию "TOP 10" (One Shot® TOP 10 Competent E.coli; Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США). 25-50 мкл бактерий оттаивали на льду в течение 5 мин. Затем к компетентным бактериям добавляли 3-5 мкл продукта лигирования и инкубировали в течение 20-30 мин на льду перед коротким тепловым шоком в течение 1 мин при температуре 42°C. Затем в пробирку добавляли 500 мкл среды S.O.C (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C при перемешивании. Наконец, бактерии переносили на планшет LB с ампициллином или канамицином (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C.

Мини-препараты плазмид.

Для получения мини-препаратов колонии трансформированных бактерий выращивали в течение 6-16 ч в 2,5 мл LB с ампициллином или канамицином при температуре 37°C, 200 об/мин. ДНК экстрагировали с применением набора для очистки плазмиды для E.coli (NucleoSpin QuickPure или NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel, Энзинген, Швейцария) или Qiagen QuickLyse Miniprep (Qiagen)) согласно руководству производителя.

Плазмидную ДНК из минипрепаратов количественно определяли один раз с применением спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, Делавер, США) посредством измерения поглощения при 260 нм и оценки соотношения ОП (оптическая плотность) 260 нм/ОП280 нм, которое должно составлять от 1,8 до 2. Контрольное расщепление проводили перед отправкой образца в компанию Fastens SA (План-ле-Отс, Швейцария) для подтверждения последовательности.

Миди-препараты плазмид.

Для получения миди-препаратов трансформированные бактерии выращивали при температуре 37°C в течение ночи в 200 мл LB с ампициллином (или канамицином). Затем культуру центрифугировали в течение 20 мин при 725 g и плазмиду очищали с применением коммерческого набора (NucleoBond Xtra Midi; Macherey Nagel, Энзинген, Швейцария) согласно протоколу, приведенному в руководстве производителя.

Плазмидную ДНК из мидипрепаратов количественно определяли трижды с применением спектрофотометра NanoDrop ND-1000 посредством измерения поглощения при 260 нм и оценки соотношения ОП260 нм/ОП280 нм, которое должно составлять от 1,8 до 2, а также подтверждали посредством расщепления рестриктазами. Затем образцы направляли на секвенирование (Fastens SA, План-ле-Отс, Швейцария).

Макси-препараты плазмид.

Для получения макси-препаратов трансформированные бактерии выращивали при температуре 37°C в течение ночи в 500 мл LB с ампициллином (или канамицином). Культуру центрифугировали в течение 20 мин при 725 g и плазмиду очищали с применением коммерческого набора (NucleoBond PC500 или NucleoBond Xtra Maxi; Macherey Nagel, Энзинген, Швейцария) согласно протоколу, приведенному в руководстве производителя.

Плазмидную ДНК из макси-препаратов количественно определяли трижды с применением спектрофотометра NanoDrop ND-1000 посредством измерения поглощения при 260 нм и оценки соотношения ОП260 нм/ОП280 нм, которое должно составлять от 1,8 до 2, а также подтверждали посредством расщепления рестриктазами. Затем образцы направляли на секвенирование (Fastens SA, План-ле-Отс, Швейцария).

Гига-препараты плазмид.

Для получения гига-препаратов трансформированные бактерии выращивали при температуре 37°C в течение ночи в 1500 мл LB с ампициллином (или канамицином). Культуру центрифугировали в течение 20 мин при 725 g и плазмиду очищали с применением коммерческого набора (NucleoBond PC10000; Macherey Nagel, Энзинген, Швейцария) согласно протоколу, приведенному в руководстве производителя.

Плазмидную ДНК из гигапрепаратов количественно определяли трижды с применением спектрофотометра NanoDrop ND-1000 посредством измерения поглощения при 260 нм и оценки соотношения ОП260 нм/ОП280 нм, которое должно составлять от 1,8 до 2, а также подтверждали посредством расщепления рестриктазами. Затем образцы направляли на секвенирование (Fastens SA, План-ле-Отс, Швейцария).

Результаты.

Клонирование тяжелой цепи антитела IgG1.

Ген, кодирующий тяжелую цепь IgG1, используемый в данном патенте, оптимизировали для экс-

прессии в клетках китайского хомячка посредством технологии GeneArt (Регенсбург, Германия). Вариативную часть и константную часть тяжелой цепи обеспечивали в двух различных плазидах посредством технологии GeneArt. После получения конструкции GeneArt солибилизировали в воде и константную область тяжелой цепи и вариативную область тяжелой цепи клонировали совместно с применением ферментов KpnI и ApaI. Данную работу проводила сторонняя контрактная исследовательская организация; слитый продукт направляли в компанию Glenmark. После секвенирования данной слитой конструкции вариацию последовательности в константной области тяжелой цепи по сравнению с теоретической последовательностью идентифицировали в домене CH2 Fc-области

(EEMTK на DELTK).

Конструировали праймеры для изменения данной области с применением мегапраймера ПЦР и одновременно вводили подходящие сайты рестрикции с 5'- и 3'-конца от открытой рамки считывания.

Первую ПЦР с применением праймеров GlnPr497 (SEQ ID NO: 2) и GlnPr498 (SEQ ID NO: 3) проводили на исходной конструкции. Полученный ампликон (304 п.о.) использовали в различных концентрациях в качестве мегапраймера во второй ПЦР с применением второго праймера GlnPr501 и исходной конструкции в качестве матрицы. Конечный продукт ПЦР очищали на геле и клонировали в челночный вектор pCR-blunt (Zero Blunt® PCR Cloning Kit, Invitrogen, LifeTechnologies).

После скрининга минипрепаратов оказалось, что несмотря на то что последовательность вставки была правильной, сайты рестрикции с 5'- и 3'-конца от открытой рамки считывания были утрачены. Вследствие этого вставку повторно амплифицировали с применением праймеров GlnPr501 (SEQ ID NO: 4) и GlnPr498 (SEQ ID NO: 3) и более высокой температуры отжига (64°C). Ампликон очищали на геле и клонировали в pCR-blunt (Zero Blunt® PCR Cloning Kit, Invitrogen, LifeTechnologies). Один минипрепарат с правильным характером расщепления выбирали для субклонирования в pSEL1, челночный вектор, с применением рестрикционных ферментов HindIII и XbaI. После скрининга минипрепаратов получали максипрепараты. Вставку данного максипрепарата снова вырезали с применением рестрикционных ферментов XbaI и HindIII и клонировали в скелет плазмиды pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), открытый с помощью тех же ферментов и обработанный CIP. pGLEX41 представляет собой стандартный вектор экспрессии собственной разработки, который содержит кассету экспрессии, содержащую промотор CMV мыши, за которым следуют конститутивно сплайсированный интрон, сайт множественного клонирования (multiple cloning site, MCS) и последовательность поли(A) SV40. После скрининга минипрепаратов получали максипрепарат pGLEX41_HC, которому присваивали номер серии плазмиды GSC314. Следующие мидипрепараты или гигапрепараты той же ДНК позволили получить серии плазмиды номер GSC314a, GSC314b, GSC314c, GSC314d и GSC314e (в результате секвенирования ДНК было подтверждено, что все данные препараты являлись идентичными, и данные препараты были названы плазмидой GSC314 (SEQ ID NO: 48)).

Клонирование вектора экспрессии на основе альтернативного сплайсинга для экспонированной на мембране тяжелой цепи антитела IgG1.

Кодирующую область тяжелой цепи антитела формата IgG1 амплифицировали методом ПНР с применением праймеров GlnPr1518 (SEQ ID NO: 11), GlnPr1519 (SEQ ID NO: 12) и GlnPr1520 (SEQ ID NO: 13) и плазмиды pGLEX41_HC (GSC314, SEQ ID NO: 48) в качестве матрицы. Полученный в результате продукт ПНР содержал сайт рестрикции NheI на 5'-конце, а 3'-конец ампликона был модифицирован и содержал строго последние 40 п.о. записи базы данных NCBI для гена ighg1 (SEQ ID NO: 65), а также сайт рестрикции HindIII. Модификацию 3'-конца проводили с целью воссоздания природного донорного сайта сплайсинга в С-концевой области константной части тяжелой цепи IgG1. Продукт ПНР вырезали с применением рестрикционных ферментов NheI и HindIII и клонировали в плазмиду pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), разрезанную с применением тех же ферментов и обработанную CIP. Полученный в результате вектор, которому присваивали название pGLEX41_HC-AS (номер серии плазмиды GSC3836, SEQ ID NO: 287), подтверждали посредством расщепления рестриктазами и анализа последовательности.

Интрон номер 4 (SEQ ID NO: 69) тропонина курицы (cTNT) амплифицировали из плазмиды собственной разработки, содержащей последовательность указанного интрона (GSC2819, SEQ ID NO: 67), с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr1517 (SEQ ID NO: 10). Тропонин экспрессируется исключительно в сердечных мышцах и эмбриональных скелетных мышцах. В раннем эмбриональном сердце и скелетных мышцах свыше 90% мРНК содержат экзон, тогда как >95% мРНК взрослых не содержат экзона (Cooper & Ordahl (1985) J Biol Chem, 260(20): 11140-8). Праймеры добавляли сайт HindIII на 5'-конце и сайт AgeI, за которым следует BstBI, на 3'-конце. Ампликон очищали на геле, расщепляли с применением HindIII и BstBI и клонировали в вектор pGLEX41_HC-IgAS (GSC3836, SEQ ID NO: 287), открытый с применением тех же ферментов и обработанный CIP. Полученный в результате вектор, которому присваивали название pGLEX41_HC-cTNTintron4 (номер серии плазмиды GSC3848, SEQ ID NO: 289), подтверждали посредством расщепления рестриктазами и анализа последовательности.

Последовательность, кодирующую трансмембранную область гена ighg1 человека (M1M2), собирали с применением плазмид GlnPr1521 (SEQ ID NO: 14) и GlnPr1522 (SEQ ID NO: 15). Данные праймеры частично перекрывались и были дополнены до двухцепочечной ДНК с применением ПЦР. Продукт ПЦР

с тупыми концами клонировали в pCR-blunt (Zero Blunt® PCR Cloning Kit, Invitrogen, LifeTechnologies), что приводило к получению плазмиды pCRblunt-M1M2, которую подтверждали посредством секвенирования. Вставку повторно амплифицировали с применением праймеров GlnPr1523 (SEQ ID NO: 16) и GlnPr1524 (SEQ ID NO: 17) для завершения последовательности трансмембранного домена M1M2. Ампликон очищали на геле, расщепляли с применением AgeI и BstBI и клонировали в вектор pGLEX41_HC-cTNTintron4 (GSC3848, SEQ ID NO: 289). Полученную в результате плазмиду под названием pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 нарабатывали в масштабе максипрепарата, которому присваивали номер серии плазмиды GSC3899 и который подтверждали посредством анализа последовательности (SEQ ID NO: 36).

Для увеличения соотношения сплайсинга между экспрессированным и экспонированным на мембране антителом уменьшали количество пиримидинов в поли(Y)-участке "выше по течению" экзона, кодирующего трансмембранную область. С данной целью фрагмент I4(0Y) (SEQ ID NO: 70) амплифицировали из вектора собственной разработки (GSC3469, SEQ ID NO: 68) с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr1649 (SEQ ID NO: 18). Ампликон расщепляли с применением рестрикционных ферментов HindIII и AgeI и клонировали в скелет pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), открытый с применением тех же ферментов и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепарат pGLEX41_HC-I4(0Y)-M1M2-M1M2-M1M2, и получали серию номер GSC4398, которую подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 37).

Поли(A) вводили в интрон, который отделял экзон, кодирующий IgG1, от альтернативного экзона, кодирующего трансмембранную область. Поли(A)-сигнал SV40 амплифицировали из вектора собственной разработки (GSC3469, SEQ ID NO: 305) с применением праймеров GlnPr1650 (SEQ ID NO: 19) и GlnPr1651 (SEQ ID NO: 20). Ампликон расщепляли с применением рестрикционного фермента ClaI и клонировали в вектор pGLEX41_HC-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), который расщепляли с применением ClaI и обрабатывали CIP, что приводило к получению интрона I4(polyA) (SEQ ID NO: 71). После скрининга минипрепарата и подтверждения правильной ориентации вставки нарабатывали мидипрепарат pGLEX41_HC-I4(polyA)-M1M2-M1M2-M1M2, которому присваивали номер серии GSC4401 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 38).

Ранее последовательность терминатора гастрин добавляли к поли(A)-сигналу SV40 вектора собственной разработки (GSC23, SEQ ID NO: 306), который содержит такой же общий скелет, что и pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), но несет отличный промотор. Слияние поли(A) SV40 и терминатора гастрин в номенклатуре плазмид обозначали как "SV40ter" (SEQ ID NO: 306). Кассету экспрессии GSC23 (SEQ ID NO: 306) (промотор + кодирующая последовательность) заменяли кассетой экспрессии pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M1 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), за исключением поли(A)-сигнала SV40 (т.е. промотора и кодирующей последовательности). Вставку вырезали с применением рестрикционных ферментов BstBI и NruI и клонировали в скелет GSC23 (SEQ ID NO: 306), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепарата нарабатывали мидипрепарат плазмиды pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2-SV40ter, которому присваивали номер серии плазмиды GSC4402 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 39).

Другая предпочтительная конструкция содержит поли(A)-сигнал с терминатором гастрин в интроне. Последовательность I4(SV40ter) приведена в SEQ ID NO: 77.

Клонирование вектора экспрессии на основе альтернативного сплайсинга для экспонированной на мембране тяжелой цепи антитела IgG1 с применением трансмембранного домена рецептора Т-клеток альфа человека (PTCRA).

С целью замены трансмембранной области M1M2 в конструкциях на основе альтернативного сплайсинга трансмембранным доменом гена рецептора Т-клеток альфа человека (PTCRA) комплементарные праймеры GlnPr1799 (SEQ ID NO: 28) и GlnPr1735 (SEQ ID NO: 26) использовали для получения фрагмента вставки. Данные праймеры частично перекрывались и были дополнены до двухцепочечной ДНК с применением ПЦР. Фрагмент-вставку вырезали с применением AgeI и BstBI и клонировали в скелет pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. Поскольку часть вставки была утрачена из полученных в результате минипрепаратов, на данном минипрепарате проводили новую амплификацию с применением праймеров GlnPr1799 (SEQ ID NO: 28) и GlnPr269 (SEQ ID NO: 1). Амплифицированный фрагмент-вставку расщепляли с помощью AgeI и BstBI и клонировали в скелет pGLEX41_HC-I4(0Y)-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC4398, SEQ ID NO: 37), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. Один минипрепарат подтверждали посредством секвенирования и использовали для проведения другой ПЦР с применением праймеров GlnPr1840 (SEQ ID NO: 31) и GlnPr269 (SEQ ID NO: 1). Ампликон расщепляли с применением AgeI и BstBI и клонировали в скелеты pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), pGLEX41_HC-I4(0Y)-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC4398, SEQ ID NO: 37), pGLEX41_HC-I4(polyA)-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC4401, SEQ ID NO: 38) и pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2-SV40ter (GSC4402, SEQ ID NO: 39), расщепленные с применением тех же ферментов и обработанные CIP. Лигирование приводило к получению мидипрепаратов pGLEX41_HC-I4-PTCRA (GSC5854, SEQ ID NO: 40), pGLEX41_HC-I4(0Y)-PTCRA (GSC5855, SEQ ID NO: 41), pGLEX41_HC-I4(polyA)-PTCRA (GSC5857,

SEQ ID NO: 42) и pGLEX41_HC-I4-PTCRA-SV40ter (GSC5856, SEQ ID NO: 43) соответственно. Все мидипрепараты подтверждали посредством секвенирования.

Клонирование вектора экспрессии на основе альтернативного сплайсинга для экспонированной на мембране тяжелой цепи антитела IgG1 с применением слитой конструкции M1M2-PTCRA.

Вставку, кодирующую слитую конструкцию M1M2-PTCRA, заказывали в GeneArt под названием GeneArt_Seq32 (SEQ ID NO: 64). Данный фрагмент содержит стандартную трансмембранную область M1M2 тяжелой цепи IgG1, за исключением трансмембранного домена, который заменяли трансмембранным доменом субъединицы альфа рецептора Т-клеток (PTCRA). Плазмиду, предоставленную GeneArt, разрезали с применением рестрикционных ферментов AgeI и BstBI, и очищенную вставку лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), pGLEX41_HC-I4(0Y)-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC4398, SEQ ID NO: 37), pGLEX41_HC-I4(polyA)-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC4401, SEQ ID NO: 38) и pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2-SV40ter (GSC4402, SEQ ID NO: 39) соответственно, расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP.

Лигирования приводили к получению мидипрепаратов pGLEX41_HC-I4-M1M2-PTCRA-M1M2 (GSC6030, SEQ ID NO: 44), pGLEX41_HC-I4(0Y)-M1M2-PTCRA-M1M2 (GSC6048, SEQ ID NO: 45), pGLEX41_HC-I4(polyA)-M1M2-PTCRA-M1M2 (GSC6047, SEQ ID NO: 46) и pGLEX41_HC-I4-M1M2-PTCRA-M1M2-SV40ter (GSC6046, SEQ ID NO: 47). Все мидипрепараты подтверждали посредством секвенирования.

Сначала было получено слияние M1M2-PTCRA; данные конструкции обеспечивали экспонирование IgG1 на мембране и продемонстрировали такое же поведение относительно модификации интронов, что и нативные конструкции M1M2 (см. фиг. 6 в примере 3).

Следующая конструкция pGLEX41_HC-I4-M1M2-PTCRA-M1M2_corrected была сконструирована для обеспечения правильного анализа влияния модификации трансмембранного домена в трансмембранной области.

Для данной конструкции проводили слияние методом ПЦР (ПЦР со сращиванием перекрывающихся расширений). Участок 4 интрона cTNT и внеклеточную часть трансмембранной области M1M2 амплифицировали из плазмиды pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2- (GSC3899, SEQ ID NO: 36) с применением праймеров GlnPr1285 (SEQ ID NO: 259) и GlnPr2378 (SEQ ID NO: 221). Цитозольный хвост трансмембранной области M1M2, а также поли(A)-сигнал SV40 амплифицировали с применением праймеров GlnPr2379 (SEQ ID NO: 222) и GlnPr1650 (SEQ ID NO: 19) из той же матрицы. Праймеры GlnPr2378 (SEQ ID NO: 221) и GlnPr2379 (SEQ ID NO: 222) обеспечили создание перекрывающихся концов двух продуктов ПЦР с получением правильного трансмембранного домена PTCRA. Затем из данных двух первых продуктов ПЦР проводили ПЦР с перекрывающимися расширениями с применением праймеров GlnPr1285 (SEQ ID NO: 259) и GlnPr1650 (SEQ ID NO: 19). Полученный в результате продукт слияния ПЦР расщепляли с применением AgeI и BstBI и лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепарата набавывали мидипрепарат pGLEX41_HC-I4-M1M2-PTCRA-M1M2_corrected, которому присваивали номер серии плазмиды GSC11206 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 284).

Клонирование вектора экспрессии на основе альтернативного сплайсинга для экспонированной на мембране тяжелой цепи антитела IgG1 с применением трансмембранной области B7-1 мыши.

С целью замены трансмембранной области трансмембранной областью гена B7-1 мыши проводили слияние методом ПЦР.

Сначала последовательность, кодирующую трансмембранную область B7-1 мыши, амплифицировали методом ПЦР из конструкции собственной разработки (заказанной в GeneArt под названием GeneArt_Seq43, SEQ ID NO: 66) с применением праймеров GlnPr2100 (SEQ ID NO: 33) и GlnPr2101 (SEQ ID NO: 34).

Для клонирования вектора pGLEX41_HC-I4(0Y)-B7-B7-B7 фрагмент, кодирующий cTNT-I4(0Y), амплифицировали методом ПЦР из матрицы pGLEX41_HC-I4(0Y)-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC4398, SEQ ID NO: 37) с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2102 (SEQ ID NO: 35). Последовательность, кодирующую трансмембранную область B7-1 мыши, амплифицировали методом ПЦР из конструкции собственной разработки (заказанной в GeneArt под названием GeneArt_Seq43, SEQ ID NO: 66) с применением праймеров GlnPr2100 (SEQ ID NO: 33) и GlnPr2101 (SEQ ID NO: 34). Оба продукта ПЦР сливали с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2100 (SEQ ID NO: 33). Полученный в результате продукт ПЦР расщепляли с применением BstBI и HindIII и лигировали в pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепарата набавывали мидипрепарат pGLEX41_HC-I4(0Y)-B7-B7-B7, которому присваивали номер серии GSC7057 и который подтверждали посредством расщепления рестриктазами и секвенирования (SEQ ID NO: 53).

Для клонирования вектора pGLEX41_HC-I4(polyA)-B7-B7-B7 фрагмент, кодирующий cTNT-I4(polyA), амплифицировали методом ПЦР из матрицы pGLEX41_HC-I4(polyA)-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC4401, SEQ ID NO: 38) с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2099 (SEQ ID

NO: 32). Последовательность, кодирующую трансмембранную область B7-1 мыши, амплифицировали методом ПЦР из конструкции собственной разработки (заказанной в GeneArt под названием GeneArt_Seq43, SEQ ID NO: 66) с применением праймеров GlnPr2100 (SEQ ID NO: 33) и GlnPr2101 (SEQ ID NO: 34). Оба продукта ПЦР сливали с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2100 (SEQ ID NO: 33). Полученный в результате продукт ПЦР расщепляли с применением BstBI и HindIII и лигировали в pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), расщепленный теми же ферментами и обработанный СР. После скрининга минипрепарата полученный в результате мидипрепарат pGLEX41_HC-I4-(polyA)-B7-B7-B7, которому был присвоен номер серии GSC7058, подтверждали посредством расщепления рестриктазами и секвенирования (SEQ ID NO: 54).

Для клонирования вектора pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 cTNT-I4 амплифицировали методом ПЦР из матрицы pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36) с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2099 (SEQ ID NO: 32). Последовательность, кодирующую трансмембранную область B7-1 мыши, амплифицировали методом ПЦР из конструкции собственной разработки (заказанной в GeneArt под названием GeneArt_Seq43, SEQ ID NO: 66) с применением праймеров GlnPr2100 (SEQ ID NO: 33) и GlnPr2101 (SEQ ID NO: 34). Оба продукта ПЦР сливали с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2100 (SEQ ID NO: 33). Полученный в результате продукт ПЦР расщепляли с применением BstBI и HindIII и лигировали в pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), расщепленный теми же ферментами и обработанный СР. После скрининга минипрепаратов полученный в результате мидипрепарат pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7, которому был присвоен номер серии GSC7056, подтверждали посредством расщепления рестриктазами и секвенирования (SEQ ID NO: 55).

Для клонирования вектора pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7-SV40ter использовали тот же продукт ПЦР, что и для конструкции pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7, который расщепляли с применением HindIII и BstBI и лигировали в pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2-SV40ter (GSC4402, SEQ ID NO: 39), расщепленный теми же ферментами и обработанный СР. После скрининга минипрепарата полученный в результате мидипрепарат pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7-SV40ter, которому был присвоен номер серии GSC7059, подтверждали посредством расщепления рестриктазами и секвенирования (SEQ ID NO: 56).

Последующее уменьшение соотношения сплайсинга секретируемой тяжелой цепи антитела IgG1 к тяжелой цепи антитела IgG1, экспонированной на мембране, с применением трансмембранной области B7-1 мыши.

Было продемонстрировано, что экспонирование на мембране химерных белков является высокоэффективным с применением трансмембранной области B7-1 мыши (Chou W.-C. et al., (1999) Biotechnol. Bioeng., 65: 160-9; Liao K.-W. et al., (2001) Biotechnol. Bioeng., 73: 313-23). В настоящей заявке также было показано, что снижение количества Y в поли(Y)-участке акцептора сплайсинга до 0 значительно уменьшало количество антитела, экспонированного на мембране клетки (см. фиг. 6F в примере 3).

Для оценки эффекта уменьшения количества пиримидинов в поли(Y)-участке интрона некоторые конструкции были получены посредством слияния методом ПЦР.

Таблица 3. Модификация интрона: пары праймеров и матрицы, использованные для ПЦР

ID конструкции	SEQ ID NO последовательности интрона	Количество Y в интроне	Матрица ПЦР 1	Пары праймеров ПЦР 1
pGLEX41_HC-I4(3Y)-I4-B7-B7-B7	72	3Y	GSC4340 (SEQ ID NO: 307)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2165 (SEQ ID NO: 317)
pGLEX41_HC-I4(5Y)-I4-B7-B7-B7	73	10Y	GSC4222 (SEQ ID NO: 308)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2164 (SEQ ID NO: 316)
pGLEX41_HC-I4(5Y-5)-I4-B7-B7-B7	74	5Y	GSC2617 (SEQ ID NO: 309)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2163 (SEQ ID NO: 315)
pGLEX41_HC-I4(9Y)-I4-B7-B7-B7	75	9Y	GSC4335 (SEQ ID NO: 310)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2162

				(SEQ ID NO:314)
pGLEX41_HC-I4(15Y-3')-I4-B7-B7-B7	76	25Y	GSC2332 (SEQ ID NO: 311)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9)/ GlnPr2166 (SEQ ID NO:318)

1-я ПЦР позволила провести амплификацию желаемого интрона из скелетов собственной разработки, содержащих модифицированные интроны. Праймеры и матрицы, использованные для каждой конструкции, приведены в табл. 3. 2-я ПЦР (общая для всех конструкций) позволила провести амплификацию трансмембранных доменов B7-1 из конструкции pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55) с применением праймеров GlnPr2101 (SEQ ID NO: 34) и GlnPr2100 (SEQ ID NO: 33). После очистки данных продуктов ПЦР интроны и трансмембранный домен сливали методом ПЦР со сращиванием перекрывающимися расширениями с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2100 (SEQ ID NO: 33). Затем очищенные продукты ПЦР расщепляли с применением HindIII и BstBI и лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов для каждой из конструкций были наработаны мидипрепараты, которые подтверждали посредством секвенирования. Номера серий плазмид, присвоенные каждой конструкции, являлись следующими:

pGLEX41_HC-I4(3Y)-I4-B7-B7-B7	GSC9770 (SEQ ID NO: 62)
pGLEX41_HC-I4(5Y)-I4-B7-B7-B7	GSC9763 (SEQ ID NO: 61)
pGLEX41_HC-I4(5Y-5)-I4-B7-B7-B7	GSC9768 (SEQ ID NO: 60)
pGLEX41_HC-I4(9Y)-I4-B7-B7-B7	GSC9949 (SEQ ID NO: 59)
pGLEX41_HC-I4(15Y-3')-I4-B7-B7-B7	GSC9950 (SEQ ID NO: 63)

Другим способом уменьшения сплайсинга является ослабление донорного сайта сплайсинга. Донор сплайсинга характеризуется консенсусной последовательностью, определяющей 5'-конец интрона. Вследствие этого разрабатывали две конструкции, в которых консенсусную последовательность ДНК донора сплайсинга модифицировали без оказания влияния на последовательность белка, экспрессируемую геном.

ПЦР-амплификацию тяжелой цепи IgG1 с модифицированной последовательностью 3'-конца проводили на матрице pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55) с праймером GlnPr1518 (SEQ ID NO: 11) и GlnPr2161 (SEQ ID NO: 313) для конструкции SDCCC и GlnPr1518 (SEQ ID NO: 11) и GlnPr2160 (SEQ ID NO: 314) для конструкции SDGGC. Продукт ПЦР расщепляли с применением NheI и HindIII и лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепарата нарабатывали мидипрепараты pGLEX41_HC-SD_CCC-I4-B7-B7-B7 (номер серии плазмиды GSC9764, SEQ ID NO: 58) и pGLEX41_HC-SD_GGC-I4-B7-B7-B7 (номер серии плазмиды GSC9765, SEQ ID NO: 57), которые подтверждали посредством секвенирования. Последовательность интрона конструкции pGLEX41_HC-SD_GGC-I4-B7-B7-B7 приведена в SEQ ID NO: 78.

Замена трансмембранного домена B7-1 трансмембранными доменами аналогичной длины, содержащими исключительно гидрофобные остатки.

Для оценки эффекта трансмембранного домена на экспонирование на мембране разрабатывали несколько конструкций. Трансмембранные спирали, содержащие преимущественно гидрофобные остатки, считают благоприятными для стабилизации экспонирования на поверхности, и вследствие этого в качестве 1-го подхода трансмембранный домен B7-1 трансмембранной области B7-1 заменяли трансмембранными доменами других белков, содержащими исключительно гидрофобные остатки. Более того, поскольку длина трансмембранной спирали может оказывать влияние на экспонирование на поверхности, данные первые конструкции состояли исключительно из трансмембранных доменов, длина которых была подобна длине трансмембранного домена B7-1. Последовательности и характеристики данных трансмембранных доменов обобщены в табл. 4.

Таблица 4. Трансмембранные домены с 22-23 аминокислотами (все гидрофобные): характеристики и последовательности

Трансмембранный домен	Длина	Гидрофобных	Полярных	Заряженных	Последовательность	SEQ ID NO
B7	22	20	2	0	TLVLFAGAGFGAVITVVVIVVII	173
ACLV1	23	23	0	0	LALILGPVLALLALVALGVVLGLW	174
ANTR2	23	23	0	0	IAAIIIVILVLLLLGIGLMWWFW	175
CD4	22	22	0	0	MALIVLGGVAGLLIFLGLIFF	176
ITB1	23	23	0	0	IAGVIAGILLFVIIIFLGVVLVM	179
PTPRM	22	22	0	0	IAGVIAGILLFVIIIFLGVVLVM	177
TNR5	22	22	0	0	ALVVIPIIFGILFAILLVLVFI	178

Таблица 5. Пары праймеров, использованные для клонирования гидрофобных трансмембранных доменов

Трансмембранный домен	Праймер 1 ^{ой} ПЦР	Праймеры 2 ^{ой} ПЦР
ACVL1	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2400 (SEQ ID NO:243)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2401 (SEQ ID NO:244)
ANTR2	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2402 (SEQ ID NO:245)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2403 (SEQ ID NO:246)
CD4	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2404 (SEQ ID NO:247)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2405 (SEQ ID NO:248)
PTPRM	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2408 (SEQ ID NO:251)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2409 (SEQ ID NO:252)
TNR5	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2410 (SEQ ID NO:253)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2411 (SEQ ID NO:254)
ITB1	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2406 (SEQ ID NO:249)	GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) / GlnPr2407 (SEQ ID NO:250)

Различные трансмембранные домены образовывали посредством 2 этапов ПЦР-амплификации участка интрона 4 cTNT с применением праймеров, модифицирующих 3'-конец трансмембранного домена. Матрица во всех случаях представляла собой конструкцию pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55). Для каждой конструкции первый раунд ПЦР проводили с применением соответствующих праймеров, приведенных в табл. 5. После очистки данных продуктов ПЦР 1-го раунда проводили 2-й раунд ПЦР с применением праймеров, перечисленных в табл. 5. После очистки данные продукты ПЦР расщепляли с помощью AgeI и ClaI и лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После подтверждения последовательностей на уровне минипрепарата нарабатывали мидипрепараты различных конструкций, и данным сериям плазмид были присвоены следующие номера GSC:

pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-ACVL1-B7	GSC11213 (SEQ ID NO : 81)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-ANTR2-B7	GSC11214 (SEQ ID NO : 82)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-CD4-B7	GSC11210 (SEQ ID NO : 83)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-PTPRM-B7	GSC11205 (SEQ ID NO : 84)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-TNR5-B7	GSC11217 (SEQ ID NO : 85)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-ITB1-B7	GSC11756 (SEQ ID NO : 86)

Все мидипрепараты подтверждали посредством секвенирования.

Замена трансмембранного домена B7-1 трансмембранными доменами аналогичной длины, содержащими заряженные и/или полярные остатки.

Поскольку трансмембранные домены, содержащие исключительно гидрофобные остатки, не оказывали влияния на экспонирование на поверхности (см. фиг. 10 в примере 4), были выбраны другие транс-

мембранные домены, которые характеризовались аналогичной длиной, что и трансмембранный домен B7-1, но содержали один или более заряженных и/или полярных остатков.

Последовательности и характеристики данных трансмембранных доменов обобщены в табл. 6.

Таблица 6. Трансмембранные домены с 21-24 аминокислотами, содержащие заряженные и/или полярные остатки: характеристики и последовательности

Трансмембранный домен	Длина	Гидрофобн	Полярных	Заряжены	Последовательность	SEQ ID NO
B7	22	20	2	0	TLVLFGAGFGAVITVVIVVII	173
IGF1R	24	22	1	1	LIIPVAVLLIVGGLVIMLYVFH	181
1B07	24	22	1	1	GIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCR	180
TRBM	24	19	4	1	GLLIGISIASLCLVVALALLCHL	182
IL4RA	24	16	8	0	LLLGVSVCIVILAVCLLCYVSIT	183
LRP6	23	15	8	0	TNTVGSVIGVIVTIFVSGTVYFI	184
GpA	23	19	4	0	ITLIIFGVMAGVIGTILLISYGI	185
PTCRA	21	18	0	3	ALWLGVLRLLLFKLLFDLLL	186

Таблица 7. Конструкции GeneArt, использованные для клонирования трансмембранных доменов с 21-24 аминокислотами, содержащих заряженные и/или полярные остатки

Трансмембранный домен	Название GeneArt Seq	GeneArt Seq SEQ ID NO
1B07	GeneArt_Seq84	266
IGF1R	GeneArt_Seq 83	265
TRBM	GeneArt_Seq 85	267
IL4RA	GeneArt_Seq 86	268
LRP6	GeneArt_Seq 87	269
GpA	GeneArt_Seq 94	276

Различные трансмембранные домены (за исключением PTCRA), названия которых указаны в табл. 7, заказывали в GeneArt. После получения конструкции GeneArt ресуспендировали в воде, а затем расщепляли с помощью AgeI и ClaI. Полученные в результате вставки лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепараты и получали следующие номера серий:

pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-1B07-B7	GSC11296 (SEQ ID NO : 87)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-IGF1R-B7	GSC11295 (SEQ ID NO : 88)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-TRBM-B7	GSC11390 (SEQ ID NO : 89)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-IL4RA-B7	GSC11391 (SEQ ID NO : 90)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-LRP6-B7	GSC11392 (SEQ ID NO : 91)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-GpA-B7	GSC11397 (SEQ ID NO : 92)

Для конструкции pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA-B7 проводили 2 этап ПЦР. Интрон сTNT с внеклеточной частью B7 трансмембранной области B7-1 амплифицировали с применением праймеров

GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2380 (SEQ ID NO: 223) и pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55) в качестве матрицы. Полученный в результате продукт ПЦР повторно амплифицировали с применением праймеров GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2381 (SEQ ID NO: 224). Праймеры GlnPr2380 (SEQ ID NO: 223) и GlnPr2381 (SEQ ID NO: 224) обеспечивали слияние трансмембранного домена PTCRA с внеклеточной частью B7-1 трансмембранной области B7-1. Полученный в результате продукт ПЦР расщепляли с помощью ClaI и AgeI и повторно клонировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепарат pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA-B7, которому присваивали номер серии GSC11204 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 93).

Модификации заряженных остатков в трансмембранном домене PTCRA.

Трансмембранный домен PTCRA составляет 21 аминокислоту в длину, 3 из которых являются заряженными остатками. Наличие данных заряженных остатков может объяснить относительно низкую эффективность данного конкретного трансмембранного домена в системе экспонирования на поверхности (см. фиг. 11 в примере 4). Вследствие этого мутация данных остатков на гидрофобную аминокислоту валин может обеспечивать преимущество в отношении экспонирования на поверхности.

Таблица 8. Мутации заряженных остатков в трансмембранном домене PTCRA: последовательности, праймеры и номера серий ДНК

Название конструкции	Последовательность трансмембранного домена	SEQ ID NO	Праймер 1 ^{ого} раунда ПЦР	Пара праймеров 2 ^{ого} раунда ПЦР
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V-B7	ALWLGVLVLLLFKLLFDLLL	187	GlnPr2382 (SEQ ID NO:225)	GlnPr2383 (SEQ ID NO:226)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_K13V-B7	ALWLGVLRLLLFVLLFDLLL	188	GlnPr2380 (SEQ ID NO:223)	GlnPr2384 (SEQ ID NO:227)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_D18V-B7	ALWLGVLRLLLFKLLFVLLL	189	GlnPr2380 (SEQ ID NO:223)	GlnPr2385 (SEQ ID NO:228)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V_K13V-B7	ALWLGVLVLLLFVLLFDLLL	190	GlnPr2382 (SEQ ID NO:225)	GlnPr2386 (SEQ ID NO:229)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V_D18V-B7	ALWLGVLVLLLFKLLFVLLL	191	GlnPr2382 (SEQ ID NO:225)	GlnPr2387 (SEQ ID NO:230)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_K13V_D18V-B7	ALWLGVLRLLLFVLLFVLLL	192	GlnPr2380 (SEQ ID NO:223)	GlnPr2388 (SEQ ID NO:231)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V_K13V_D18V-B7	ALWLGVLVLLLFVLLFVLLL	193	GlnPr2382 (SEQ ID NO:225)	GlnPr2389 (SEQ ID NO:232)

Все возможные комбинации немутантных и мутантных заряженных остатков в трансмембранном домене PTCRA получали посредством проведения двух этапов ПЦР с применением в качестве матрицы

pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), с применением в качестве прямого праймера GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и обратного праймера, описанного в табл. 8, для различных конструкций. После 1-го раунда ПЦР продукты ПЦР очищали, и второй раунд ПЦР проводили с GlnPr 1516 (SEQ ID NO: 9) в качестве прямого праймера и обратного праймера, описанного в табл. 8. Полученные в результате продукты ПЦР очищали, расщепляли с помощью ClaI и AgeI и лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов положительные конструкции готовили в масштабе мидипрепаратов и подтверждали посредством секвенирования. Номера серий соответствующих конструкций являлись следующими:

pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V-B7	GSC11216 (SEQ ID NO: 94)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_K13V-B7	GSC11203 (SEQ ID NO: 95)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_D18V-B7	GSC11211 (SEQ ID NO: 96)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V_K13V-B7	GSC11212 (SEQ ID NO: 97)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V_D18V-B7	GSC11398 (SEQ ID NO: 98)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_K13V_D18V-B7	GSC11208 (SEQ ID NO: 99)
pGLEX41_HC-I4-B7-PTCRA_R8V_K13V_D18V-B7	GSC11291 (SEQ ID NO: 100)

Замена трансмембранного домена B7-1 трансмембранными доменами различной длины, содержащими заряженные и/или полярные остатки.

Поскольку присутствие заряженных и остатков в трансмембранных доменах не препятствует экспонированию на поверхности (см. фиг. 12 в примере 4), длину трансмембранного домена оценивали с применением трансмембранных доменов, более коротких или более длинных, чем трансмембранный домен B7-1, и содержащих на этот раз один или более заряженных и/или полярных остатков.

Последовательности и характеристики данных трансмембранных доменов обобщены в табл. 9.

Таблица 9. Трансмембранные домены различной длины, содержащие заряженные и/или полярные остатки: характеристики и последовательности

Трансмембранный домен	Длина	Гидрофобных	Полярных	Заряженных	Последовательность	SEQ ID NO
B7	22	20	2	0	TLVLFAGFGAVITVVVIVVII	173
IL3RB	17	16	1	0	VLALIVIFLTIAVLLAL	196
FCERA	19	17	1	1	FFIPLLVVILFAVDITGLFI	194
KI2L2	19	17	2	0	ILIGTSVVILFILLFFLL	195
CD3E	26	18	7	1	VMSVATIVVDICITGGLLLLVYYWS	197
ITA2B	26	25	1	0	AIPIWWVLVGVLGLLLLTILVLAMW	198
CD28	27	23	4	0	FWVLVVVGVLACYLLVTVAFIIFWV	199
M1M2	27	16	10	1	LWTTITIFITLFLSVCYSATVTFFKV	200

Таблица 10. Конструкции GeneArt, использованные для клонирования трансмембранных доменов различной длины, содержащих заряженные и/или полярные остатки

Трансмембранный домен	Название GeneArt Seq	GeneArt SEQ ID NO
IL3RB	GeneArt_Seq 88	270
FCERA	GeneArt_Seq 89	271
KI2L2	GeneArt_Seq 90	272
CD3E	GeneArt_Seq 91	273
ITA2B	GeneArt_Seq 92	274
CD28	GeneArt_Seq 93	275
M1M2	GeneArt_Seq 80	262

Различные трансмембранные домены, названия которых указаны в табл. 10, заказывали в GeneArt. После получения конструкции GeneArt ресуспендировали в воде, а затем расщепляли с помощью AgeI и ClaI. Полученные в результате вставки лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепараты, которым присваивали следующие номера серий:

pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-FCERA-B7	GSC11297 (SEQ ID NO : 101)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-KI2L2-B7	GSC11298 (SEQ ID NO : 102)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-IL3RB-B7	GSC11393 (SEQ ID NO : 103)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-CD3E-B7	GSC11394 (SEQ ID NO : 104)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-ITA2B-B7	GSC11395 (SEQ ID NO : 105)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-CD28-B7	GSC11396 (SEQ ID NO : 106)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-M1M2-B7	GSC11389 (SEQ ID NO : 107)

Модификация длины трансмембранного домена B7-1.

С целью оценки влияния длины трансмембранного домена на экспонирование на поверхности были получены различные варианты трансмембранных доменов B7-1 посредством удаления или добавления гидрофобных остатков в середину последовательности трансмембранного домена B7-1.

Таблица 11. Модификация длины трансмембранного домена B7-1: последовательность и пары праймеров

Трансмембранный домен	Последовательность	SEQ ID NO	Праймеры
B7 (18)	TLVLFAGFGATVIVVII	201	GlnPr2395 (SEQ ID NO: 238) / GlnPr2394 (SEQ ID NO:237)
B7 (20)	TLVLFAGFGATVVIVVII	202	GlnPr2392 (SEQ ID NO: 235) / GlnPr2393 (SEQ ID NO:236)
B7 (24)	TLVLFAGFGAVVIVTVVVIVVII	203	GlnPr2396 (SEQ ID NO: 239) / GlnPr2397 (SEQ ID NO:240)
B7 (26)	TLVLFAGFGAVVIVVTVVVIVV II	204	GlnPr2398 (SEQ ID NO: 241) / GlnPr2399 (SEQ ID NO:242)

С данной целью проводили отжиг праймера. Для каждого варианта трансмембранных доменов B7-1 заказывали праймеры, которые отжигали на 3'-концах. Пары праймеров, использованные для каждой конструкции, описаны в табл. 11. Праймерам позволяли отжечься, а затем последовательность завершали методом ПЦР. После очистки полученные в результате продукты ПЦР непосредственно расщепляли с помощью SfoI и AgeI и клонировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP, или лигировали в челночный вектор pCR-blunt

(Zero Blunt® PCR Cloning Kit, Invitrogen, LifeTechnologies) (поскольку продукты отжига были очень короткими, непосредственное лигирование было возможно не для каждого продукта). Во 2-м случае мини-препараты экстрагировали из колоний, полученных после лигирования отожденного продукта в pCR-blunt (Zero Blunt® PCR Cloning Kit, Invitrogen, LifeTechnologies). После подтверждения последовательности положительные минипрепараты расщепляли с помощью SfoI и AgeI, и полученные фрагменты лигировали и клонировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов для каждой конструкции нарабатывали мидипрепараты. Данным мидипрепаратам присваивали номер серии GSC, описанный ниже, и препараты подтверждали посредством секвенирования.

pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-B7(18)-B7 GSC11677 (SEQ ID NO : 108)

pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-B7(20)-B7 GSC11679 (SEQ ID NO : 109)

pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-B7(24)-B7 GSC11484 (SEQ ID NO : 110)

pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-B7(26)-B7 GSC11292 (SEQ ID NO : 111)

Модификация цитозольного хвоста в трансмембранной области B7-1.

Поскольку цитозольный хвост (с сигналом экспорта из ЭР или без такового) может оказывать влияние на экспонирование на поверхности, разрабатывали несколько конструкций с модифицированными цитозольными хвостами.

Последовательности и характеристики данных цитозольных хвостов обобщены в табл. 12.

Таблица 12. Цитозольные хвосты: характеристики и последовательности

Цитозольный хвост	Сигнал экспорта из ЭР	Последовательность	SEQ ID NO.
B7	Да	KCFCKHRSCFRNEASRETNNSLTFGPPEALAEQT VFL	218
M1M2	?	KWIFSSVVDLKQTIIPDYRNMIGQGA	207
6His	Нет	ASAHNNHHH	205
KCFCK	Нет	KCFCK	206
ERGIC53	Да	RSQQEAAAKKFF	208
ERGIC53_noER	Нет	RSQQEAAAKKWW	209
GAT1	Да	MFLTLLKGLKQRLQVMIQPSDIVRPENGPEQPQA GSSASKEAYI	210
GAT1_noER	Нет	MFLTLLKGS	211
AGTR2	Да	CFVGNRFQQLRSVFRVPITWLQGKRETMSCRKSS SLREMDTFVS	212
AGTR2_noER	Нет	CFVGNRFQQLRSVFRVPITWLQGKRETMSCRKSS SLR	213
V1BR	Да	NSHLLPRPLRLHACCGGPQPRMRRRLSDGSLSSRH TTLTRSSCPATLSLSLTLSGRPRPEESPRDLELA DGEGETAETIIF	214
V1BR_noER	Нет	NSHEESPRDLELADGEGETAETIIF	215
VGLG	Да	CIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK	216
VGLG_noER	Нет	CIKLKHTKKRQIAAAAAANRLGK	217

Применяли различные стратегии клонирования в зависимости от длины различных конструкций.

Первые конструкции были получены методом ПЦР-амплификации интрона 4 cTNT с внеклеточным и трансмембранным доменами B7-1 с применением праймеров, модифицирующих цитозольный хвост.

Таблица 13. Пары праймеров и ферменты, использованные для модификации цитозольного хвоста

Цитозольный хвост	Пара праймеров	Ферменты
6His	GlnPr2377 (SEQ ID NO: 220) / GlnPr 1516 (SEQ ID NO:9)	HindIII / BstBI
KCFCK	GlnPr 2376 (SEQ ID NO: 219)/ GlnPr 1516 (SEQ ID NO:9)	HindIII / BstBI
GAT1_noER	GlnPr 2415 (SEQ ID NO: 258) / GlnPr 1516 (SEQ ID NO:9)	ClaI / BstBI

Использованные пары праймеров описаны в табл. 13, использованная матрица представляла собой pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55). Очищенные продукты ПЦР расщепляли ферментами, описанными в табл. 13, и клонировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепараты, которым присваивали следующие номера серий:

pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-B7-6His	GSC11207 (SEQ ID NO : 112)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-B7-KCFCK	GSC11209 (SEQ ID NO : 113)
pGLEX41-GBR200HC-I4-B7-B7-GAT1noER	GSC11483 (SEQ ID NO : 118)

Все миди-препараты подтверждали посредством секвенирования.

С целью слияния цитозольного хвоста M1M2 с трансмембранной областью B7-1 проводили слияние методом ПЦР. Интрон 4 cTNT с внеклеточными и трансмембранными доменами B7-1 амплифицировали с GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr2391 (SEQ ID NO: 234) с применением pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55) в качестве матрицы. Цитозольный хвост M1M2 с сигналом поли(A) SV40 амплифицировали с применением праймеров GlnPr2390 (SEQ ID NO: 233) и GlnPr1650 (SEQ ID NO: 19) с применением pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36) в качестве матрицы. После очистки оба продукта ПЦР сливали в 3-й ПЦР с применением GlnPr1516 (SEQ ID NO: 9) и GlnPr1650 (SEQ ID NO: 19) в качестве праймеров. Полученный в результате продукт ПЦР очищали, расщепляли с помощью SfoI и BstBI и лигировали в pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепарат pGLEX41_HC-I4-B7-B7-M1M2, которому присваивали номер серии GSC11758 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 114).

Для некоторых конструкций выбирали стратегию отжига праймера. Для каждого цитозольного хвоста заказывали праймеры, которые отжигали на 3'-конце. Пары праймеров, использованные для каждой конструкции, описаны в табл. 14. Праймерам позволяли отжечься, а затем последовательность завершали методом ПЦР. После очистки полученные в результате продукты ПЦР непосредственно расщепляли с помощью SfoI и BstBI и клонировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP, или лигировали в челночный вектор pCR-blunt (Zero Blunt® PCR Cloning Kit, Invitrogen, LifeTechnologies) (поскольку продукты отжига были очень короткими, непосредственное лигирование было возможно не для каждого продукта). Во 2-м случае мини-препараты экстрагировали из колоний, полученных после лигирования отожженного продукта в pCR-blunt (Zero Blunt® PCR Cloning Kit, Invitrogen, LifeTechnologies). После подтверждения последовательности положительные мини-препараты расщепляли с помощью SfoI и BstBI, и полученные фрагменты лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга мини-препарата для каждой конструкции нарабатывали мидипрепараты, которым присваивали номера серий GSC, представленные в табл. 14, и которые подтверждали посредством секвенирования.

Таблица 14. Пары праймеров, использованные для отжига праймера с целью модификации цитозольного хвоста, и номера серий ДНК

Цитозольный хвост	Праймеры	Номер серии мидипрепарата
ERGIC53	GlnPr2412 (SEQ ID NO: 255) / GlnPr2413 (SEQ ID NO:256)	GSC11764 (SEQ ID NO: 115)
ERGIC53_noER	GlnPr2412 (SEQ ID NO: 255) / GlnPr2414 (SEQ ID NO:257)	GSC11678 (SEQ ID NO: 116)

Наконец, последовательности для последней конструкции заказывали в GeneArt, названия последовательностей представлены в табл. 15. После получения конструкции GeneArt ресуспендировали в воде,

а затем расщепляли с помощью SfoI и BstBI. Полученные в результате вставки лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепараты, которым присваивали номера серий, подробно описанные в следующей таблице.

Таблица 15. Последовательности GeneArt, заказанные для модификации цитозольного хвоста, и номера серий ДНК

Цитозольный хвост	Последовательность GeneArt	SEQ ID NO GeneArt	Номер серии мидипрепарата
GAT1	GeneArt_Seq95	277	GSC11759 (SEQ ID NO: 117)
AGTR2	GeneArt_Seq 96	278	GSC11760 (SEQ ID NO: 119)
AGTR2_noER	GeneArt_Seq 97	279	GSC11761 (SEQ ID NO: 120)
V1BR	GeneArt_Seq 98	280	GSC11762 (SEQ ID NO: 121)
V1BR_noER	GeneArt_Seq 99	281	GSC11765 (SEQ ID NO: 122)
VGLG	GeneArt_Seq 100	282	GSC11766 (SEQ ID NO: 123)
VGLG_noER	GeneArt_Seq 101	283	GSC11763 (SEQ ID NO: 124)

Для дополнительной оценки влияния цитозольного хвоста B7-1 цитозольный хвост трансмембранного домена M1M2 заменяли цитозольным хвостом B7-1. С данной целью трансмембранный домен M1M2 с цитозольным хвостом B7-1 заказывали в GeneArt под названием GeneArt_Seq82 (SEQ ID NO: 264). Конструкцию GeneArt расщепляли с помощью ClaI и BstBI, и вставку лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепарат pGLEX41_HC-M1M2-M1M2-B7, которому присваивали номер серии плазмиды GSC11294 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 125).

Клонирование вектора для экспрессии легкой цепи антитела IgG1.

Вектор клонирования, полученный от GeneArt, несущий вставку легкой цепи (0704970pGA4), использовали в качестве матрицы для ПЦР с применением праймеров GlnPr501 (SEQ ID NO: 4) и GlnPr502 (SEQ ID NO: 5). Данные праймеры амплифицировали открытую рамку считывания легкой цепи и добавляли сайт рестрикции HindIII с 5'-конца и сайт рестрикции XbaI с 3'-конца от открытой рамки считывания. Ампликон расщепляли с помощью XbaI и HindIII и лигировали в челночный вектор, разрезанный с применением XbaI и HindIII. После скрининга минипрепаратов нарабатывали гигапрепарат, который подтверждали посредством секвенирования и расщепления.

Кодирующую область легкой цепи антитела формата IgG1 вырезали из данного гигапрепарата с помощью XbaI и HindIII и клонировали в скелет плазмиды pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), открытый с применением тех же ферментов и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали максипрепарат pGLEX41_LC ed, которому присваивали номер серии GSC315 (SEQ ID NO: 294) и который подтверждали посредством секвенирования. Впоследствии несколько серий той же ДНК нарабатывали на уровне мидипрепарата или гигапрепарата, которым присваивали номера серий GSC315a, GSC315b, GSC315c, GSC315d и GSC315e (поскольку все данные препараты подтверждали посредством секвенирования, в настоящей заявке в дальнейшем данные препараты называют плазмидой GSC315 (SEQ ID NO: 294)).

Клонирование вектора для экспрессии легкой цепи антитела IgG4.

Последовательность, кодирующую тяжелую цепь IgG4, нарабатывали в компании Glenmark и получали в челночном векторе. Последовательность, кодирующую тяжелую цепь IgG4, амплифицировали методом ПЦР с применением праймеров GlnPr1488 (SEQ ID NO: 328) и GlnPr1452 (SEQ ID NO: 327). После очистки полученный в результате продукт ПЦР повторно амплифицировали с применением праймеров GlnPr1494 (SEQ ID NO: 260) и GlnPr1452 (SEQ ID NO: 327). В ходе данных двух раундов ПЦР модифицировали лидерный пептид и добавляли сайты рестрикции на обоих концах кодирующей последовательности. Полученный в результате продукт ПЦР очищали и клонировали в челночный вектор pCR-blunt (Zero Blunt® PCR Cloning Kit, Invitrogen, LifeTechnologies). После скрининга минипрепаратов положительный клон расщепляли с помощью SpeI и ClaI для экстракции последовательности, кодирующей

тяжелую цепь IgG4. Полученную в результате вставку лигировали в pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), расщепляли с применением NheI и BstBI и обрабатывали CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали гигапрепарат pGLEX41_IgG4-HC, которому присваивали номер серии плазмиды GSB59 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 79).

Клонирование вектора для экспрессии тяжелой цепи антитела IgG4 на основе альтернативного сплайсинга, обеспечивающего экспрессию трансмембранной области B7-1.

С целью добавления кассеты альтернативного сплайсинга для экспрессии мембраносвязанного IgG4 кодирующую последовательность тяжелой цепи IgG4 амплифицировали методом ПЦР с помощью праймеров GlnPr1494 (SEQ ID NO: 260) и GlnPr2294 (SEQ ID NO: 261) с применением pGLEX41_IgG4-HC (GSB59, SEQ ID NO: 79) в качестве матрицы. Полученный в результате продукт ПЦР очищали, расщепляли с помощью SpeI и HindIII и лигировали в скелет pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный с применением NheI и HindIII и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепарат pGLEX41_IgG4-HC-B7-B7-B7, которому был присвоен номер серии плазмиды GSC11218 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 80).

Клонирование вектора для экспрессии легкой цепи антитела IgG4.

Последовательность, кодирующую легкую цепь IgG4, нарабатывали в компании Glenmark и получали в челночном векторе. С применением одного раунда ПЦР с тремя различными праймерами GlnPr1487 (SEQ ID NO: 325), GlnPr1491 (SEQ ID NO: 326) и GlnPr1494 (SEQ ID NO: 260) заменяли лидерный пептид и добавляли сайты рестрикции на обоих концах кодирующей последовательности. Продукт ПЦР расщепляли с помощью SpeI и ClaI и лигировали в скелет pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), открытый с применением NheI и BstBI и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали мидипрепарат pGLEX41_IgG4-LC, которому присваивали номер серии плазмиды GSC3704 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 319).

Клонирование вектора для экспрессии секретируемой тяжелой цепи биспецифичного антитела BEAT®.

Тяжелую цепь биспецифичного антитела нарабатывали в компании Glenmark в качестве части биспецифичного формата BEAT®. С применением двух раундов ПЦР добавляли последовательность Козака, сигнальный пептид и фланкирующие сайты рестрикции. В первом раунде матрицу амплифицировали с применением праймеров GlnPr1726 (SEQ ID NO: 24) и GlnPr1500 (SEQ ID NO: 7). Продукт ПЦР очищали и использовали в качестве матрицы для второго раунда ПЦР с применением праймеров GlnPr1500 (SEQ ID NO: 7) и GlnPr1725 (SEQ ID NO: 23). Полученный в результате ампликон очищали и вырезали с применением рестрикционных ферментов SpeI и ClaI. Данную вставку клонировали в скелет pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), открытый с применением NheI и BstBI и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали pGLEX41_BEAT-HC-His в масштабе мидипрепарата и получали серию номер GSC5607 (SEQ ID NO: 296). Контроль посредством секвенирования и расщепления рестриктазами позволил подтвердить плазмиду.

Данную плазмиду использовали в качестве матрицы для модифицирующей ПЦР с применением праймеров GlnPr1725 (SEQ ID NO: 23) и GlnPr1760 (SEQ ID NO: 27) с целью удаления His-метки из последовательности матрицы. Ампликон расщепляли с помощью SpeI и ClaI и клонировали в скелет вектора pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), открытый с применением рестрикционных ферментов NheI и BstBI и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов мидипрепарат pGLEX41_BEAT-HC, которому был присвоен номер серии плазмиды GSC5644, подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 49).

Клонирование вектора экспрессии на основе альтернативного сплайсинга для экспонированной на мембране тяжелой цепи биспецифичного антитела BEAT®. Матричный вектор, кодирующий тяжелую цепь BEAT (GSC5644, SEQ ID NO: 49), амплифицировали с применением праймеров GlnPr1800 (SEQ ID NO: 29) и GlnPr1725 (SEQ ID NO: 23). Очищенный продукт расщепляли с помощью рестрикционных ферментов SpeI и HindIII и клонировали в вектор pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), открытый с применением ферментов NheI и HindIII и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали максипрепарат pGLEX41_BEAT-HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2, которому присваивали номер серии плазмиды GSC5537 (SEQ ID NO: 50) и который подтверждали посредством расщепления рестриктазами и секвенирования.

С целью применения трансмембранной области B7-1 для экспонирования на поверхности вставку конструкции pGLEX41_BEAT-HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC5537, SEQ ID NO: 50) расщепляли с помощью SacI и HindIII и повторно клонировали в pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали максипрепарат pGLEX41_BEAT-HC-I4-B7-B7-B7, которому присваивали номер серии плазмиды GSC10488 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 321).

Клонирование вектора экспрессии для секретируемого биспецифичного антитела scFv-Fc. Последовательность scFv-Fc представляла собой последовательность собственной разработки, которая являлась частью биспецифичного формата BEAT®. Амплификацию проводили с применением праймеров

GlnPr1690 (SEQ ID NO: 22), GlnPr1689 (SEQ ID NO: 21) и GlnPr1502 (SEQ ID NO: 8). Данные праймеры добавляли в ампликон последовательность Козака, сигнальный пептид и сайты рестрикции. Продукт ПЦР повторно амплифицировали с применением праймеров GlnPr1689 (SEQ ID NO: 21) и GlnPr1502 (SEQ ID NO: 8), и полученный в результате ампликон расщепляли с применением NheI и ClaI. Данный фрагмент-вставку лигировали со скелетом pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), разрезанным с применением NheI и BstBI и обработанным CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали миди-препарат pGLEX41_scFv-Fc, которому присваивали номер серии GSC5608 (SEQ ID NO: 51) и который подтверждали посредством расщепления рестриктазами и секвенирования.

Клонирование вектора экспрессии на основе альтернативного сплайсинга для экспонирования биспецифичного антитела scFv-Fc на мембране.

Матричный вектор, кодирующий scFv (GSC5608, SEQ ID NO: 51), амплифицировали с применением праймеров GlnPr1801 (SEQ ID NO: 30) и GlnPr1689 (SEQ ID NO: 21). Очищенный продукт расщепляли с помощью NheI и HindIII и клонировали в вектор pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC3899, SEQ ID NO: 36), открытый с применением тех же ферментов и обработанный CIP. После скрининга мини-препаратов нарабатывали миди-препарат pGLEX41_scFv-Fc-I4-M1M2-M1M2-M1M2, которому присваивали номер серии плазмиды GSC5538 (SEQ ID NO: 52) и который подтверждали посредством расщепления рестриктазами и секвенирования.

С целью применения трансмембранной области B7-1 для экспонирования на поверхности вставку конструкции pGLEX41_scFv-Fc-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (GSC5537, SEQ ID NO: 50) расщепляли с применением NheI и HindIII и повторно клонировали в pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (GSC7056, SEQ ID NO: 55), расщепленный теми же ферментами и обработанный CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали максипрепарат pGLEX41_scFv-Fc-I4-B7-B7-B7, которому присваивали номер серии плазмиды GSC10487 и который подтверждали посредством секвенирования (SEQ ID NO: 323).

Клонирование вектора экспрессии для легкой цепи биспецифичного антитела.

Последовательность легкой цепи представляла собой последовательность, которая является частью биспецифичного формата BEAT®. Амплификацию проводили с применением праймеров GlnPr1689 (SEQ ID NO: 21), GlnPr1727 (SEQ ID NO: 25) и GlnPr1437 (SEQ ID NO: 6). Данные праймеры добавляли в ампликон сигнальный пептид, последовательность Козака и фланкирующие сайты рестрикции. Ампликон очищали, расщепляли с применением рестрикционных ферментов ClaI и NheI и клонировали в скелет челночного вектора, открытого с применением NheI и ClaI и обработанного CIP. После скрининга минипрепаратов нарабатывали максипрепарат, который подтверждали посредством секвенирования. Данный челночный вектор, кодирующий легкую цепь биспецифичной конструкции, расщепляли с применением рестрикционных ферментов NheI и ClaI, и вставку клонировали в вектор pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), открытый с применением NheI и BstBI и обработанный CIP. После скрининга мини-препаратов нарабатывали миди-препарат pGLEX41_BEAT-LC (номер серии плазмиды GSC5540, SEQ ID NO: 302), и плазмиду подтверждали посредством расщепления рестриктазами и секвенирования.

Пример 2. Экспонирование на поверхности и специфичное обнаружение транслированного продукта. Введение.

В примере 1 описано клонирование конструкций на основе альтернативного сплайсинга, которые приводили к экспрессии двух различных мРНК с одной матрицы ДНК, кодирующей секретируемый белок или тот же белок с С-концевой трансмембранной областью (ТМ). Как подробно описано в разделе определений, трансмембранная область содержит необязательный линкер, трансмембранный домен и необязательный цитоплазматический хвост. Клетки CHO-S трансфицировали данными конструкциями с целью определить, возможно ли использование данной технологии для экспонирования фракции белка на мембране клетки с одновременным поддержанием эффективной секреции целевого белка.

В данном эксперименте использовали три различных белка: антитело подкласса IgG1, антитело подкласса IgG4 и биспецифичное антитело формата BEAT®.

Материалы и методы.

Трансфекции.

Суспензию клеток CHO-S трансфицировали векторами экспрессии с применением полиэтиленимина (JetPEI®, Polyplus-transfection, Илькирш, Франция) в формате биореактора с объемом пробирки 50 мл (Tubespins, TPP). С данной целью клетки, которые находились в экспоненциальной фазе роста, высевали при плотности 2 Е6 клеток/мл в 5 мл среды OptiMEM (№ 31985-047, Invitrogen) или среды CD-CHO (№ 10743-011, Life Technologies). К клеткам добавляли комплекс TetPET® ДНК в массовом соотношении 3 (мкг/мкг). Конечная концентрация ДНК в суспензии клеток составляла 2,5 мкг/мл. Через 5 ч инкубации при температуре 37°C при встряхивании (200 об/мин) к суспензии клеток добавляли 5 мл свежей культуральной среды. Затем клетки инкубировали на встряхиваемой платформе при температуре 37°C при содержании CO₂ 5% и влажности 80%.

Поверхностное окрашивание.

Поверхностное окрашивание клеток проводили в день 1 после трансфекции. Суммарно собирали 1 Е5 клеток и переносили в круглодонную лунку 96-луночного планшета. Клетки дважды промывали про-

мывочным буфером (2% ЭБС, эмбриональная бычья сыворотка, в ФБР, фосфатном буферном растворе), а затем ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера, содержащего детектирующее антитело. Специфичное обнаружение легкой цепи каппа проводили с применением антитела мыши против легкой цепи каппа человека, меченного АФЦ (№ 561323, BD Pharmingen), который возбуждали красным лазером (640 нм) и обнаруживали в спектральной области 661/19 нм. Как тяжелую цепь, так и scFv-Fc обнаруживали с применением специфичного антитела козы против Fc-гамма человека, конъюгированного с ФЭ (№ 12-4998-82, eBioscience), который возбуждали голубым лазером (488 нм) и обнаруживали в спектральной области 583/26 нм, а scFv-Fc специфично обнаруживали с применением белка А, меченного ФИТЦ (№ P5145, Sigma), который возбуждали при 488 нм голубым лазером и обнаруживали в спектральной области 525/30. Через 20 мин инкубации в темноте при комнатной температуре клетки один раз промывали промывочным буфером и ресуспендировали в 200 мкл промывочного буфера для анализа методом проточной цитометрии. Клетки анализировали на проточном цитометре Guava (Merck Millipore) или FAC-SCalibur (Becton Dickinson).

Уровень временной экспрессии секретируемых молекул измеряли в день 4-6 после трансфекции с применением прибора Octet QK (ForteBio, Menlo Park, CA) и биосенсоров на основе белка А.

Результаты.

Для экспрессии антитела IgG1 клетки CHO-S трансфицировали, как описано в разделе "Материалы и методы", с применением вектора экспрессии pGLEX41_LC (SEQ ID NO: 294), экспрессирующего легкую цепь, и второго вектора под названием pGLEX41_HC-I4-B7-B7-B7 (SEQ ID NO: 55), pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (SEQ ID NO: 36), pGLEX41_HC-I4-PTCRA (SEQ ID NO: 40) или pGLEX41_HC-I4-M1M2-PTCRA-M1M2_corrected (SEQ ID NO: 284) соответственно. В качестве контроля использовали несплайсируемую конструкцию, кодирующую секретируемую тяжелую цепь (SEQ ID NO: 48).

После трансфекции клетки окрашивали, как описано в разделе "Материалы и методы", и анализировали методом проточной цитометрии. Отрицательный контроль, экспрессирующий секретируемый вариант легкой цепи и тяжелой цепи (альтернативный сплайсинг трансмембранной области отсутствовал), образовывал лишь незначительную интенсивность поверхностного окрашивания (см. незакрашенную гистограмму на фиг. 2А и 2Е, представляющую процент окрашенных клеток) с относительно высоким уровнем секреции IgG1 (см. фиг. 2F). В отличие от данных результатов в клетках, трансфицированных конструкциями, содержащими область M1M2 (SEQ ID NO: 36), наблюдалась значительная положительная популяция, экспонирующая антитело на мембране клетки (см. заполненную гистограмму на фиг. 2В). Замена всей трансмембранной области M1M2 трансмембранной областью PTCRA (см. фиг. 2С; SEQ ID NO: 40) или специфичная замена трансмембранного домена M1M2 трансмембранным доменом PTCRA (см. фиг. 2D; SEQ ID NO: 284) приводила к получению положительно, но слабо окрашенной популяции клеток. В случае трансмембранной области B7-1 мыши (см. фиг. 2А; SEQ ID NO: 55) наблюдался неожиданно высокий уровень окрашивания с 40% популяции, положительной в отношении экспонированного на мембране IgG1.

Альтернативный сплайсинг и, следовательно, мембраносвязанная экспрессия фракции общего наработанного антитела, как представляется, оказывает отрицательное влияние на титры секретируемого IgG. Несмотря на это трансмембранная область M1M2 (также в комбинации с трансмембранным доменом PTCRA) и, в особенности, трансмембранная область B7-1 обеспечила до 80% уровня секреции контрольной конструкции без альтернативного сплайсинга (см. фиг. 2F).

С целью экспрессии антитела IgG4 клетки CHO-S трансфицировали, как описано в разделе "Материалы и методы", с применением вектора экспрессии pGLEX41_IgG4-LC (SEQ ID NO: 319), экспрессирующего легкую цепь, и второго вектора, кодирующего тяжелую цепь с альтернативным сплайсингом трансмембранной области B7-1 для экспонирования на мембране (SEQ ID NO: 80). В качестве контроля использовали несплайсируемые конструкции, кодирующие секретируемую тяжелую цепь IgG4 (SEQ ID NO: 79).

После трансфекции клетки окрашивали, как описано в разделе "Материалы и методы", и анализировали методом проточной цитометрии. Отрицательный контроль, экспрессирующий секретируемый вариант легкой цепи и тяжелой цепи (без альтернативного сплайсинга трансмембранной области), образовывал исключительно отрицательную популяцию (см. фиг. 3А) со значительным уровнем секреции IgG4 - приблизительно 6 мкг/мл (см. фиг. 3С). В отличие от данных результатов клетки, трансфицированные конструкциями, содержащими область B7-1 (SEQ ID NO: 80), продемонстрировали значительную положительную популяцию, экспонирующую антитело на мембране клетки (см. гистограмму на фиг. 3А и процент окрашивания на фиг. 3В), тогда как уровень экспрессии остался на аналогичном уровне как с альтернативным сплайсингом, так и без него (см. фиг. 3С).

Для определения того, может ли биспецифичное антитело быть экспонировано на мембране клетки посредством трансмембранной области (ТМ), конструкции на основе альтернативного сплайсинга, описанные в примере 1, кодирующие биспецифичные антитела, временно экспрессировали в клетках CHO. В данном примере в качестве модельного белка использовали конструкции на основе альтернативного сплайсинга, которые кодируют формат биспецифичного антитела собственной разработки и которые описаны в международной заявке WO 2012/131555 (под названием "BEAT®"). Молекула BEAT пред-

ставляет собой тример тяжелой цепи IgG ("тяжелая цепь"), легкой цепи каппа ("легкая цепь") и scFv, слитого с константной областью тяжелой цепи ("scFv-Fc"). Сайт связывания белка А тяжелой цепи удаляли, так что связываться с белком А был способен лишь Fc-фрагмент scFv-Fc. Разработка молекулы и конструирование сайта связывания белка А тяжелой цепи обеспечивают специфичное обнаружение любой субъединицы тримера. Экспонирования на мембране клетки достигали посредством трансфекции клеток конструкцией на основе альтернативного сплайсинга тяжелой цепи или scFv-Fc либо посредством трансфекции обеими конструкциями на основе альтернативного сплайсинга. Мембраносвязанное биспецифичное антитело BEAT, экспонированное на поверхности отдельных клеток, специфично обнаруживали методом проточной цитометрии.

Затем векторы, кодирующие стандартные экспрессирующие конструкции, укорачивали до "pHC" в случае pGLEX41_BEAT-HC (SEQ ID NO: 49), "pLC" в случае pGLEX41_BEAT-LC (SEQ ID NO: 302) и "pScFv-Fc" в случае pGLEX41_scFv-Fc (SEQ ID NO: 51). Конструкцию на основе альтернативного сплайсинга, добавляющую трансмембранную область к HC, называют "pHC-M1M2" (pGLEX41_BEAT-HC-I4-M1M2-M1M2; SEQ ID NO: 50), и конструкцию, добавляющую трансмембранную область к scFv-Fc, называют "pScFv-Fc-M1M2" (pGLEX41_scFv-Fc-I4-M1M2-M1M2; SEQ ID NO: 52). Клетки котрансфицировали векторами экспрессии, кодирующими три субъединицы антитела BEAT, с применением экспрессирующих конструкций на основе альтернативного сплайсинга или стандартных экспрессирующих конструкций в различных комбинациях. Табл. 16 обобщены проведенные трансфекции и формы, которые, как ожидают, будут экспонированы на мембране клетки.

Таблица 16. Схема трансфекции и ожидаемые формы, экспонированные на мембране клетки

Трансфицирующие векторы	Ожидаемые формы, экспонированные на мембране клетки		
	Fc	LC каппа	scFv-Fc
pHC + pScFv-Fc + pLC	-	-	-
pHC-M1M2 + pScFv-Fc-M1M2 + pLC	+	+	+
pHC-M1M2 + pScFv-Fc + pLC	+	+	+
pHC + pScFv-Fc-M1M2 + pLC	+	+	+
pScFv-Fc-M1M1	+	-	+
pHC-M1M2 + pLC	+	+	-

Профили проточной цитометрии, полученные в день 1 после трансфекции, представлены на фиг. 4А и В. Первый коктейль для трансфекции (pHC+pScFv-Fc+pLC) не содержал конструкций с трансмембранной областью для экспонирования на мембране клетки. Таким образом, профили, полученные для данной трансфекции (фиг. 4А, D, G), считали отрицательным контролем для эксперимента; данные профили представлены на гистограммах в виде заштрихованного распределения.

Трансфекция вектором pScFv-Fc-M1M2 самим по себе позволяла получить исключительно положительные клетки в отношении окрашивания против Fc (обнаружение тяжелой цепи) и белка А (фиг. 4К, N, Q). В данном случае легкая цепь не была обнаружена на мембране клетки, что свидетельствует о специфичности анализа. Котрансфекция векторами pHC-M1M2 и pLC позволяла получить положительные клетки в отношении окрашивания против Fc и легкой цепи каппа, но связывания с белком А не наблюдалось (фиг. 4L, O, R). Данный результат согласовывается с тем фактом, что сайт связывания белка А в субъединице тяжелой цепи молекулы BEAT был удален. Следовательно, несмотря на то, что антитело против Fc-гамма человека не было специфичным к тяжелой цепи и также распознавало scFv-Fc, обнаружение легкой цепи позволило авторам изобретения сделать заключение об экспрессии тяжелой цепи.

Трансфекции, проведенные с коктейлями плазмид, кодирующими все три субъединицы, независимо от использованной конструкции на основе альтернативного сплайсинга, продемонстрировали экспрессию конструкции BEAT по меньшей мере с одной трансмембранной областью (фиг. 4В, С, J, E, F, M, H, I, P). Окрашивание являлось положительным в отношении легкой цепи и scFv-Fc, а также в отношении фрагментов Fc (тяжелой цепи и scFv-Fc); данный результат свидетельствует, что на мембране клетки присутствовали все ожидаемые формы. Следовательно, на мембране клетки присутствовали полностью свернутые мультимеры, что подтверждает эффективность репортерной системы для экспрессии мультимерных белков. Неожиданно были обнаружены все формы вне зависимости от положения трансмембранной области. В случаях, когда трансмембранная область (ТМ) была присоединена к тяжелой цепи (HC) и субъединице scFv-Fc (фиг. 4В, E, H), исключительно к HC (фиг. 4С, F, I) или исключительно к scFv-Fc (фиг. 4J, M, P), различия отсутствовали.

Вследствие этого подход, представленный в настоящей заявке, позволяет разделять гетеродимер (например, тяжелая цепь+scFv-Fc+легкая цепь) и гомодимеры (тяжелая цепь+легкая цепь или гомодимер scFv-Fc), экспонированные на мембране клетки. В контексте экспрессии мультимерных белков, таких как биспецифичные антитела, информация такого свойства является чрезвычайно полезной.

Концентрации секретируемого BEAT и гомодимера scFv-Fc измеряли на приборе Octet QK с применением биосенсоров на основе белка А в день 6 после трансфекции. Результаты представлены на фиг. 5. Как и ожидалось, в случае трансфекции с применением векторов экспрессии pHС-M1M2+pLC экспрессию на биосенсорах на основе белка А невозможно было измерять, поскольку полученный в результате продукт (гомодимер тяжелая цепь - легкая цепь) не связывается с белком А. В случае трансфекции с применением вектора экспрессии pScFv-Fc-M1M2 наблюдался более низкий уровень экспрессии по сравнению с контрольной трансфекцией, которая приводила к получению исключительно секретируемого продукта. В случае всех вариантов трансфекции молекулы BEAT или гомодимер scFv-Fc можно было обнаружить в супернатантах с применением конструкций на основе альтернативного сплайсинга. Данный факт подтверждает, что гетеротримеры BEAT не только экспонировались на мембране клетки, что было продемонстрировано ранее, но также успешно секретировались посредством секреторного пути клеток. Более важно, что уровни экспрессии, полученные с конструкцией на основе альтернативного сплайсинга, были сравнимы с контролем (pHС + pScFv-Fc + pLC). Данный результат свидетельствует, что лишь небольшая фракция белков отклоняется от секреторного пути для экспонирования на поверхности, поскольку значительное влияние на уровень секреции, которое можно было измерять в данной экспериментальной модели, отсутствовало.

Заключение.

На основании данных результатов можно заключить, что конструкции на основе альтернативного сплайсинга успешно направляли фракцию продуцированного антитела к мембране клетки посредством альтернативного сплайсинга. В то время как степень поверхностного окрашивания для конструкций, содержащих трансмембранный домен PTCRA, являлась низкой, для клеток, трансфицированных конструкциями, содержащими трансмембранную область M1M2, степень окрашивания являлась высокой, и даже большей в случае конструкций, содержащих трансмембранную область B7-1. Помимо силы сигнала, процент популяции клеток, который мог окрашиваться, был неожиданно высоким при трансфекции конструкциями B7-1, с учетом того, что трансмембранная область M1M2 была отобрана в процессе эволюции В-клеток для эффективного экспонирования антитела на мембране и, вследствие этого, должна была представлять наиболее эффективную конструкцию для экспонирования иммуноглобулинов на мембране.

Общий уровень экспрессии антитела уменьшался, когда часть секретируемого антитела перенаправлялась к мембране клетки, но с различными конструкциями было достигнуто приблизительно 80% уровня экспрессии несплайсированного контроля.

Молекулы с более чем двумя субъединицами можно успешно экспонировать на мембране клетки с применением конструкций на основе альтернативного сплайсинга согласно настоящему изобретению, что подтверждается примером конструкций BEAT®. В данных конструкциях трансмембранную область сливали с небольшой фракцией экспрессируемого белка. С применением биспецифичного антитела (BEAT) в качестве примера, значительных отличий уровня секреции по сравнению с контрольной трансфекцией, которая приводила к получению исключительно секретируемого белка, не наблюдалось. Тот факт, что влияние альтернативного сплайсинга на уровень экспрессии отсутствовало либо являлось лишь незначительным, делает данную технологию пригодной для промышленного применения. Более того, можно продемонстрировать, что подход, описанный в настоящей заявке, обеспечивал специфичное обнаружение мультимеров, экспонированных на мембране клетки. Неожиданно было установлено, что трансмембранную область можно добавить к тяжелой цепи или к scFv-Fc либо к обоим субъединицам, не оказывая влияния на экспонирование на поверхности или уровень экспрессии секретируемого белка. Поскольку мультимерные молекулы, экспонированные на мембране клетки посредством альтернативного сплайсинга, отражают состав продукта секретируемых мультимерных белков конкретной клетки, данная технология позволит проводить качественное прогнозирование профиля секреции на уровне одной клетки с применением цитометрии. Данный эксперимент продемонстрирован в примере 5.

Пример 3. Модуляция экспонирования на поверхности клетки и титра экспрессии посредством модификации последовательности интрона.

Введение.

Как продемонстрировано в примере 2, альтернативный сплайсинг трансмембранной области позволяет перенаправлять фракцию антитела, которая в противном случае является секретируемой, на поверхность клетки. Однако данная модификация процесса секреции может оказывать отрицательное влияние на уровень секреции антитела. Тонкая настройка соотношения сплайсинга между секретируемым и экспонированным на мембране антителом может способствовать восстановлению уровня экспрессии, наблюдаемого в случае несплайсированных конструкций антитела (без альтернативного сплайсинга трансмембранной области). Данный эксперимент продемонстрирован в следующем примере.

Материалы и методы.

Трансфекции.

Суспензию клеток CHO-S трансфицировали векторами экспрессии с применением полиэтиленимина (JetPEI®, Polyplus-transfection, Илькирш, Франция) в формате биореактора с объемом пробирки 50 мл (Tubespins, TPP). С данной целью клетки, которые находились в экспоненциальной фазе роста, высевали

при плотности 2 Е6 клеток/мл в 5 мл среды OptiMEM (№ 31985-047, Invitrogen). К клеткам добавляли комплекс JetPEI®:ДНК в массовом соотношении 3 (мкг/мкг). Конечная концентрация ДНК в суспензии клеток составляла 2,5 мкг/мл. Через 5 ч инкубации при температуре 37°C при встряхивании (200 об/мин) к суспензии клеток добавляли 5 мл свежей культуральной среды. Затем клетки инкубировали на встряхиваемой платформе при температуре 37°C при содержании CO₂ 5% и влажности 80%.

Поверхностное окрашивание.

Поверхностное окрашивание клеток проводили в день 1 после трансфекции. Суммарно собирали 1 Е5 клеток и переносили в круглодонную лунку 96-луночного планшета. Клетки дважды промывали промывочным буфером (2% ЭБС в ФБР), а затем ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера, содержащего детектирующее антитело. Специфичное обнаружение тяжелой цепи проводили с применением антитела козы против IgG человека, конъюгированного с ФЭ (№ 512-4998-82, eBioscience), который возбуждали голубым лазером (488 нм) и обнаруживали в спектральной области 583/26 нм. Через 20 мин инкубации в темноте при комнатной температуре клетки один раз промывали промывочным буфером и ресуспендировали в 200 мкл промывочного буфера для анализа методом проточной цитометрии. Клетки анализировали на проточном цитометре Guava (Merck Millipore) или FACSCalibur (Becton Dickinson). Уровень временной экспрессии секретируемых молекул измеряли в день 4-6 после трансфекции с применением прибора Octet QK (Fortebio, Menlo Park, CA) и биосенсоров на основе белка А.

Результаты.

Клетки CHO-S трансфицировали, как описано в разделе "Материалы и методы", с применением вектора экспрессии pGLEX41_LC (SEQ ID NO: 294), экспрессирующего легкую цепь, и второго вектора, кодирующего тяжелую цепь и содержащего модифицированные варианты интрона с трансмембранным доменом M1M2 (SEQ ID NO: 36-39), с трансмембранным доменом PTCRA (SEQ ID NO: 40-43), со слитым трансмембранным доменом M1M2-PTCRA (SEQ ID NO: 44-47) или с трансмембранным доменом B7-1 (SEQ ID NO: 53-56). В качестве контроля использовали секретируемую тяжелую цепь без альтернативного сплайсинга (SEQ ID NO: 48).

После трансфекции клетки окрашивали, как описано в разделе "Материалы и методы", и анализировали методом проточной цитометрии. Как уже наблюдалось в примере 2, отрицательный контроль, экспрессирующий секретируемый вариант легкой цепи и тяжелой цепи (без альтернативного сплайсинга трансмембранной области), образовывал лишь незначительную фракцию окрашенных клеток (см. фиг. 6) со значительным уровнем секреции IgG1 (см. фиг. 7). В отличие от данных результатов в клетках, трансфицированных конструкциями, содержащими область M1M2 (SEQ ID NO: 36, фиг. 6А) и трансмембранный домен B7-1 (SEQ ID NO: 55, фиг. 6М), наблюдалась значительная положительная популяция, экспонирующая антитело на мембране клетки. В случае трансмембранного домена PTCRA (SEQ ID NO: 40, фиг. 6Е) или слитого трансмембранного домена M1M2-PTCRA (SEQ ID NO: 44, фиг. 6I) положительная популяция была окрашена слабо.

Уменьшение содержания Y в поли(Y)-участке интрона, как было продемонстрировано, ослабляет акцептор сплайсинга, и данную модификацию проводили с целью смещения соотношения сплайсинга в сторону секретируемого антитела. В случае обеих трансмембранных областей использование которых приводило к успешному экспонированию (M1M2 и B7-1), конструкции без Y в поли(Y)-участке интрона (SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 53) не продемонстрировали поверхностного окрашивания клеток (см. фиг. 6В и N). Данный результат свидетельствует, что соотношение сплайсинга было преимущественно смещено в сторону секретируемого антитела.

Присутствие дополнительного поли(А)-сайта в интроне иммуноглобулина μ мыши в первичном транскрипте, как было продемонстрировано, оказывает влияние на событие альтернативного сплайсинга, что приводило к получению большей фракции секретируемого продукта (Galli et al., 1987) и меньшей - экспонированного на мембране антитела. На основании данного результата поли(А)-сайт SV40 вводили с 3'-конца от стоп-кодона секретируемого полипептида и с 5'-конца от точки разветвления интрона с целью смещения соотношения сплайсинга в сторону секреции антитела. С добавлением поли(А)-сайта SV40 в интрон уровень секреции антитела был значительно увеличен для конструкции M1M2 по сравнению с исходной 14 (см. фиг. 7). Наряду с этим фракция экспонированного на мембране антитела в случае конструкции M1M2 (см. фиг. 6С) была увеличена. Поскольку окрашивание клеток B7-1 уже было очень высоким, невозможно было сделать выводы относительно влияния поли(А) на экспонирование на мембране (см. фиг. 6О).

Сайт терминатора гастринина (который, как сообщается, терминирует транскрипцию мРНК) вводили непосредственно с 3'-конца от поли(А)-сайта кассеты экспрессии во избежание нарушения событий сплайсинга с другими акцепторами сплайсинга поблизости от кассеты экспрессии. Конструкция терминатора гастринина увеличивала фракцию экспонированного на мембране антитела, в особенности в случае конструкции на основе M1M2 (фиг. 6D), но не приводила к значительному увеличению уровня секреции. И вновь в случае клеток B7-1 сделать выводы было невозможно (фиг. 6Р).

Альтернативный сплайсинг и, следовательно, мембраносвязанная экспрессия части суммарного продуцированного антитела, как представляется, оказывает отрицательное влияние на общие титры сек-

ретируемого IgG. Несмотря на это трансмембранная область M1M2 (также в комбинации с трансмембранным доменом PTCRA) и, в особенности, трансмембранная область B7-1 обеспечили до 80% уровня секреции контрольной конструкции без альтернативного сплайсинга (см. фиг. 7). Более того, было обнаружено, что добавление в интрон поли(А)-сигнала является благоприятным для секреции IgG и одновременно поддерживает значительную степень окрашивания на мембране клетки. С другой стороны, терминатор гастрин оказывал лишь незначительное влияние на секрецию по сравнению с соответствующими эталонными конструкциями (см. фиг. 7).

В предыдущих экспериментах различные модификации последовательности интрона продемонстрировали аналогичное влияние на эффективность альтернативного сплайсинга, вне зависимости от трансмембранной области конструкции. Вследствие этого трансмембранную область B7-1 выбрали для дальнейшей характеристики влияния модификации последовательности интрона на соотношение альтернативного сплайсинга и уровень секреции антитела, поскольку использование данной области приводило к максимальным уровням окрашивания.

С целью уменьшения количества экспонированного на поверхности клетки антитела и восстановления уровня экспрессии контрольной конструкции соотношение сплайсинга было изменено в сторону секретируемого продукта, т.е. сайты донора сплайсинга и акцептора сплайсинга были ослаблены.

Поли(У)-участок, присутствующий в консенсусной последовательности акцептора сплайсинга, как известно, оказывает важное влияние на силу акцептора сплайсинга (чем короче поли(У)-участок, тем слабее акцепторный сайт сплайсинга). В предшествующем эксперименте было показано, что полное снижение содержания У в поли(У)-участке до нуля устраняет экспонирование антитела на поверхности клетки.

Поли(У)-участок нативного интрона 4 TNT курицы содержит 27 У. Клетки CHO-S трансфицировали рядом конструкций с модифицированными интронами, содержащими уменьшенные количества У в поли(У)-участке, описанными ранее (SEQ ID NO: 53, 55, 59-63). После поверхностного окрашивания и оценки уровня экспрессии с применением прибора Octet и биосенсоров на основе белка А можно однозначно определить влияние поли(У)-участка на экспонирование антитела на поверхности клетки: менее 9У в поли(У)-участке резко уменьшали процент окрашенных клеток (см. фиг. 8А, В, С, D, E, F, G, H), а также интенсивность окрашивания (см. фиг. 8А, В, С, D, E, F, G, J). К сожалению, данное уменьшение экспонирования на поверхности клеток не оказывало влияния на общий уровень экспрессии, который оставался для каждой конструкции более низким, чем у контроля (см. фиг. 8I).

Другим способом увеличения соотношения сплайсинга в сторону секретируемого продукта является уменьшение силы донора сплайсинга на 5'-конце альтернативно сплайсированного интрона посредством изменения последовательности ДНК донора сплайсинга. Можно получить две различные конструкции ДНК (SDCCC, SEQ ID NO: 58 и SD_GGC, SEQ ID NO: 57), кодирующие ту же аминокислотную последовательность, что и исходная конструкция, воспользовавшись преимуществом альтернативных кодонов, кодирующих одни и те же аминокислоты.

В то время как первая модификация консенсусной последовательности донора сплайсинга (SDCCC, SEQ ID NO 58) не оказывала эффекта на процент окрашенных клеток, интенсивность окрашивания или уровень экспрессии (см. фиг. 9), вторая модификация (SDGGC, SEQ ID NO: 57) вызвала резкое уменьшение экспонирования на поверхности (как процента, так и интенсивности, см. фиг. 9С, D и F). Данное уменьшение экспонирования на поверхности коррелировало с однозначным увеличением титра экспрессии до уровня контроля без альтернативного трансмембранного домена (см. фиг. 9Е). Более того, несмотря на то что экспонирование на поверхности клетки резко уменьшалось по сравнению с нативной последовательностью интрона 4 TNT курицы, по сравнению с контролем без трансмембранного домена наблюдалось значительное окрашивание (см. фиг. 9С).

Заклучение.

Терминатор гастрин увеличивал фракцию клеток, положительно окрашенных в отношении IgG на мембране клетки, в особенности в случае конструкции M1M2, но не приводил к более высокой экспрессии секретируемого IgG по сравнению со стандартной конструкцией. Вставка дополнительного поли(А) в интрон увеличивала фракцию экспонированного на мембране антитела в конструкциях M1M2 (в случае B7-1 сделать заключение было невозможно). Конструкция M1M2 с дополнительным поли(А) также продемонстрировала высокие уровни секретируемого IgG (до 80% от экспрессии несплайсированных контрольных конструкций).

Уменьшение поли(У)-участка, как ожидалось, ослабило акцептор сплайсинга и уменьшило экспрессию экспонированного на мембране варианта сплайсинга. Данный факт подтверждался для всех четырех различных основных конструкций (M1M2, PTCRA, M1M2-PTCRA и B7-1). Более того, было установлено, что уровень экспонирования на поверхности напрямую коррелировал с длиной поли(У)-участка, что иллюстрируют примеры с трансмембранным доменом B7-1. Было обнаружено, что в данном контексте минимум 5У в поли(У)-участке необходимы для значительного поверхностного окрашивания. Наряду с этим увеличение уровней экспрессии секретируемого антитела не могло быть обнаружено. Следовательно, смещение альтернативного сплайсинга не способствовало накоплению секретируемого продукта. Неожиданно было установлено, что специфичная модификация консенсусной последовательности доно-

ра сплайсинга позволила уменьшить уровень поверхностного окрашивания и при этом увеличить уровень секретируемого антитела. Уровень экспонирования на поверхности был достаточно низким, но все еще значительным по сравнению с контрольной конструкцией; было обнаружено, что уровень секреции был таким же, как в случае контроля.

Авторы настоящего изобретения считают, что частота события альтернативного сплайсинга определяется силой донорного сайта сплайсинга. Если соответствующий акцептор сплайсинга является достаточно сильным (более 5Y в поли(Y)-участке), альтернативный сплайсинг приведет к образованию альтернативной мРНК, кодирующей конструкцию с трансмембранной областью, - следовательно, экспонированную на мембране. Если акцептор сплайсинга ослаблен в результате уменьшения количества Y в поли(Y)-участке до менее 5Y, событие сплайсинга будет являться менее эффективным, и альтернативная пре-мРНК может деградировать, тогда как влияние на несплайсированную мРНК и, следовательно, на уровень секреции будет отсутствовать. В соответствии с этим после ослабления акцептора сплайсинга наблюдалось меньшее экспонирование на мембране, однако влияние на уровень секреции отсутствовало. С другой стороны, уменьшение силы донора сплайсинга может уменьшить частоту события альтернативного сплайсинга. Вследствие этого больше мРНК кодирует секретируемый продукт несплайсированной мРНК, что приводит к наблюдаемому увеличению количества секретируемого антитела. Сильный акцептор сплайсинга приводит к эффективному альтернативному сплайсингу мРНК, но с меньшей частотой в связи со слабым донором сплайсинга, чем можно объяснить наблюдаемое значимое, но слабое экспонирование на мембране.

В целом, модификации последовательностей донора сплайсинга и/или акцептора сплайсинга позволили провести модуляцию как уровня экспонирования на поверхности, так и уровня секреции антитела до уровня секреции антитела, экспрессируемого без альтернативного сплайсинга. Вследствие этого представленные конструкции позволяют осуществлять тонкую настройку экспонирования и секреции до желаемых уровней посредством корректирования эффективности альтернативного сплайсинга.

Galli G.I., Guise J., Tucker P.W., Nevins J.R. (1988). Poly(A) site choice rather than splice site choice governs the regulated production of IgM heavy-chain RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Apr; 85(8):2439-43.

Пример 4. Влияние трансмембранной области на экспонирование на поверхности клетки.

Введение.

Систему альтернативного сплайсинга для экспонирования фракции антитела, продуцированного клетками, на мембране можно изменить посредством изменения характеристик трансмембранной области. Например, можно предположить, что длина и структура трансмембранного домена может влиять на эффективность экспонирования на мембране. Более того, цитозольный хвост трансмембранной области может оказывать влияние на экспонирование на поверхности клетки посредством наличия или отсутствия сигнала экспорта из ЭР. В следующем примере авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что ни аминокислотный состав трансмембранного домена, ни его длина, ни цитозольный хвост трансмембранной области не оказывают решающего влияния на экспонирование на поверхности и секрецию.

Материалы и методы.

Трансфекции.

Суспензию клеток CHO-S трансфицировали векторами экспрессии с применением полиэтиленимина (JetPEI®, Polyplus-transfection, Илькирш, Франция) в формате биореактора с объемом пробирки 50 мл (Tubespins, TPP). С данной целью клетки, которые находились в экспоненциальной фазе роста, высевали при плотности 2 Е6 клеток/мл в 5 мл среды OptiMEM (№ 31985-047, Invitrogen). К клеткам добавляли комплекс JetPEI®:ДНК в массовом соотношении 3 (мкг/мкг). Конечная концентрация ДНК в суспензии клеток составляла 2,5 мкг/мл. Через 5 ч инкубации при температуре 37°C при встряхивании (200 об/мин) к суспензии клеток добавляли 5 мл свежей культуральной среды. Затем клетки инкубировали на встряхиваемой платформе при температуре 37°C при содержании CO₂ 5% и влажности 80%.

Поверхностное окрашивание.

Поверхностное окрашивание клеток проводили в день 1 после трансфекции. Суммарно собирали 1 Е5 клеток и переносили в круглодонную лунку 96-луночного планшета. Клетки дважды промывали промывочным буфером (2% ЭБС в ФБР), а затем ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера, содержащего детектирующее антитело. Специфичное обнаружение тяжелой цепи проводили с применением антитела козы против IgG человека, конъюгированного с ФЭ (№ 512-4998-82, eBioscience), который возбуждали голубым лазером (488 нм) и обнаруживали в спектральной области 583/26 нм. Через 20 мин. инкубации в темноте при комнатной температуре клетки один раз промывали промывочным буфером и ресуспендировали в 200 мкл промывочного буфера для анализа методом проточной цитометрии. Клетки анализировали на проточном питометре Guava (Merck Millipore) или FACSCalibur (Becton Dickinson). Уровень временной экспрессии секретируемых молекул измеряли в день 4-6 после трансфекции с применением прибора Octet QK (Fortebio, Menlo Park, CA) и биосенсоров на основе белка А.

Результаты.

Клетки CHO-S трансфицировали, как описано в разделе "Материалы и методы", с применением вектора экспрессии rGLEX41_LC (SEQ ID NO: 294), экспрессирующего легкую цепь, и второго вектора,

кодирующего тяжелую цепь с различными трансмембранными областями. В качестве контроля использовали секретируемую тяжелую цепь без альтернативного сплайсинга (SEQ ID NO: 48), в качестве положительного контроля использовали конструкцию с трансмембранной областью B7-1 (SEQ ID NO: 55).

После трансфекции клетки окрашивали, как описано в разделе "Материалы и методы", и анализировали методом проточной цитометрии.

Длина и состав трансмембранного домена.

С целью анализа влияния трансмембранного домена на экспонирование на поверхности клетки и уровни секреции антитела трансмембранный домен B7-1 заменяли трансмембранными доменами аналогичной длины (22-23 аминокислоты), содержащими исключительно гидрофобные остатки (см. SEQ ID NO: 81-86). Замена трансмембранного домена не оказывала влияния на экспонирование на поверхности клетки или секрецию антитела (см. фиг. 10).

Когда трансмембранный домен B7-1 заменяли трансмембранными доменами аналогичной длины (21-24 аминокислоты), содержащими не только гидрофобные остатки, но также полярные или заряженные остатки (SEQ ID NO: 87-93), влияния на экспонирование на поверхности или на секрецию не наблюдалось, за исключением трансмембранного домена, полученного из PTCRA (SEQ ID NO: 93). Данный трансмембранный домен не вызывал изменения фракции клеток, экспонирующих продукт на поверхности клетки, но резко уменьшал поверхностную плотность продукта без какого-либо влияния на уровень секреции (см. фиг. 11H, J, K и L). Трансмембранные домены окружены гидрофобной липидной фазой. Затраты энергии на введение ионогенной группы в гидрофобное окружение мембраны очень высоки, вследствие этого должна наблюдаться стойкая тенденция против заряженных аминокислот в трансмембранном домене (White and Wimley, 1999). Статистический анализ трансмембранной спирали подтвердил, что трансмембранные домены образованы преимущественно гидрофобными остатками аминокислот, в частности, в гидрофобном ядре трансмембранной области (Beza-Delgado, 2012). Основываясь на данных наблюдениях, авторы настоящего изобретения поставили целью определить влияние трех заряженных остатков (R8, K13 и D18, нумерация начинается от начала трансмембранной спирали) в трансмембранном домене PTCRA на наблюдаемую слабую интенсивность окрашивания. Разрабатывали несколько конструкций PTCRA, в которых различные заряженные остатки заменяли аминокислотой валином (одна из четырех наиболее часто встречающихся аминокислот в трансмембранном домене (Baeza-Delgado et al., 2012)), после чего указанными конструкциями трансфицировали клетки CHO-S (SEQ ID NO: 94-100). Результаты данной трансфекции подтвердили влияние заряженных остатков на интенсивность окрашивания поверхности. Мутация одной аминокислоты R8V (SEQ ID NO: 94), K13V (SEQ ID NO: 95) или D18V (SEQ ID NO: 96) позволила значительно увеличить плотность экспонированного на поверхности антитела, но не оказывала значительного влияния на уровень секреции антитела (см. фиг. 12B, C, D и J). Как и ожидалось, исходя из результатов единичных мутаций, комбинации 2 мутантных заряженных остатков (R8V и K13V (SEQ ID NO: 97), R8V и D18V (SEQ ID NO: 98) или K13V и D18V (SEQ ID NO: 99)) продемонстрировали такой же уровень экспонирования на поверхности и аналогичный уровень секреции, что и трансмембранный домен PTCRA (см. фиг. 12E, F, G и J). Наконец, мутация всех трех заряженных остатков на валин (SEQ ID NO: 100) привела, как и ожидалось, к высокой степени экспонирования на поверхности по сравнению с контролем. Неожиданно было установлено, что уровень экспрессии секретируемого антитела, а также процент окрашенных клеток в случае данной конструкции являлся незначительно меньшим (см. фиг. 12H и J). Причина уменьшения уровней секреции и окрашивания на сегодняшний день неизвестна.

Когда трансмембранный домен B7-1 заменяли более короткими трансмембранными доменами (17-19 аминокислот), содержащими не только гидрофобные остатки, но также полярный или заряженный остатки (SEQ ID NO: 101-103), можно было обнаружить различные эффекты. Полученные результаты представлены на фиг. 13. При том что трансмембранные домены FCERA (SEQ ID NO: 101) и KI2L2 (SEQ ID NO: 102) оказывали минимальный отрицательный эффект на процент окрашенных клеток (фиг. 13B, C и E), лишь трансмембранный домен, полученный из FCERA, оказывал отрицательное влияние на интенсивность окрашивания (фиг. 13C и G). Более того, оба трансмембранных домена (FCERA и KI2L2) оказывали минимальный благоприятный эффект на уровень секреции (фиг. 13F). С другой стороны, в случае трансмембранного домена из IL3RB (SEQ ID NO: 103) не наблюдалось изменений по сравнению с эталонной конструкцией B7-1 относительно процента окрашенных клеток и уровня секреции (фиг. 13D, E и F), и было зафиксировано лишь незначительное уменьшение интенсивности окрашивания (фиг. 13G). Данный факт делает короткие трансмембранные домены потенциальным инструментом для тонкой настройки продукта экспонирования на поверхности.

Когда трансмембранный домен B7-1 заменяли более длинными трансмембранными доменами, содержащими не только гидрофобные остатки, но также полярные или заряженные остатки (SEQ ID NO: 104-107), отсутствовал эффект как на процент окрашенных клеток, так и на интенсивность окрашивания по сравнению с эталонной конструкцией с трансмембранным доменом B7-1 (см. фиг. 14B, C, D, E, F и H). Несмотря на это секреция в случае всех данных трансмембранных доменов являлась незначительно лучшей, чем в случае B7-1 (см. фиг. 14G).

С целью оценки влияния длины трансмембранного домена более определенным образом без пере-

ключения с одного трансмембранного домена на другой разрабатывали конструкции с модифицированными трансмембранными доменами B7-1. Несколько гидрофобных аминокислот удаляли из гидрофобного центра трансмембранного домена B7-1 или добавляли в данный центр (SEQ ID NO: 108-111). Укорачивание B7-1 до 18 аминокислот (SEQ ID NO: 108) являлось благоприятным в отношении процента окрашенных клеток, но незначительно отрицательным в отношении интенсивности окрашивания (см. фиг. 15B, F и H). Три другие конструкции (20 (SEQ ID NO: 109), 24 (SEQ ID NO: 110) и 26 (SEQ ID NO: 111) аминокислот, соответственно) не оказывали значительного влияния на процент окрашенных клеток или интенсивность окрашивания (см. фиг. 14C, D, E, F и H). Относительно уровня секреции было установлено, что укорачивание длины трансмембранного домена является благоприятным, тогда как конструкции с удлиненным трансмембранным доменом продемонстрировали сравнимый уровень секреции, что и конструкции с нативным B7-1 (см. фиг. 14G). В целом, более короткий трансмембранный домен, как представляется, является благоприятным в отношении процента окрашенных клеток и в отношении секреции антитела, несмотря на то, что интенсивность окрашивания может незначительно уменьшаться по сравнению с более длинными трансмембранными доменами.

Цитозольный хвост.

Литературные данные свидетельствуют о наличии структурного нелинейного сигнала экспорта из ЭР в цитозольном хвосте B7-1 (Lin et al., 2013). Авторы настоящего изобретения установили, что наличие сигнала экспорта из ЭР в цитозольном домене трансмембранного белка, нацеленного на поверхность клетки, должно оказывать положительное влияние на количество белка на поверхности клеток. В случае белка с высокой степенью метаболизма ускоренный экспорт из ЭР к мембране может компенсировать протеолитическое расщепление в плазматической мембране.

С целью оценить, имеет ли отношение сигнал экспорта из ЭР к экспонированию на мембране в разработанной системе, цитозольный хвост B7-1 заменяли цитозольными хвостами нескольких трансмембранных белков, которые, как известно, содержат сигнал экспорта из ЭР, и делеционными мутантами без сигнала экспорта из ЭР (SEQ ID NO: 112-124).

Как представлено на фиг. 16P, было установлено, что отсутствие сигнала экспорта из ЭР оказывает незначительный благоприятный эффект на уровень секретируемого антитела, тогда как значительное влияние на процент окрашенных клеток (фиг. 16B-N и O) и интенсивность окрашивания (фиг. 16B-N и Q) отсутствовало. Следовательно, предложенное антитело, экспонированное на мембране, может не подвергаться быстрому метаболизму. В дополнение к данным конструкциям проводили замену цитозольного хвоста M1M2 цитозольным хвостом B7-1 в трансмембранном домене M1M2 (SEQ ID NO: 125). Как представлено на фиг. 17E, данная замена незначительно увеличивала интенсивность флуоресценции, но не оказывала влияния ни на процент окрашенных клеток (фиг. 17C), ни на уровень секреции (фиг. 17D).

Закключение.

Взятые вместе, полученные данные свидетельствуют, что длина или аминокислотный состав трансмембранных доменов в предложенной системе на основе альтернативного сплайсинга оказывают лишь минимальное влияние на уровень секреции антител и экспонирование продукта на мембране клетки. Наблюдалось незначительное смещение соотношения от секретируемого продукта в сторону продукта, экспонированного на мембране, которое можно использовать для тонкой настройки системы на основе альтернативного сплайсинга. Все конструкции обеспечивали значительное экспонирование антитела на поверхности, а также соответствующие уровни секреции. Интересно отметить, что наблюдалось значительное влияние трансмембранного домена на уровень флуоресценции экспонирования на поверхности клетки. Присутствие или отсутствие гидрофобных аминокислот позволило контролировать среднюю флуоресценцию и при этом не оказывало влияния на уровень секреции или процент клеток, демонстрирующих экспонирование на поверхности клетки. Сигнал экспорта из ЭР в цитоплазматическом хвосте, как было установлено, не является необходимым для экспонирования контрольного антитела на поверхности клетки. Минимального цитоплазматического хвоста, содержащего линкер глицин-аланин и 6 гистидинов или первые 5 аминокислот хвоста B7-1, было достаточно для экспонирования на поверхности клетки. Данное наблюдение может не являться справедливым в отношении других антител или белков, которые подвергаются быстрому метаболизму. Таким образом, цитозольный хвост может представлять собой интересный инструмент для корректировки экспонирования белка, представляющего интерес, на поверхности.

Взятые вместе, данные, полученные в примерах 2-4, свидетельствуют, что на уровень экспонирования на поверхности и уровень секреции влияют различные последовательности, вовлеченные в альтернативный сплайсинг и интеграцию мембраносвязанного белка в мембране. В то время как специфичная модификация донорного сайта сплайсинга обеспечивала восстановление того же уровня секреции, что и у контрольной альтернативно несплайсированной конструкции (см. пример 3, фиг. 9), поверхностное окрашивание значительно уменьшалось с применением трансмембранной области B7-1. С другой стороны, добавление поли(A) SV40 в интрон с применением трансмембранной области M1M2 увеличивало уровни как секреции, так и экспонирования на поверхности (см. пример 3, фиг. 6 и 7). Более того, модификации трансмембранных доменов B7-1, такие как уменьшение B7-1 до 18 или 20 аминокислот (см. фиг. 15), оказывали положительное влияние как на уровень секреции, так и на уровень экспонирования

на поверхности. Наконец, замена цитозольного хвоста B7-1 цитозольным хвостом, не содержащим сигнала экспорта из ЭР, такого как 6His или KCFCK, также улучшала как экспонирование на поверхности, так и уровни секреции. Наконец, влияние терминатора гастринина на конце кассеты экспрессии на экспрессию являлось положительным, и, возможно, даже более благоприятным при размещении в интроне. Вследствие этого конструкции, объединяющие данные различные свойства, могут являться еще более благоприятными, что обеспечит лучший уровень секреции в сочетании с высоким динамическим диапазоном экспонирования на поверхности клетки, желаемым для отбора клеток.

Скелетом данных конструкций является pGLEX41 (GSC281, SEQ ID NO: 304), и последовательности последних 5 аминокислот несплайсированной OPC на конце экспрессирующей конструкции приведены в виде последовательностей ДНК, а также последовательностей белка, начиная от тех же аминокислот, со слитой трансмембранной областью, в виде последовательности белка.

Таблица 17. Последовательности потенциальных конструкций (*)

Название конструкции	SEQ ID NO последовательности ДНК:	SEQ ID NO последовательности белка:
pGLEX41_HC-GGC-I4(polyA)-B7-B7(18)-6His	331	332
pGLEX41_HC-GGC-I4(polyA)-B7-B7(20)-6His	335	336
pGLEX41_HC-GGC-I4(polyA)-B7-B7(18)-KCFCK	333	334
pGLEX41_HC-GGC-I4(polyA)-B7-B7(20)-KCFCK	337	338
pGLEX41_HC-GGC-I4(SV40ter)-B7-B7(18)-6His	329	330
pGLEX41_HC-GGC-I4(SV40ter)-B7-B7(20)-6His	341	342
pGLEX41_HC-GGC-I4(SV40ter)-B7-B7(18)-KCFCK	339	340
pGLEX41_HC-GGC-I4(SV40ter)-B7-B7(20)-KCFCK	343	344

*В последовательностях приведены протяженности от последних 5 аминокислот несплайсированной OPC до конца экспрессирующей конструкции.

Публикации.

Lin Y., Chen B., Wei-Cheng Lu W., Chien-I Su C., Prijovich Z., Chung W., Wu P., Chen K., Lee I., Juan T. and Roffler S. (2013). The B7-1 Cytoplasmic Tail Enhances Intracellular Transport and Mammalian Cell Surface Display of Chimeric Proteins in the Absence of a Linear ER Export Motif PLoS One. Sep 20;8(9) Baeza-Delgado CI, Marti-Renom M.A., Mingarro I. (2012). Structure-based statistical analysis of transmembrane helices. Eur. Biophys. J. 2013 Mar; 42(2-3):199-207 White S.H. and Wimley W.C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28:319-65.

Пример 5. Качественное прогнозирование секреции продукта с применением альтернативного сплайсинга для экспонирования на поверхности.

Введение.

Трансфекция клеток является начальным этапом для установления стабильной клеточной линии с целью экспрессии рекомбинантного белка. По многим причинам (гетерогенность исходной популяции клеток, различные локусы интеграции плазмид в геном, различный посттрансляционный аппарат и эпигенетическая регуляция экспрессии) данный этап, как правило, приводит к гетерогенности популяций клеток в отношении экспрессии и уровня секреции, а также свойств качества продукта, таких как фолдинг белка, гликозилирование и другие посттрансляционные модификации. Биспецифичные антитела образованы четырьмя или менее различными субъединицами (2 тяжелые цепи и 2 легкие цепи), которые могут собираться во всех возможных комбинациях. В зависимости от интеграции плазмиды, регуляции транскрипции и трансляции, а также эффективности фолдинга в ЭР, конкретный клон может секретировать предпочтительно правильно собранный продукт вместо нежелательных побочных продуктов. Отбор клона с данным желаемым характером секреции требует проведения крупномасштабного скрининга и характеристики секретируемых белков. Уменьшение длительности скрининга, необходимого для получения клеточной линии, которая продуцирует продукт, представляющий интерес, и минимальное количество побочных продуктов, станет значительным достижением.

Ранее в примерах 2-4 было продемонстрировано, что с применением технологии альтернативного сплайсинга фракцию секретируемого белка можно отклонить от секреторного пути для экспонирования на мембране клетки. Также было показано, что специфичное обнаружение белков, экспонированных на мембране клетки, возможно посредством проточной цитометрии.

Целью данного примера являлась демонстрация того, что характер экспонирования продукта на мембране клетки позволяет спрогнозировать профиль секреции клона. Для достижения данной цели в качестве модели использовали гетеротримерное биспецифичное антитело BEAT®, представленное в примере 2. Данная молекула связывается с двумя различными растворимыми молекулами, далее называемыми "Мишенью 1" и "Мишенью 2". Схематичное изображение молекулы можно найти на фиг. 18,

структура А. Далее данную молекулу сокращенно называют "BEAT". После трансфекции секретируются не только молекулы BEAT, но также моноспецифичный димер тяжелая цепь - легкая цепь, связывающийся с "Мишенью 1". Данную молекулу называют гомодимером Fab (сокращенно "Fab-DIM"). Второй побочный продукт представляет собой моноспецифичный гомодимер scFv-Fc (сокращенно "scFv-Fc-DIM"), связывающийся с "Мишенью 2". Данные побочные продукты представлены на фиг. 18 в виде структур В и С.

После стабильной трансфекции клеток векторами экспрессии pGLEX41_BEAT-HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (SEQ ID NO: 50), pGLEX41_scFv-Fc-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (SEQ ID NO: 52) и pGLEX41_BEAT-LC (SEQ ID NO: 302) или pGLEX41_BEAT-LC (SEQ ID NO: 302), pGLEX41_scFv-Fc-I4-B7-B7-B7 (SEQ ID NO: 323) и pGLEX41_BEAT-HC-I4-B7-B7-B7 (SEQ ID NO: 321) клоны подвергали скринингу посредством поверхностного окрашивания. Для характеристики поверхностного фенотипа клеток использовали два подхода. Согласно первому подходу проводили двойное поверхностное окрашивание легкой цепи и Fc-фрагментов. Хотя данное окрашивание не позволяло проводить обнаружение всех продуцированных форм (различие между BEAT и Fab-DIM отсутствовало), данный подход позволил обнаружить моноспецифичное загрязняющее вещество scFv-Fc-DIM. Данный способ является универсальным для молекул BEAT любого типа. Второй подход являлся более специфичным и включал использование растворимых мишеней для обнаружения соответствующих связывающих плеч. В данном случае все три возможных продукта были однозначно обнаружены посредством поверхностного окрашивания.

Рекомбинантные пулы и клоны были получены посредством предельного разведения и сортировки клеток методом проточной цитометрии соответственно. Проводили периодическое культивирование или культивирование с подпиткой, и продукт, накопленный в супернатантах, анализировали методом капиллярного электрофореза. В конечном счете в супернатанте измеряли профиль секреции (фракция BEAT, Fab-DIM или scFv-Fc-DIM) по сравнению с профилем продукта, экспонированного на мембране рекомбинантных клеток.

Материалы и методы.

Установление стабильных пулов.

Стабильно трансфицированные клетки CHO получали посредством котрансфекции клеток ранее описанными векторами pGLEX41_BEAT-HC-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (сокращенно "pHC-M1M2"; SEQ ID NO: 50), pGLEX41_scFv-Fc-I4-M1M2-M1M2-M1M2 (сокращенно "pscFv-Fc-M1M2"; SEQ ID NO: 52) и pGLEX41_BEAT-LC (сокращенно "pLC"; SEQ ID NO: 302) для экспрессии биспецифичного гетеродимера BEAT вместе с двумя запатентованными векторами для экспрессии белка, обеспечивающими устойчивость к антибиотикам пурамицину и генетицину соответственно. Суспензию клеток CHO-S трансфицировали линейаризованными векторами с применением полиэтиленимина (JetPEI®, Polyplus-transfection, Илькирш, Франция) в формате биореактора с объемом пробирки 50 мл. С данной целью клетки, которые находились в экспоненциальной фазе роста, высевали при плотности 2 Е6 клеток/мл в 5 мл среды OptiMEM (№ 31985-047, Invitrogen). К клеткам добавляли комплекс JetPEI®:ДНК в массовом соотношении 3 (мкг/мкг). К клеткам добавляли ДНК в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. Через 5 ч инкубации клеток с комплексом JetPEI ДНК при температуре 37°C при встряхивании (200 об/мин) к суспензии клеток добавляли 5 мл культуральной среды PowerCHO2 (№ BE12-771Q, Lonza). Затем клетки инкубировали на встряхиваемой платформе при температуре 37°C при содержании CO₂ 5% и влажности 80%. Через один день после трансфекции клетки высевали в 96-луночных планшетах в различных концентрациях (0,7, 0,5 и 0,4 Е5 клеток/мл) в селективной среде, содержащей пурамицин (№ P8833-25mg, Sigma) и генетицин (№ 11811-098, Gibco) в концентрациях, обеспечивающих рост стабильных пулов. Через 14 дней отбора в статических условиях из лунок отбирали 15 продуцирующих стабильных пулов и переносили в биореакторы TubeSpin.

Установление рекомбинантных клонов.

Клоны получали посредством котрансфекции клеток ранее описанными векторами pGLEX41_BEAT-HC-I4-B7-B7-B7 (сокращенно "pHC-B7"; SEQ ID NO: 321), pGLEX41_scFv-Fc-I4-B7-B7-B7 (сокращенно "pscFv-Fc-B7"; SEQ ID NO: 323) и pGLEX41_BEAT-LC (сокращенно "pLC"; SEQ ID NO: 302) для экспрессии биспецифичного гетеродимера BEAT вместе с двумя запатентованными векторами для экспрессии белка, обеспечивающими устойчивость к антибиотикам пурамицину и генетицину соответственно.

Трансфекцию и отбор стабильных трансфектантов проводили, как было описано ранее. Через 14 дней отбора в статических условиях всех стабильных трансфектантов собирали, объединяли и перевивали в динамических условиях (орбитальное встряхивание) в течение недели. Сортировку отдельных клеток проводили с применением прибора FACSaria II посредством отбора живых клеток и исключения дублетов клеток в результате преобразования импульсов.

Окрашивание LC и Fc продукта, экспонированного на поверхности клетки.

Двойное поверхностное окрашивание легкой цепи (LC) и Fc-фрагмента на стабильных клетках проводили в день 2 после высевания серии, как подробно описано в примере 2. Вкратце, суммарно собирали

1 Е5 клеток и переносили в круглодонную лунку 96-луночного планшета. Клетки дважды промывали промывочным буфером (ФБР, содержащий 2% ЭБС), а затем ресуспендировали в 100 мкл детектирующего антитела. Специфичное обнаружение легкой цепи каппа проводили с применением антитела мыши против LC каппа человека, меченного АФЦ (№ 561323, BD Pharmingen), Fc-фрагменты обнаруживали с применением специфичного антитела козы против Fc-гамма человека, конъюгированного с ФЭ (№ 12-4998-82, eBioscience). Через 20 мин инкубации в темноте при комнатной температуре клетки один раз промывали промывочным буфером и ресуспендировали в 200 мкл буфера для анализа методом проточной цитометрии. Клетки анализировали на проточном цитометре Guava (Merck Millipore).

Окрашивание специфичных связывающих сайтов, экспонированных на поверхности клеток.

В случае данного окрашивания для обнаружения связывающих плеч молекулы, экспонированной на поверхности клетки, использовали растворимые мишени. Вкратце, суммарно собирали 1 Е5 клеток и переносили в круглодонную лунку 96-луночного планшета. Клетки дважды промывали промывочным буфером (ФБР, содержащий 2% ЭБС), а затем ресуспендировали в 100 мкл смеси биотинилированной Мишени 1 и Мишени 2, меченной меткой His. Через 20 мин инкубации в темноте при комнатной температуре клетки дважды промывали промывочным буфером и ресуспендировали в 100 мкл смеси, содержащей стрептавидин, конъюгированный с АФЦ (№ 554067, BD Pharmingen), и антитело против метки His, меченное ФЭ (№ IC050P, RD Systems). Через 20 мин инкубации в темноте при комнатной температуре клетки один раз промывали промывочным буфером и ресуспендировали в 200 мкл буфера для анализа методом проточной цитометрии на проточном цитометре Guava (Merck Millipore).

Анализ профиля секреции клетки.

Рекомбинантные пулы высевали в биореакторы TubeSpin при плотности клеток 0,5 Е6 клеток/мл в среде роста с добавками (PowerCHO2, 2 mM L-Глутамин, 8 mM Glutamax (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), 15% Efficient Feed A (Life Technologies), 15% Efficient Feed B (Life Technologies)). Клоны высевали в биореакторы TubeSpin при плотности клеток 0,5 Е6 клеток/мл в среде роста (PowerCHO2, 2 mM L-Глутамин), и ежедневно проводили подпитку ActiCHO Feed A & B (№ U050-078, PAA Laboratories GmbH). В день 14 супернатанты культур периодического культивирования или культивирования с подпиткой собирали посредством центрифугирования и фильтровали с применением шприцевого фильтра с размером пор 0,2 мкм (№ 99722 TPP). Неочищенные супернатанты непосредственно анализировали или очищали с применением бусин с белком A Streamline (№ 17-1281-02, GE). Белки анализировали с применением системы для анализа белка Caliper LabChip GXII. Различные формы обнаруживали на основании молекулярной массы, и определяли фракцию каждого продукта.

Результаты.

После трансфекции конструкциями pHNC-M1M2, pScFv-Fc-M1M2 и pLC в сумме было получено 15 стабильных пулов. Культивирование серий с подпиткой начинали с целью определения профиля секреции данных пулов. Двойное поверхностное окрашивание легкой цепи и Fc-фрагментов (scFv-Fc и тяжелая цепь) в пулах проводили в день 2 после высевания серии. На фиг. 19 приведен пример профиля поверхности одного из пулов, измеренного посредством двойного окрашивания в день 2 культивирования серии с подпиткой. На точечной диаграмме представлена интенсивность окрашивания LC каппа (ось y) по сравнению с интенсивностью окрашивания Fc человека (ось x). Квадрант определяет произвольные пределы между отрицательно и положительно окрашенными клетками. Квадрант Q8 представляет фракцию клеток, не экспрессирующих белок на мембране клетки, например, субпопуляцию непродуцентов. Q7 представляет собой фракцию клеток, положительных в отношении Fc-фрагмента, но отрицательных в отношении LC каппа, т.е. фракцию, соответствующую клеткам, экспонирующим scFv-Fc-DIM на мембране. Двойные положительные клетки, в Q6, представляют собой клетки, экспонирующие на мембране как Lc, так и Fc-фрагменты, например молекулы BEAT или Fab-DIM.

Анализ выявил гетерогенную популяцию клеток, состоящую из 33,8% непродуцентов (Q8), 50,3% клеток, секретирующих scFv-Fc-DIM (Q7), и 15,8% клеток, потенциально секретирующих BEAT или Fab-DIM (Q6). Для расчета корреляции между поверхностным окрашиванием и секретируемым продуктом учитывали исключительно продуцирующую популяцию. Следовательно, фракцию продуцентов BEAT и Fab-DIM, а также фракцию продуцентов scFv-Fc-DIM в пределах фракции продуцирующих клеток (Q6+Q7), рассчитывали заново, за исключением непродуцирующей фракции Q8 (данные фракции называют Q6* и Q7*). В анализе, результаты которого представлены на фиг. 17, например, популяции рассчитывали следующим образом:

$$Q6^* = Q6 / (Q6 + Q7) = 23,9\% \text{ и}$$

$$Q7^* = Q7 / (Q6 + Q7) = 76,1\%.$$

Данный анализ проводили для всех 15 продуцирующих стабильных пулов и использовали для получения корреляции, представленной на фиг. 20.

Фракцию продуцентов BEAT, Fab-DIM и scFv-Fc-DIM можно обнаружить с применением поверхностного окрашивания в соответствии с экспонированием форм на мембране клетки посредством альтернативного сплайсинга. Затем результаты сопоставляли с фактическим профилем секреции анализируемых пулов. С данной целью супернатанты 15 продуцирующих стабильных пулов очищали в день 14 с применением белка А, и каждую секретируемую молекулу обнаруживали на основании молекулярной

массы и количественно определяли с применением системы для анализа белка Caliper LabChip GXII. Следует отметить, что в данных условиях очистки лишь формы, связывающие белок А, а именно молекулы BEAT и scFv-Fc-DIM, очищаются из супернатанта, поскольку в молекулах Fab-DIM отсутствует сайт связывания белка А. На фиг. 20 представлено соотношение между процентом секретируемых молекул и соответствующей фракцией клеток, обнаруженной посредством поверхностного окрашивания.

Полученные данные свидетельствуют, что экспонирование на поверхности и профиль секреции в высшей степени коррелируют ($R^2=0,9$) как в случае секреции BEAT, так и в случае scFv-Fc-DIM. Природа данного взаимодействия, однако, является нелинейной. Отсутствие линейной регрессии можно объяснить тем фактом, что поверхностное окрашивание, проводимое в данном эксперименте, не позволяло разделять BEAT и Fab-DIM, тогда как из очищенных секретируемых продуктов была исключена фракция Fab-DIM. Процент секретируемых BEAT и scFv-Fc-DIM в супернатанте может быть незначительно завышен. Несмотря на это эксперимент однозначно продемонстрировал, что чем выше фракция клеток, положительных в отношении экспонирования конкретной молекулы на поверхности, тем большей является фракция данной молекулы в супернатанте. В данном примере фракция секретируемой молекулы BEAT увеличивалась линейно, когда исследуемые стабильные пулы характеризовались процентом положительных клеток свыше 20%. Отбор стабильного пула, который содержит более 75% двойных положительных клеток (Q6), позволит осуществить отбор секретирующей популяции клеток, обеспечивающей выход желаемой молекулы BEAT более 90%. Для клональной популяции, несущей двойной положительный фенотип, например, 100% популяции клеток, положительных в отношении поверхностного окрашивания как LC, так и Fc, разумно ожидать еще большую фракцию секреции BEAT, которая достигает приблизительно 100%.

С целью увеличения чувствительности способа и демонстрации линейной взаимосвязи между экспонированием на поверхности и характером секреции применяли различные способы обнаружения, включая использование растворимой мишени в качестве детектирующего реактива. Таким образом, все 3 возможных продукта были однозначно обнаружены на основании характеров связывания последних. На фиг. 21 представлен пример профиля поверхности пула, измеренный перед сортировкой клеток. Точечная диаграмма представляет поверхностную плотность клеток сайта связывания для Мишени 1 (ось y) по сравнению с поверхностной плотностью клеток сайта связывания для Мишени 2 (ось x). Квадрант определяет произвольные пределы между отрицательно и положительно окрашенными клетками. Q1 представляет собой фракцию клеток, положительных в отношении связывания Мишени 1, но отрицательных в отношении связывания Мишени 2, т.е. фракцию, соответствующую клеткам, экспонирующим Fab-DIM на мембране. Двойные положительные клетки, в Q2, представляют собой клетки, экспонирующие сайты связывания как для Мишени 1, так и для Мишени 2, на мембране клетки, и, таким образом, соответствующие клеткам, экспонирующим BEAT на мембране. Q3 представляют собой клетки, экспонирующие исключительно сайты связывания для Мишени 2, и, таким образом, соответствующие scFv-Fc-DIM. Квадрант Q4 представляет фракцию клеток, не экспрессирующих белок на мембране, например, субпопуляцию непродуцентов. Поскольку данные клетки не вносят вклад в секрецию антитела, такие клетки исключали из анализа.

Все продуцирующие клоны (28), полученные в результате сортировки клеток методом проточной цитометрии, после трансфекции конструкциями pHNC-B7, pScFv-Fc-B7 и pLC анализировали с применением данного подхода. Как было описано ранее, фракцию продуцентов BEAT, Fab-DIM и scFv-Fc-DIM можно обнаружить с применением поверхностного окрашивания на основании форм, экспонированных на мембране клетки, посредством альтернативного сплайсинга. Фактические профили секреции каждого клона определяли в день 14 подпитываемой культуры непосредственно в супернатанте с применением системы для анализа белка Caliper LabChip GXII. На фиг. 22 представлена корреляция между фракцией молекулы BEAT, обнаруживаемой в супернатантах, и фракцией клеток, экспонирующих фенотип BEAT на своей поверхности (% от Q2). С применением данного специфичного окрашивания была получена хорошая линейная корреляция ($R^2=0,8$). Полученные данные однозначно свидетельствуют, что способность клона секретировать молекулу BEAT можно прогнозировать на основании набора продуктов, обнаруженного на мембране клетки.

Закключение.

В данном примере было продемонстрировано, что технология альтернативного сплайсинга в сочетании с экспонированием на мембране клетки является эффективной репортерной системой для качественного прогнозирования профиля секреции отдельных клеток. Однозначная корреляция была установлена между экспонированным на мембране клетки набором продуктов и фактическим профилем секреции трансфицированных клеток с применением общепринятых способов обнаружения на основе поверхностного обнаружения LC и Fc или с применением способа продукт-специфичного окрашивания с помощью растворимых молекул-мишеней. Данный подход не требует ни времязатратного скрининга характеристик клеток в периодической или подпитываемой культурах, ни сбора, очистки и крупномасштабной характеристики секретируемого продукта.

В заключении, репортерная система, описанная в настоящей заявке, обеспечивает достоверный высокопроизводительный инструмент для скрининга клонов клеток, несущих конкретный профиль секре-

ции гетеротримерных молекул.

Помимо качественного прогнозирования профилей секреции, значительный интерес представляет количественное прогнозирование уровня секреции конкретного клона клеток для разработки клеточных линий. В следующем примере проводили исследование того, коррелирует ли уровень мембраносвязанного экспонированного на поверхности продукта с применением подхода альтернативного сплайсинга с уровнем секреции клона.

Пример 6. Количественное прогнозирование уровня секреции с применением альтернативного сплайсинга для экспонирования на поверхности.

Введение.

Большой проблемой процесса разработки клеточной линии является проведение отбора высокопроизводительных клонов с минимальными затратами времени, например, клонов с высокой степенью секреции рекомбинантного белка хорошего качества. Ранее было продемонстрировано, что экспонирование на мембране клетки фракции экспрессированного белка посредством альтернативного сплайсинга демонстрирует фактический качественный профиль секреции клона. В данном примере будет продемонстрировано, что уровень экспонирования на мембране клетки количественно коррелирует с уровнем секреции клона и что высокопроизводительные клетки можно отобрать на основе интенсивности экспонирования на поверхности.

Материалы и методы.

Разработка стабильной клеточной линии.

Стабильно трансфицированные клетки CHO получали в результате котрансфекции векторами pGLEX41_HC-I4-M1M2-M1M2 (SEQ ID NO: 36) и pGLEX41_LC (SEQ ID NO: 294) для экспрессии гуманизированного антитела IgG1 вместе с двумя запатентованными векторами для экспрессии белка, обеспечивающими устойчивость к антибиотикам пурамицину и генетицину соответственно.

Суспензию клеток CHO-S трансфицировали линейаризованными векторами с применением поли-этиленимина (JetPEI®, Polyplus-transfection, Илькирш, Франция) в формате биореактора с объемом пробирки 50 мл. С данной целью клетки, которые находились в экспоненциальной фазе роста, высевали при плотности 2 E6 клеток/мл в 5 мл среды OptiMEM (№ 31985-047, Invitrogen). К клеткам добавляли комплекс TetPFI® ДНК в массовом соотношении 3 (мкг/мкг). К клеткам добавляли ДНК в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. Через 5 ч инкубации клеток с комплексом JetPEI®:ДНК при температуре 37°C при встряхивании (200 об/мин) к суспензии клеток добавляли 5 мл культуральной среды PowerCHO2 (№ BE12-771Q, Lonza). Затем клетки инкубировали на встряхиваемой платформе при температуре 37°C при содержании CO₂ 5% и влажности 80%. Через один день после трансфекции клетки высевали в 96-луночных планшетах при различных концентрациях (0,7, 0,5 и 0,4 E5 клеток/мл) в селективной среде, содержащей 4 мкг/мл пурамицина (№ P8833-25 mg, Sigma) и 400 мкг/мл генетицина (№ 11811-098, Gibco). Через 14 дней отбора в статических условиях из лунок отбирали 15 продуцирующих стабильных пулов и наращивали в биореакторах TubeSpin для оценки уровня экспрессии.

Оценка уровня экспрессии.

Серии культивирования с добавками высевали при плотности клеток 0,5 E6 клеток/мл в PowerCHO2 (№ BE12-771Q, Lonza) с добавками 2 mM L-Глутамина, 8 mM Glutamax, 15% Efficient Feed A (№ A1023401, Invitrogen) и 15% Efficient Feed B (№ A1024001, Invitrogen). Число жизнеспособных клеток (ЧЖК) и жизнеспособность контролировали в дни 1, 3 и 7 с применением анализа ViaCount на проточном цитометре Guava. Титры IgG измеряли в день 1, 3 и 7 с применением прибора Octet QK. Удельную продуктивность qP стабильных пулов рассчитывали между днем 1 и днем 3 по следующей формуле:

$$qP = \frac{\Delta \text{IgG}_{\text{д}3-\text{д}1}}{\Delta t_{\text{д}3-\text{д}1}} \times \frac{1}{\text{ЧЖК}_{\text{среднее д}1-\text{д}3}}$$

где qP - удельная скорость секреции или продуктивность [пг/клетку/день];

IgG - титры IgG в [пг/мл] в день 3 и 1;

t - время культивирования [дни];

ЧЖК_{среднее д1-д3} - среднее число жизнеспособных клеток между днем 1 и днем 3 [клеток/мл].

Количественное определение IgG, экспонированных на мембране клетки, проводили в день 1 в течение фазы экспоненциального роста, как описано ниже.

Окрашивание клеток.

Окрашивание Fc-фрагментов на стабильных пулах проводили в день 1 после высевания серии. Вкратце, суммарно собирали 1 E5 клеток и переносили в круглодонную лунку 96-луночного планшета. Клетки дважды промывали промывочным буфером (ФБР, содержащий 2% ЭБС) и ресуспендировали в 100 мкл детектирующего антитела. Специфичное обнаружение Fc-фрагментов проводили с применением специфичного антитела козы против Fc-гамма человека, конъюгированного с ФЭ (№ 12-4998-82, eBioscience). Через 20 мин инкубации в темноте при комнатной температуре клетки один раз промывали промывочным буфером и ресуспендировали в 200 мкл буфера для анализа методом проточной цитометрии. Клетки анализировали на проточном цитометре Guava.

Сортировка клеток методом проточной цитометрии.

Клоны получали посредством сортировки клеток методом проточной цитометрии из гетерогенного пула стабильных трансфектантов, установленных, как было описано ранее (см. раздел "Разработка стабильной клеточной линии"). С данной целью проводили поверхностное окрашивание Fc-фрагмента согласно протоколу, описанному ранее. Сортировку проводили с применением прибора FACSAria II с помощью отбора живых клеток и исключения дублетов клеток в результате преобразования импульсов. Три группы были определены в соответствии с интенсивностью поверхностной флуоресценции ("низкая", "средняя" и "высокая"), и отдельные клетки переносили в 96-луночные планшеты, содержащие по 200 мкл среды клонирования. Через 2 недели роста в статических условиях клетки переносили в динамические условия, и характеристики отобранных клонов оценивали, как было описано ранее.

Результаты.

Анализ профиля поверхностного окрашивания стабильного пула проиллюстрирован на фиг. 23. Поверхностную флуоресценцию живых клеток, отобранных в области g1 (фиг. 23, профиль A), отражали в виде гистограммы (фиг. 23, график B), и вычисляли среднюю флуоресценцию распределения (среднее [ОЕФ], относительные единицы флуоресценции). Среднюю флуоресценцию используют в качестве показателя уровня IgG, экспрессированного на мембране клетки. Данный анализ проводили для всех полученных стабильных пулов, и измеряли уровень поверхностного IgG по сравнению с фактическим уровнем секретируемых IgG в супернатанте.

На фиг. 24 представлена корреляция между интенсивностью поверхностной флуоресценции и уровнем секреции всех стабильных пулов, измеренным в день 1 культивирования с подпиткой. Хорошая корреляция ($R^2 > 0,8$) наблюдалась между поверхностной экспрессией и титрами IgG (фиг. 24, график A), а также между поверхностной экспрессией и удельной продуктивностью IgG (фиг. 24, график B). Полученные данные свидетельствуют, что экспрессия на поверхности альтернативно сплайсированного трансмембранного IgG обеспечивала получение информации о фактическом уровне секреции стабильно трансфицированных клеток. Подобная высокая корреляция ($R^2 > 0,8$) наблюдалась между поверхностной флуоресценцией пулов в день 1 и объемной продуктивностью в день 7 периодического процесса культивирования (см. фиг. 25; в данной серии день 7 соответствует концу стационарной фазы). Полученные данные свидетельствуют, что характеристики пулов в конце периодического процесса культивирования можно предсказать на ранних стадиях на основании обнаруженной поверхностной экспрессии IgG. При периодическом процессе культивирования физиологическое состояние клеток постоянно изменяется в соответствии с изменением окружающей среды. Вследствие этого корреляция между экспонированием на поверхности репортерного IgG посредством альтернативного сплайсинга и фактическим уровнем секреции при периодическом процессе культивирования не зависит от физиологического состояния клеток (стадии экспоненциального роста или стационарной стадии) и фазы периодического процесса культивирования (роста или продукции).

Для проверки данной гипотезы клоны получали посредством сортировки клеток методом проточной цитометрии в зависимости от плотности антитела, экспонированного на поверхности клеток. С данной целью проводили окрашивание стабильного пула в отношении поверхностного IgG с применением антитела против Fc человека, меченного ФЭ. В соответствии с интенсивностью поверхностной флуоресценции были определены три области ("низкая", "средняя" и "высокая"), и отдельные клетки соответствующим образом клонировали в 96-луночных планшетах. Стратегия отбора представлена на фиг. 26A. Приблизительно через две недели клоны размножали, и поверхностную интенсивность клеток определяли снова, чтобы подтвердить, что после клонирования был получен действительно отсортированный фенотип. Распределение поверхностной интенсивности всех клонов представлено на фиг. 26B. В целом, сортировка была успешной, поскольку распределение поверхностного IgG трех различных отсортированных групп соответствовало ожидаемому фенотипу с "низкой", "средней" и "высокой" флуоресценцией. Некоторые отклоняющиеся значения были обнаружены, например, в "низкой" группе, демонстрирующие высокую поверхностную флуоресценцию, которые, вероятно, были вызваны артефактом при окрашивании перед сортировкой. Впоследствии характеристики полученных клонов анализировали в сериях культивирования с добавками. На фиг. 26C представлено распределение удельной продуктивности qP для каждой группы. qP исходного пула, которую также оценивали в четырех повторах, приведена на диаграмме в качестве контроля. Образцы с наилучшими показателями однозначно обнаруживали в группе с "высокой" поверхностной флуоресценцией с медианой qP, составляющей приблизительно 10 пг/клетку/день. По сравнению с исходным пулом (приблизительно 5 пг/клетку/день) продуктивность была значительно улучшена в 2-6 раз, наилучший клон достиг показателя более 30 пг/клетку/день. Напротив, клоны из "низкой" и "средней" категорий являлись, в целом, образцами с низкими характеристиками с медианой qP, близкой к 0 пг/клетку/день. Некоторые отклоняющиеся значения достигали >20 пг/клетку/день, но данные фенотипы также продемонстрировали высокую поверхностную плотность IgG, обнаруженную методом проточной цитометрии.

Заключение.

В данном примере было продемонстрировано, что уровень IgG, экспрессированного посредством альтернативного сплайсинга на мембране клетки, предоставляет информацию о фактическом уровне секреции рекомбинантных клеток. Флуоресценция клеточной мембраны после специфичного обнаруже-

ния продукта коррелирует с накопленными концентрациями IgG в супернатанте и с qP трансфицированных стабильных клеток. Также было продемонстрировано, что корреляция сохранялась вне зависимости от фазы процесса периодического культивирования. Взятые вместе, полученные данные свидетельствуют, что количественный уровень секреции рекомбинантных клеток можно прогнозировать посредством репортерной системы экспонирования на поверхности на основе альтернативного сплайсинга, описанной в настоящей заявке. Данный подход был подтвержден отбором клонов в зависимости от плотности IgG, экспонированного на поверхности клеток, с применением сортировки клеток методом проточной цитометрии. Действительно, с применением данного подхода можно отобрать высокопродуктивные клетки и можно получить клоны, демонстрирующие удельную продуктивность, которая соответствует промышленному масштабу, с минимальными затратами времени.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экспрессирующая конструкция, содержащая в направлении от 5' к 3' промотор;
первый экзон, кодирующий полипептид, представляющий интерес, где указанный полипептид, представляющий интерес, содержит тяжелую цепь антитела или её фрагмент;
донорный сайт сплайсинга, интрон и акцепторный сайт сплайсинга, причем первый стоп-кодон расположен между указанным донорным сайтом сплайсинга и указанным акцепторным сайтом сплайсинга в пределах указанного интрона;
второй экзон, кодирующий трансмембранную область, которая выбрана из модифицированной трансмембранной области иммуноглобулина или модифицированной или немодифицированной трансмембранной области, отличной от трансмембранной области иммуноглобулина;
второй стоп-кодон; и
поли(A)-сайт,
причем после поступления в клетку-хозяин транскрипция указанного первого и второго экзонов приводит к экспрессии указанного полипептида, представляющего интерес, и экспонированию части полипептида, представляющего интерес, на поверхности мембраны клетки-хозяина.
2. Экспрессирующая конструкция по п.1, отличающаяся тем, что указанная трансмембранная область содержит от 17 до 29 остатков, предпочтительно от 19 до 26 остатков и, наиболее предпочтительно, от 21 до 24 остатков.
3. Экспрессирующая конструкция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что указанная трансмембранная область, отличная от трансмембранной области иммуноглобулина, выбрана из группы, включающей трансмембранную область рецептора фактора роста тромбоцитов человека (PDGFR), асиалогликопротеинового рецептора человека, B7-1 человека и мыши, ICAM-1 человека, erbb1 человека, erbb2 человека, erbb3 человека, erbb4 человека, рецепторов фактора роста фибробластов человека, таких как FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, VEGFR-1 человека, VEGFR-2 человека, рецептора эритропоэтина человека, PRL-R человека, рецептора пролактина, EphA1 человека, рецептора 1 эфрина типа A, рецепторов инсулина, IGF-1 человека, рецептороподобных тирозинфосфатаз белков человека, нейропилина человека, главного комплекса гистосовместимости класса II человека (цепи альфа и бета), интегринов человека (семейства альфа и бета), синдеканов человека, белка миелина человека, кадгеринов человека, синаптобревина-2 человека, гликофорина-A человека, Vnpr3 человека, APP человека, белка-предшественника амилоида, рецептора Т-клеток альфа и бета человека, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 дзета и CD3 эпсилон.
4. Экспрессирующая конструкция по п.1, отличающаяся тем, что указанная трансмембранная область, отличная от трансмембранной области иммуноглобулина, представляет собой трансмембранную область B7-1 мыши (SEQ ID NO: 173), ACLV1 (SEQ ID NO: 174), ANTR2 (SEQ ID NO: 175), CD4 (SEQ ID NO: 176), PTPRM (SEQ ID NO: 177), TNFR5 (SEQ ID NO: 178), ITB1 (SEQ ID NO: 179), IGF1R (SEQ ID NO: 181), IB07 (SEQ ID NO: 180), TRMB (SEQ ID NO: 182), IL4RA (SEQ ID NO: 183), LRP6 (SEQ ID NO: 184), GpA (SEQ ID NO: 185), PTCRA (SEQ ID NO: 186).
5. Экспрессирующая конструкция по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что указанный интрон содержит поли(A)-сайт.
6. Экспрессирующая конструкция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что акцепторный сайт сплайсинга указанного интрона содержит поли(Y)-участок и при этом содержание Y в указанном поли(Y)-участке модифицируют посредством изменения количества пиримидиновых оснований в нем.
7. Экспрессирующая конструкция по любому из пп.1-6, содержащая по меньшей мере одну область точки разветвления, отличающаяся тем, что последовательность указанной по меньшей мере одной области точки разветвления является модифицированной относительно консенсусной последовательности области точки разветвления CTRAYY (SEQ ID NO: 347).
8. Экспрессирующая конструкция по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что консенсусная последовательность указанного донорного сайта сплайсинга интрона является модифицированной.
9. Полинуклеотид, содержащий экспрессирующую конструкцию по любому из пп.1-8.
10. Вектор клонирования или экспрессии, содержащий один или более полинуклеотидов по п.9.

11. Клетка-хозяин, содержащая один или более векторов клонирования или экспрессии по п.10.

12. Клетка-хозяин по п.11, содержащая вектор экспрессии, который содержит полинуклеотид, кодирующий экспрессирующую конструкцию по п.8 для экспрессии тяжелой цепи антитела, и вектор экспрессии, который содержит полинуклеотид, кодирующий экспрессирующую конструкцию для экспрессии легкой цепи антитела.

13. Клетка-хозяин по п.11, содержащая вектор экспрессии, который содержит полинуклеотид, кодирующий экспрессирующую конструкцию по п.8 для экспрессии тяжелой цепи антитела, вектор экспрессии, который содержит полинуклеотид, кодирующий экспрессирующую конструкцию по п.8 для экспрессии scFv-Fc, и вектор экспрессии, который содержит полинуклеотид, кодирующий экспрессирующую конструкцию для экспрессии легкой цепи антитела.

14. Способ получения полипептида, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп.11-13 в культуре и выделение полипептида, экспрессированного из культуры.

15. Способ отбора клетки-хозяина, экспрессирующей полипептид, представляющий интерес, причем указанный способ включает:

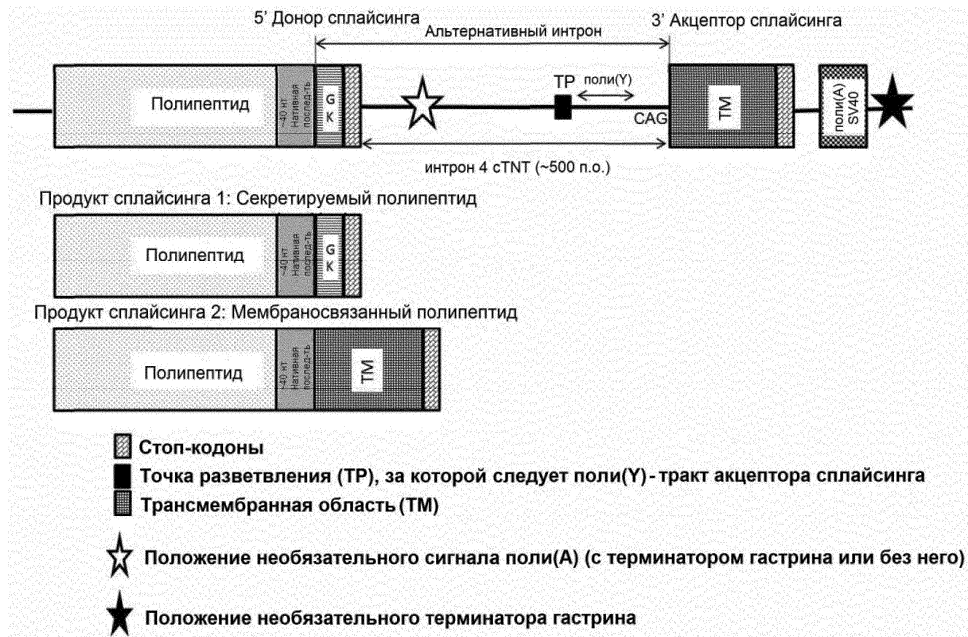
- (i) трансфекцию клетки-хозяина экспрессирующей конструкцией по п.1;
- (ii) культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии полипептида, представляющего интерес;
- (iii) обнаружение экспрессии полипептида, представляющего интерес, на мембране клетки; и
- (iv) отбор клетки-хозяина, экспонирующей полипептид, представляющий интерес, на поверхности мембраны клетки на желаемом уровне экспрессии.

16. Способ отбора клетки-хозяина, экспрессирующей гетеромультимерный полипептид, представляющий интерес, причем указанный способ включает:

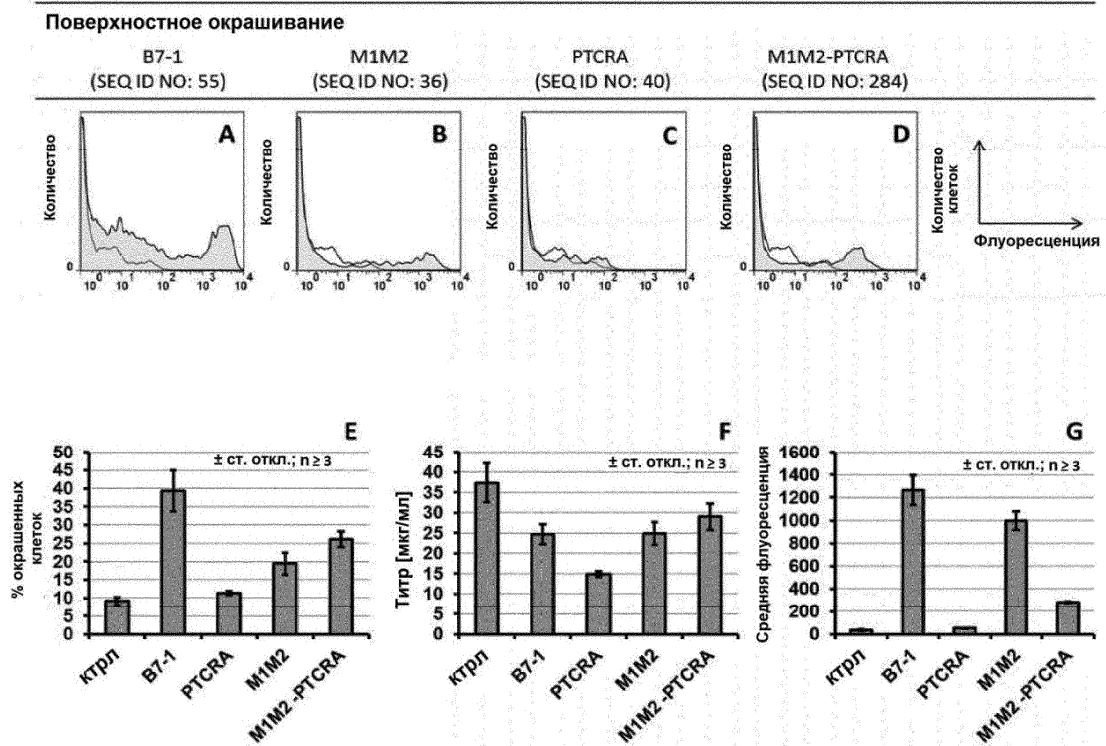
- (i) котрансфекцию клетки-хозяина, по меньшей мере, экспрессирующей конструкцией по п.1, кодирующей первый полипептид, представляющий интерес, и экспрессирующей конструкцией по п.1, кодирующей второй полипептид, представляющий интерес;
- (ii) культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии гетеромультимерного полипептида, представляющего интерес;
- (iii) обнаружение экспрессии гетеромультимерного полипептида, представляющего интерес, на мембране клетки; и
- (iv) отбор клетки-хозяина, экспонирующей желаемый гетеромультимерный полипептид, представляющий интерес, на поверхности мембраны клетки на желаемом уровне экспрессии.

17. Способ отбора клетки-хозяина, экспрессирующей биспецифичное антитело, причем указанный способ включает:

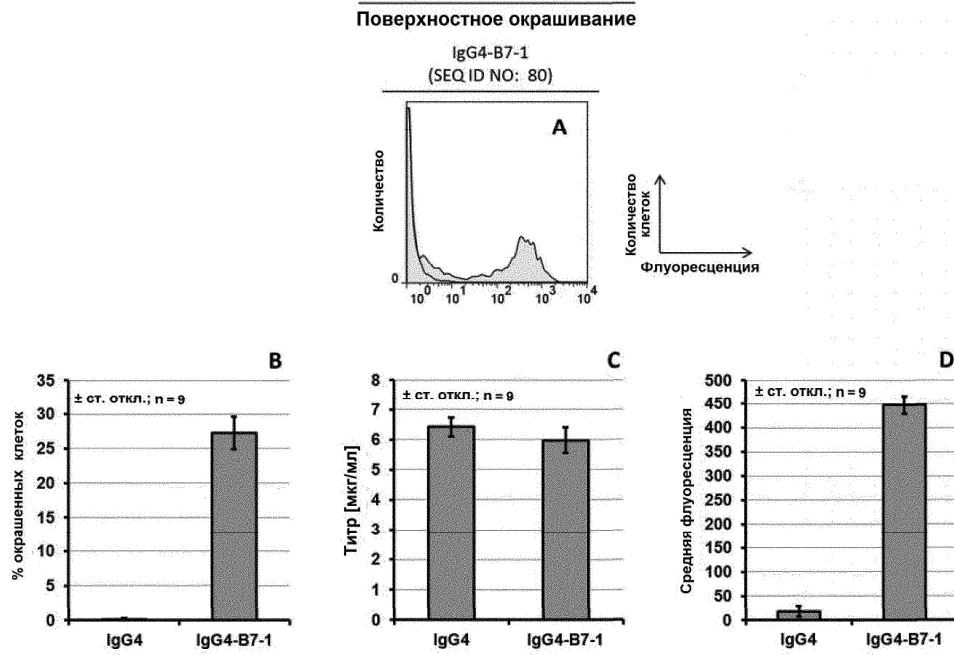
- (i) котрансфекцию клетки-хозяина экспрессирующей конструкцией по п.1, кодирующей тяжелую цепь антитела, экспрессирующей конструкцией по п.1, кодирующей scFv-Fc, и экспрессирующей конструкцией, кодирующей легкую цепь антитела;
- (ii) культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии биспецифичного антитела;
- (iii) обнаружение экспрессии биспецифичного антитела на клеточной мембране; и
- (iv) отбор клетки-хозяина, экспонирующей желаемое биспецифичное антитело на поверхности клеточной мембраны на желаемом уровне экспрессии.



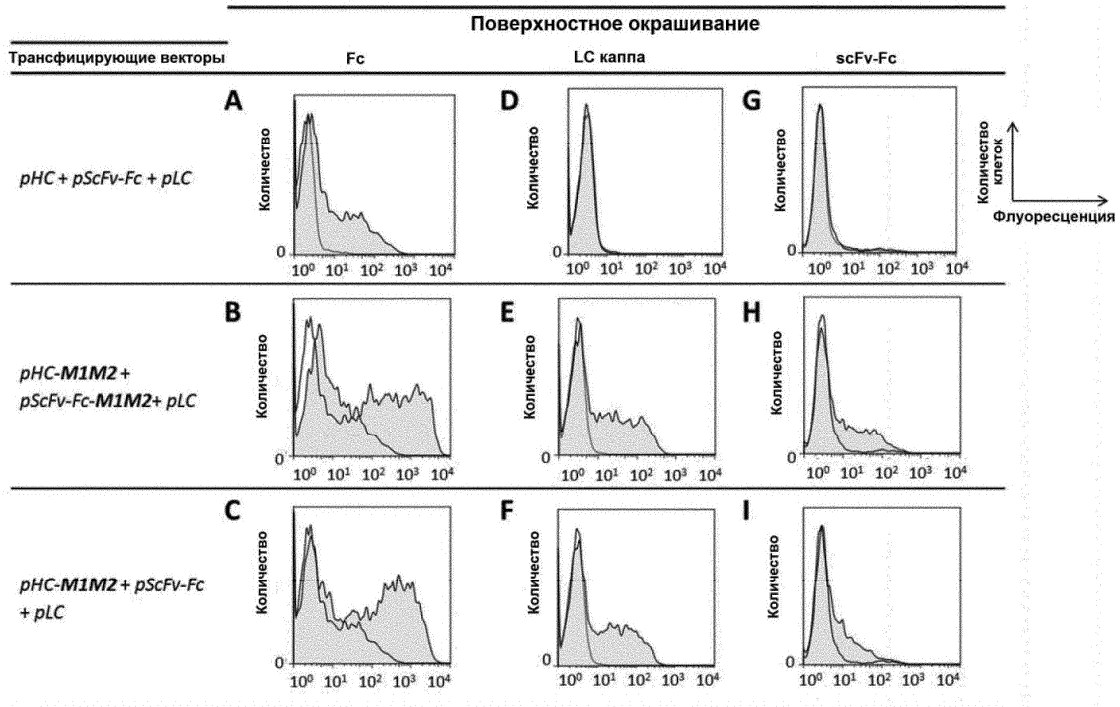
Фиг. 1

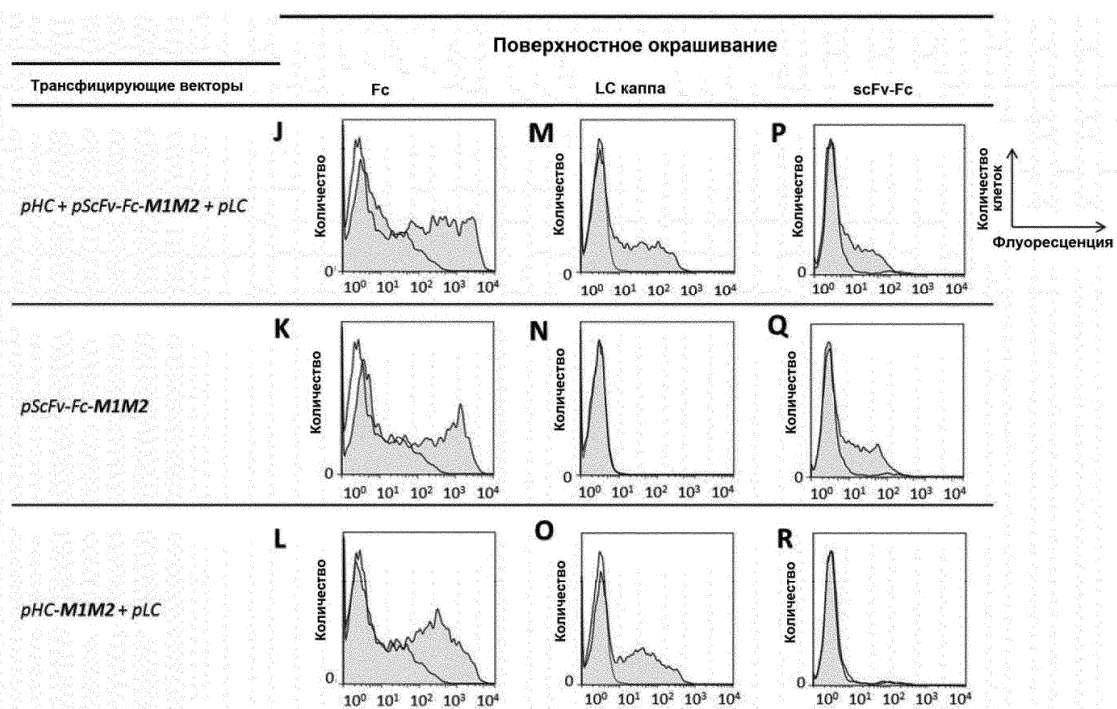


Фиг. 2

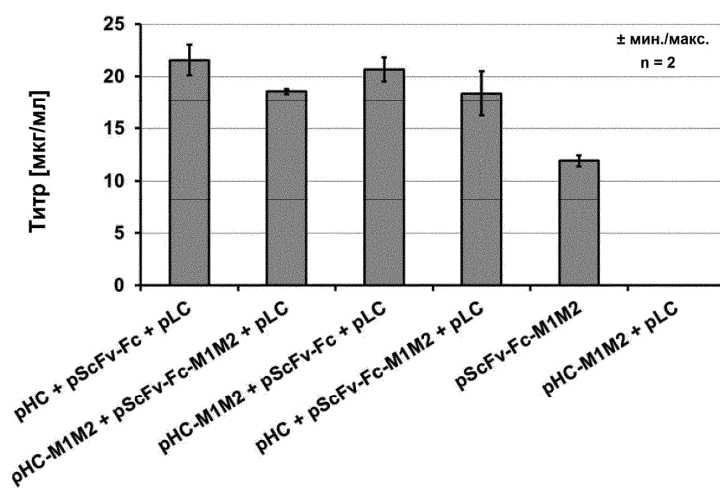


Фиг. 3

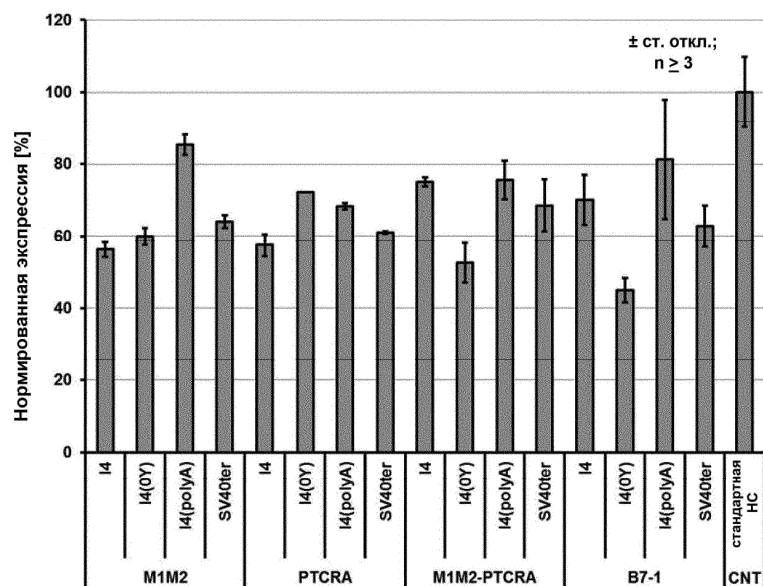
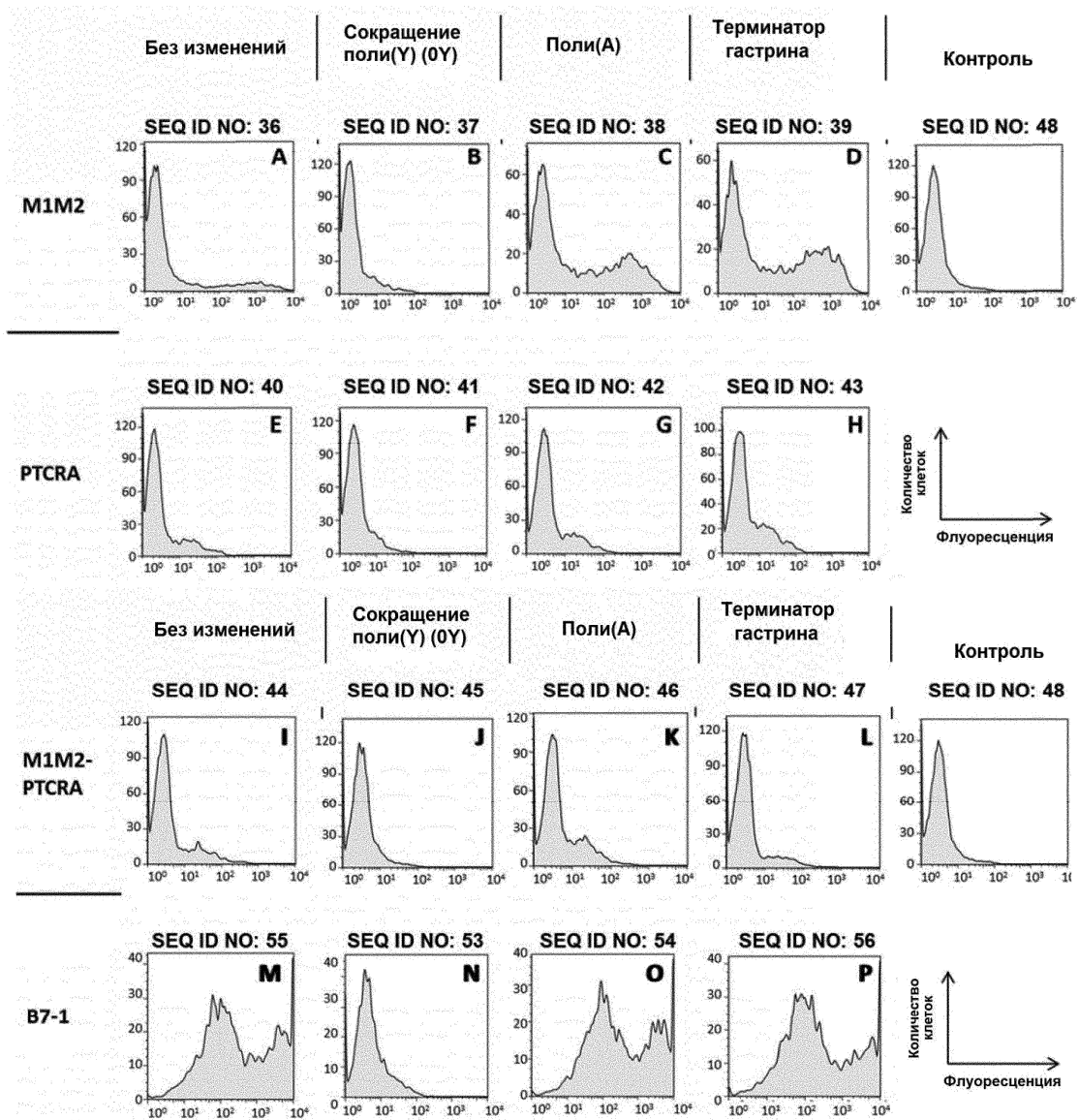


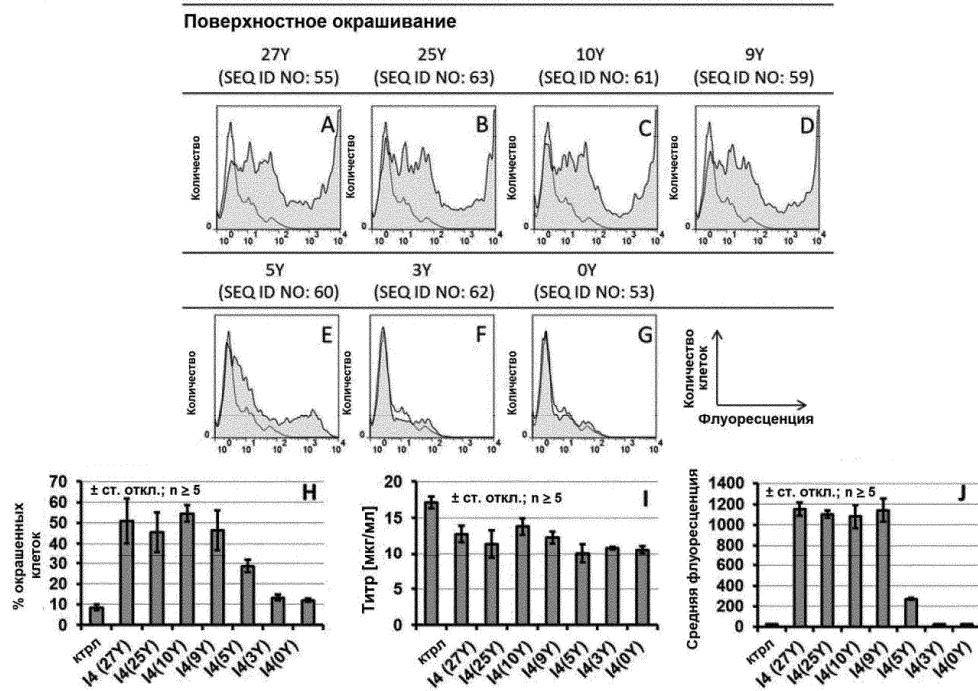


Фиг. 4

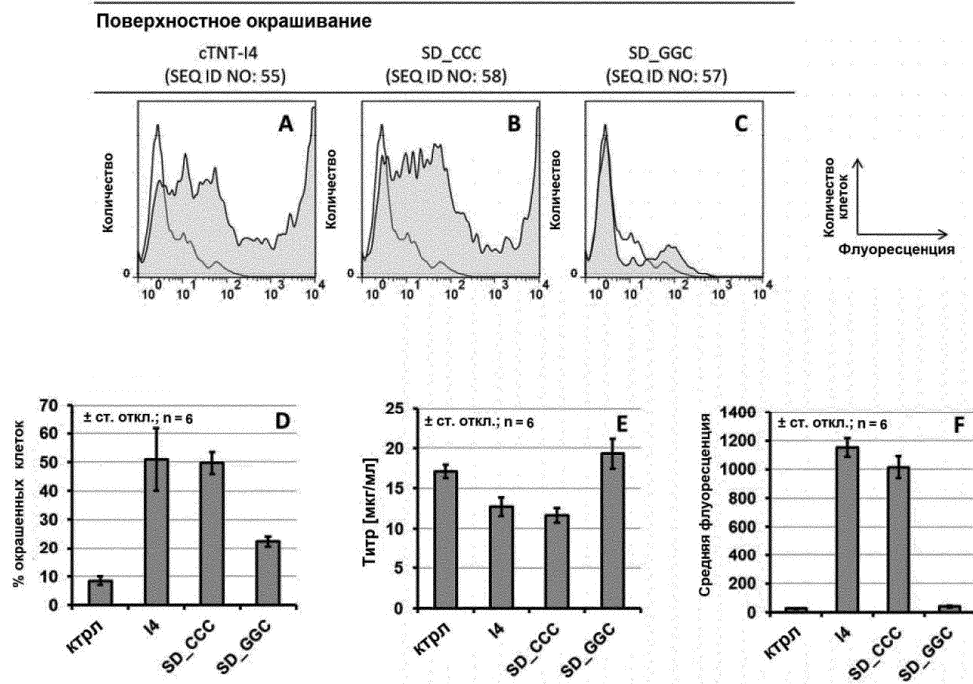


Фиг. 5

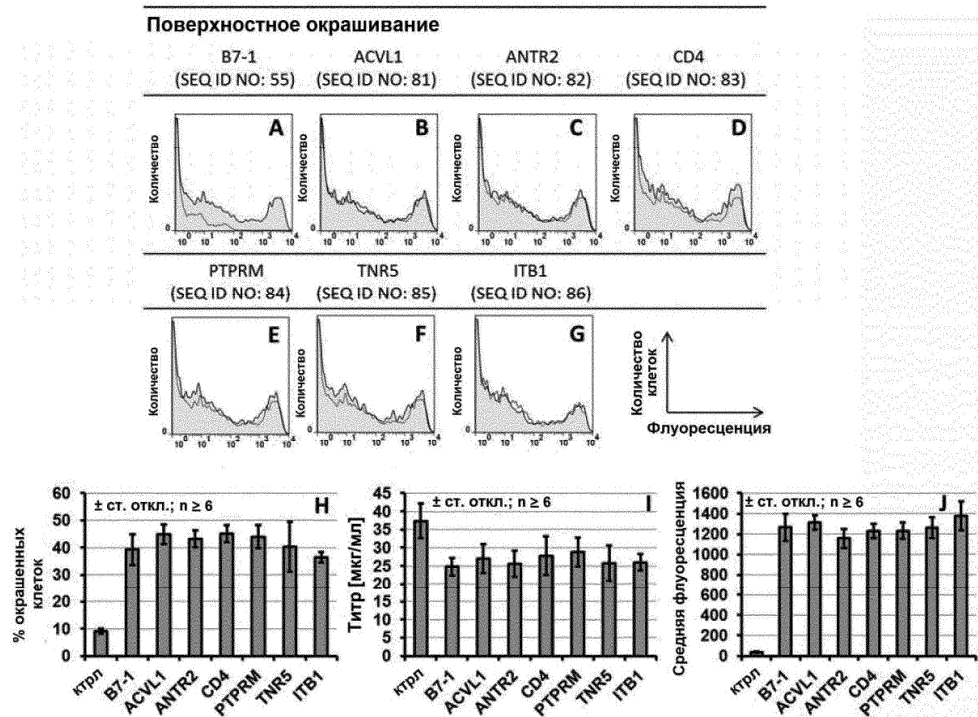




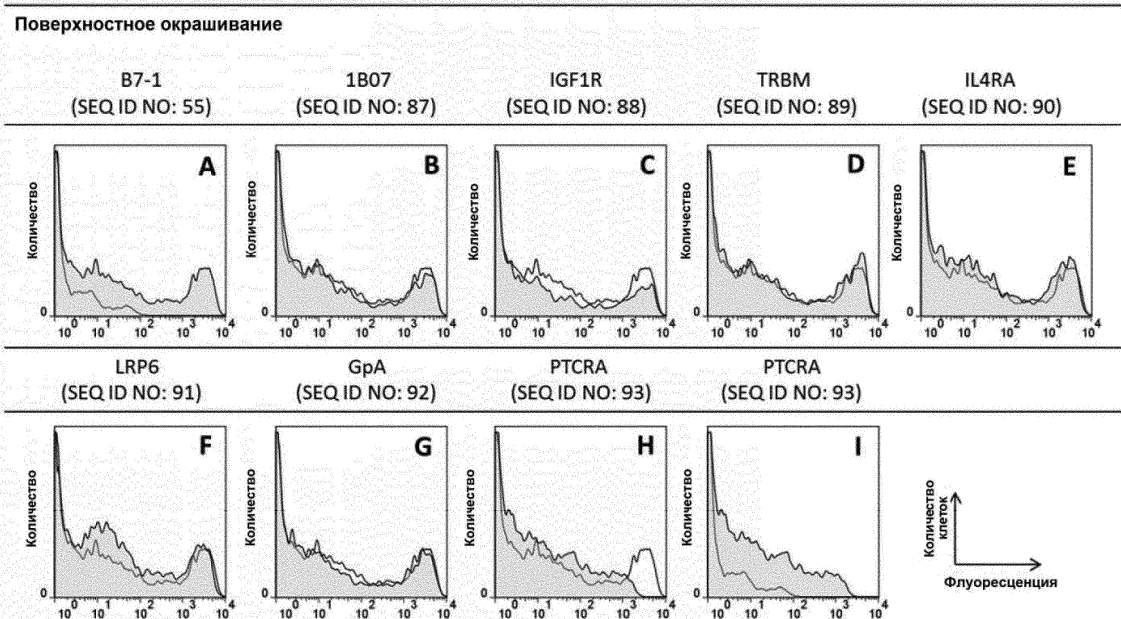
Фиг. 8

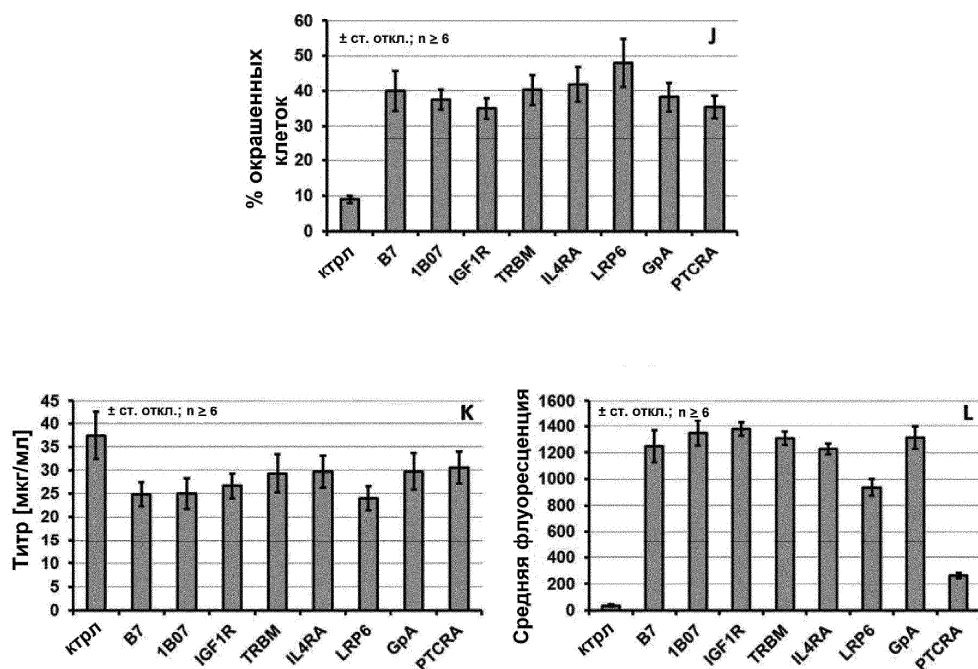


Фиг. 9



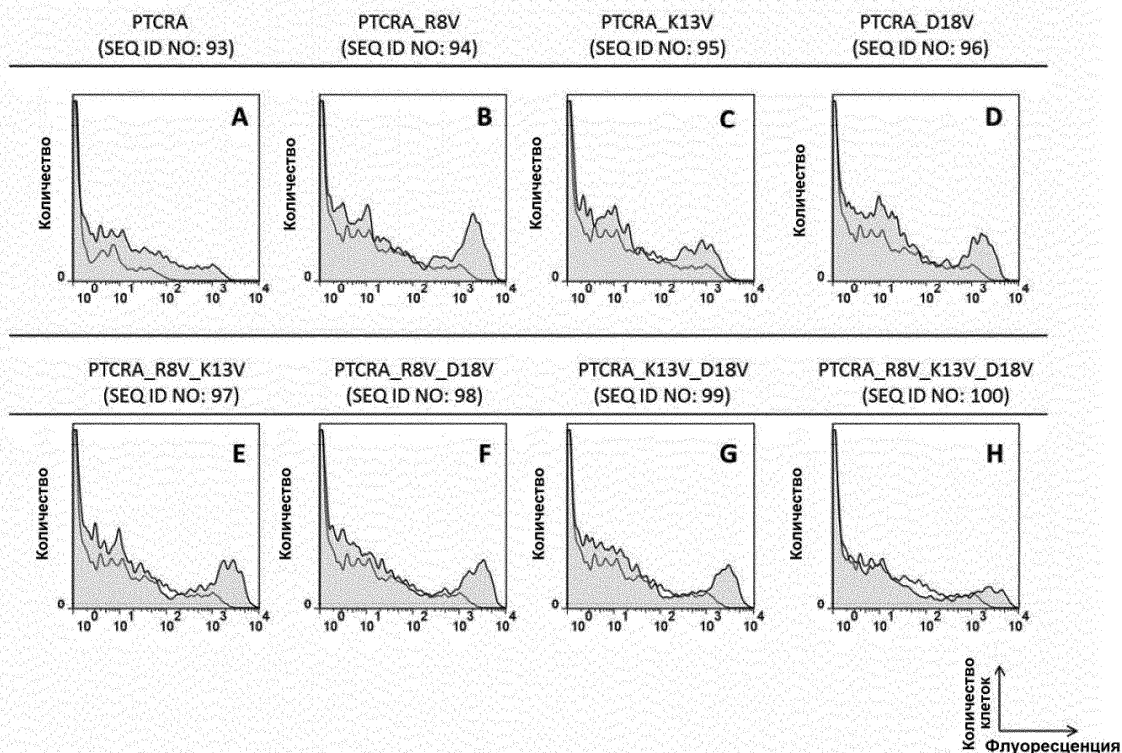
Фиг. 10

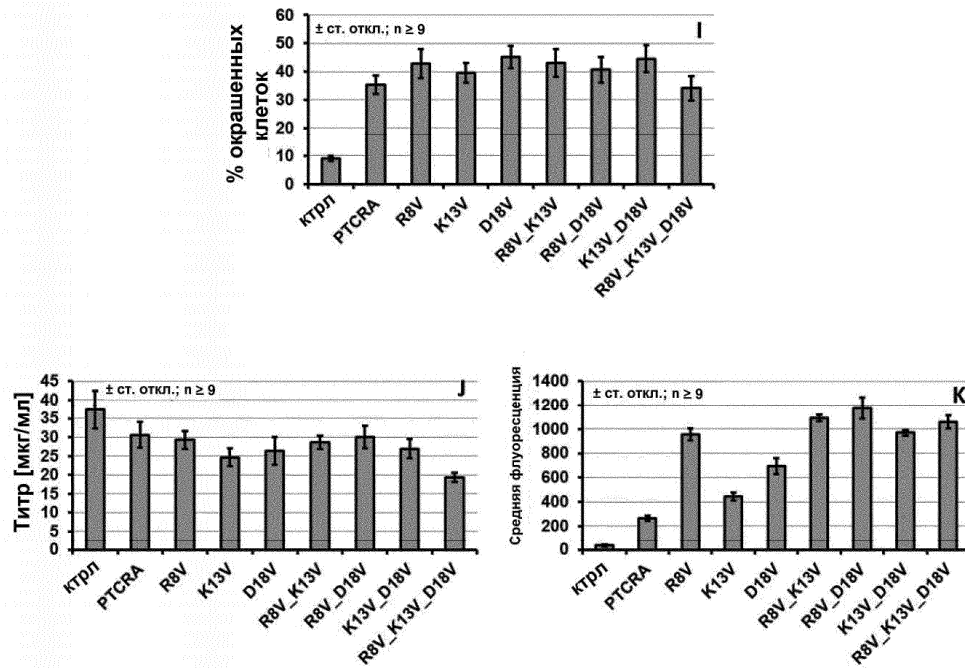




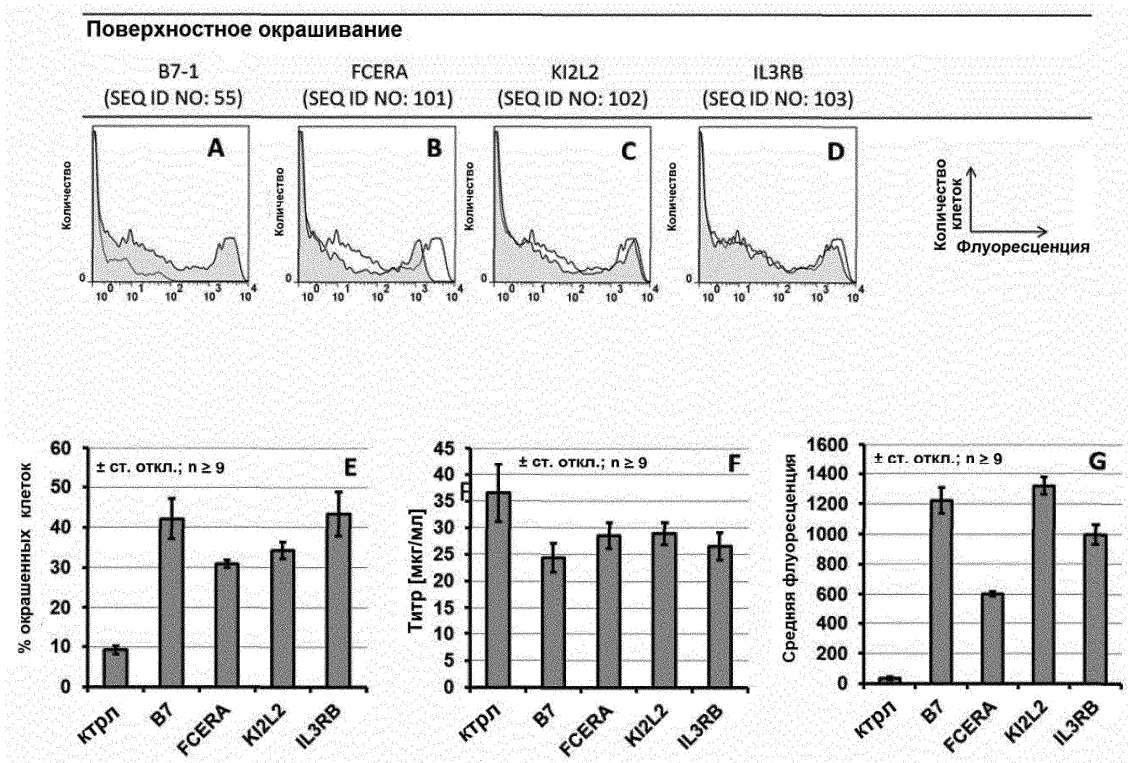
Фиг. 11

Поверхностное окрашивание



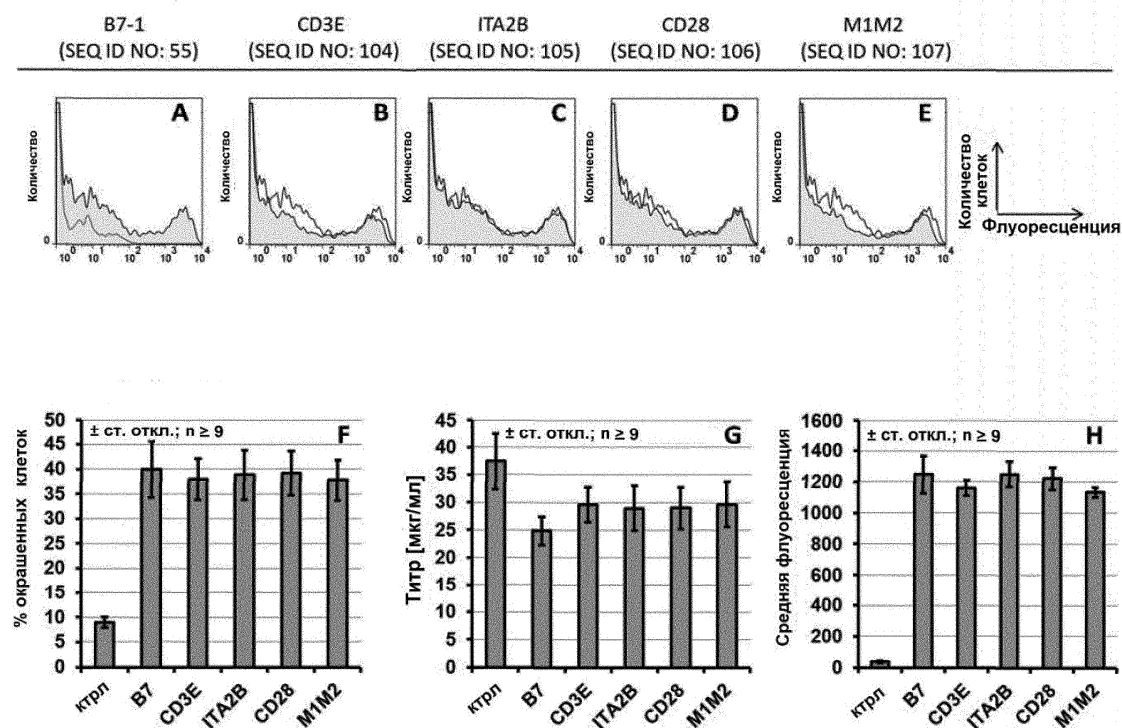


Фиг. 12

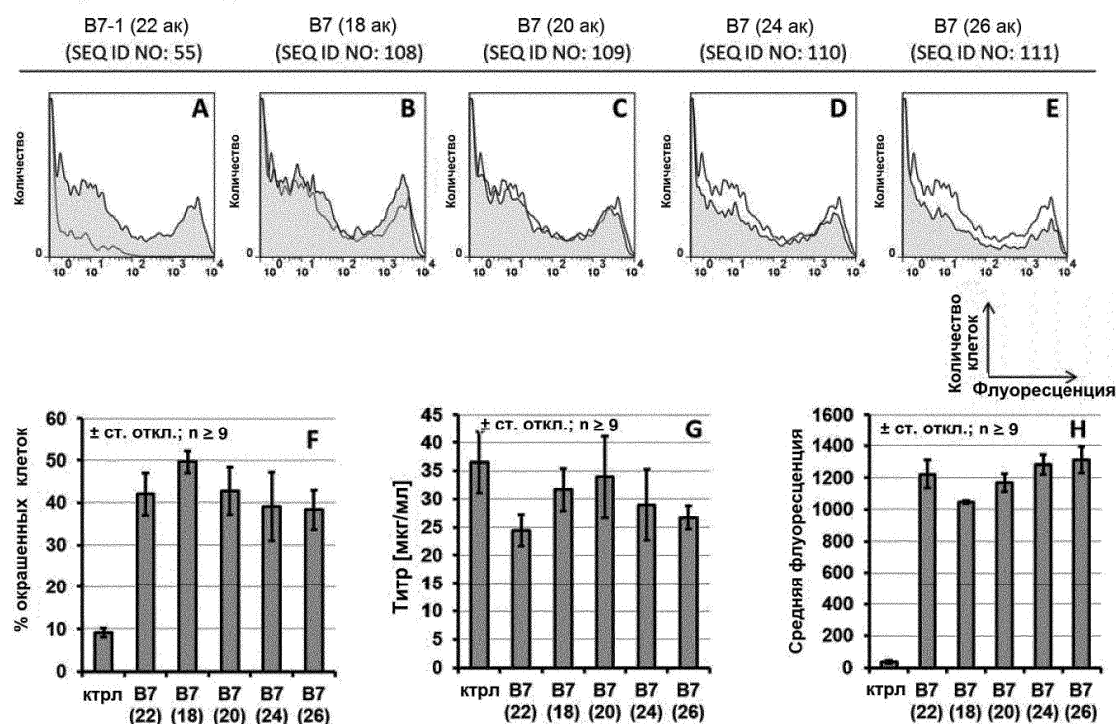


Фиг. 13

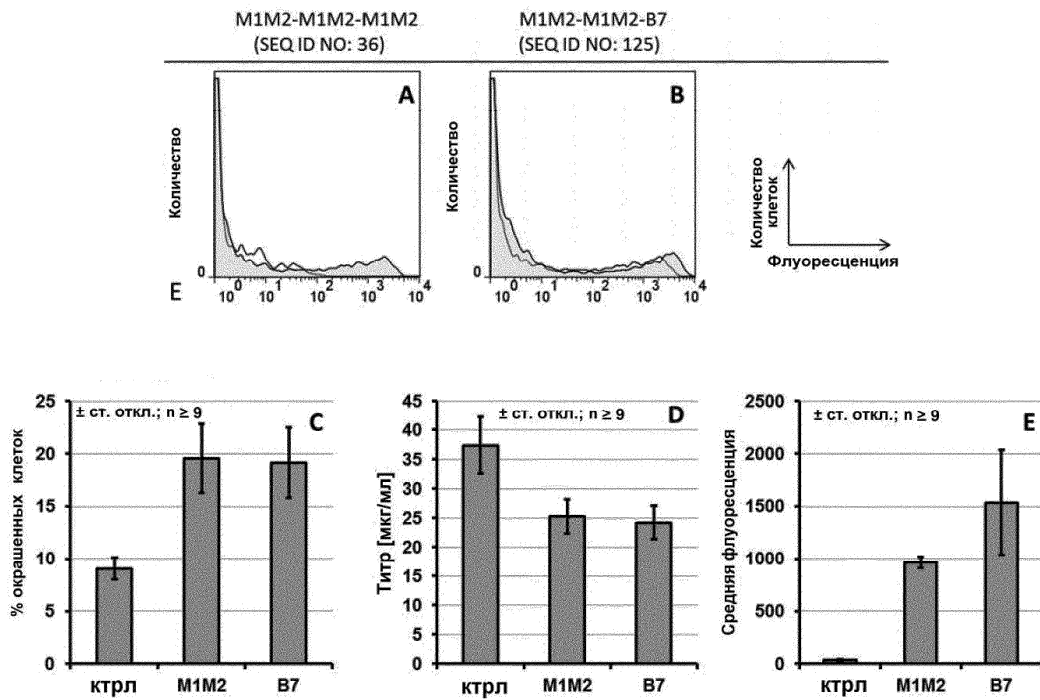
Поверхностное окрашивание



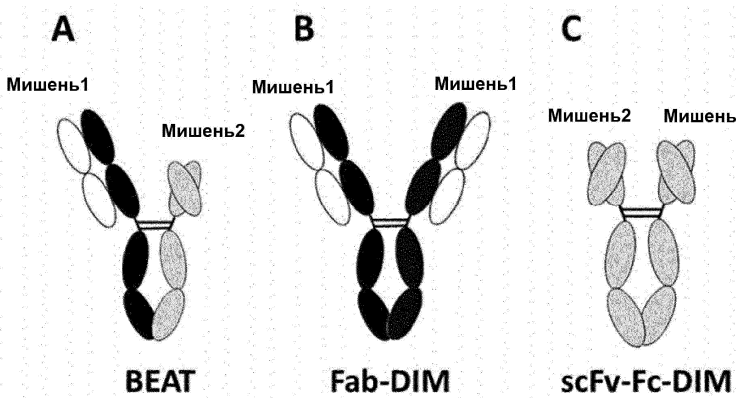
Поверхностное окрашивание



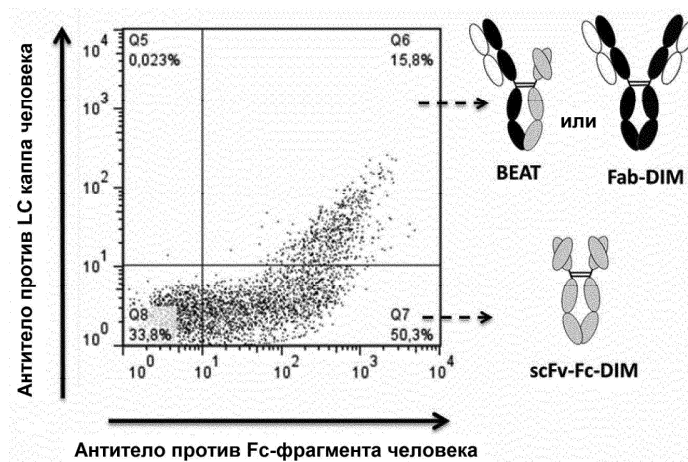
Поверхностное окрашивание



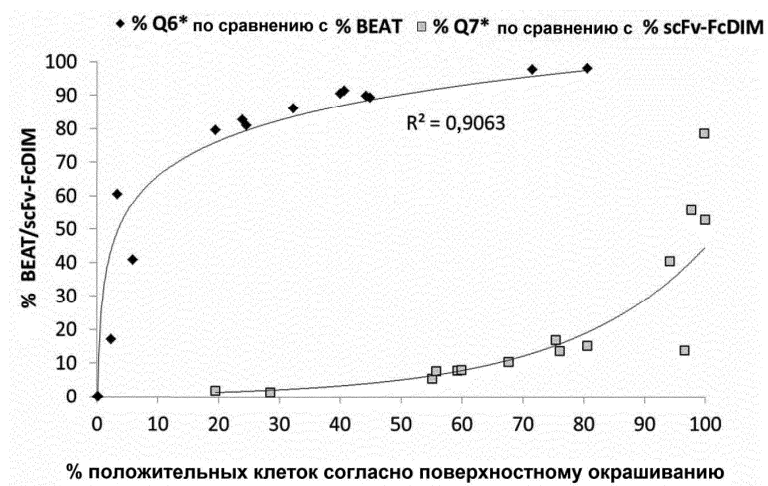
Фиг. 17



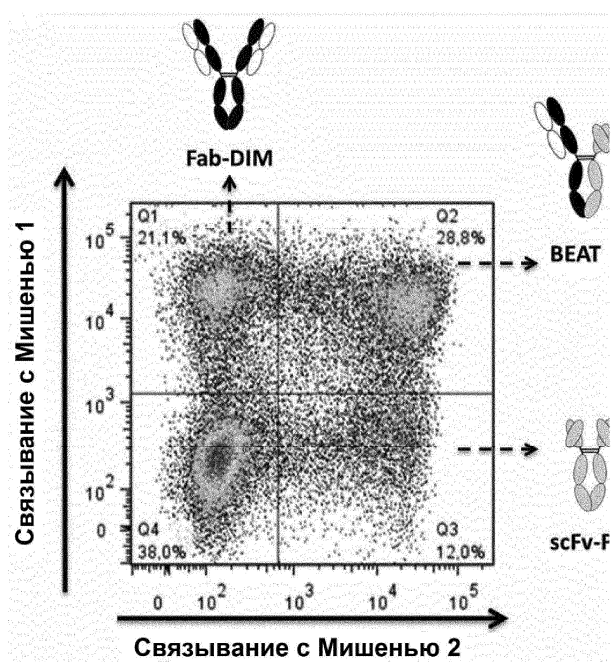
Фиг. 18



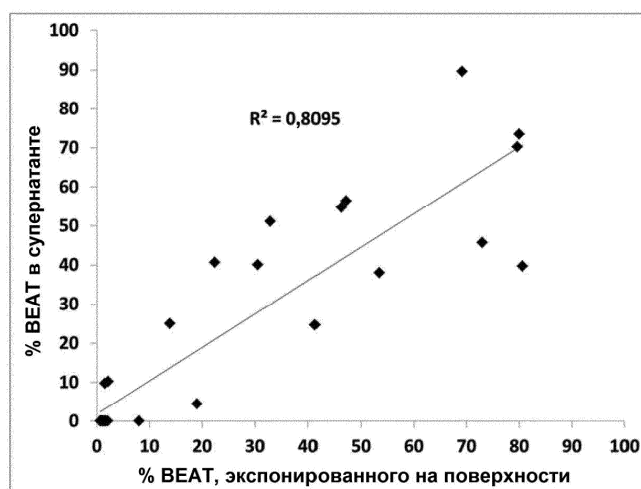
Фиг. 19



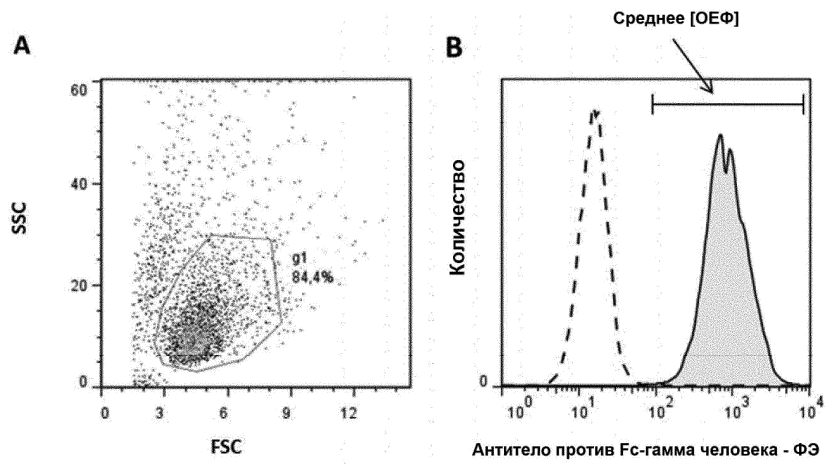
Фиг. 20



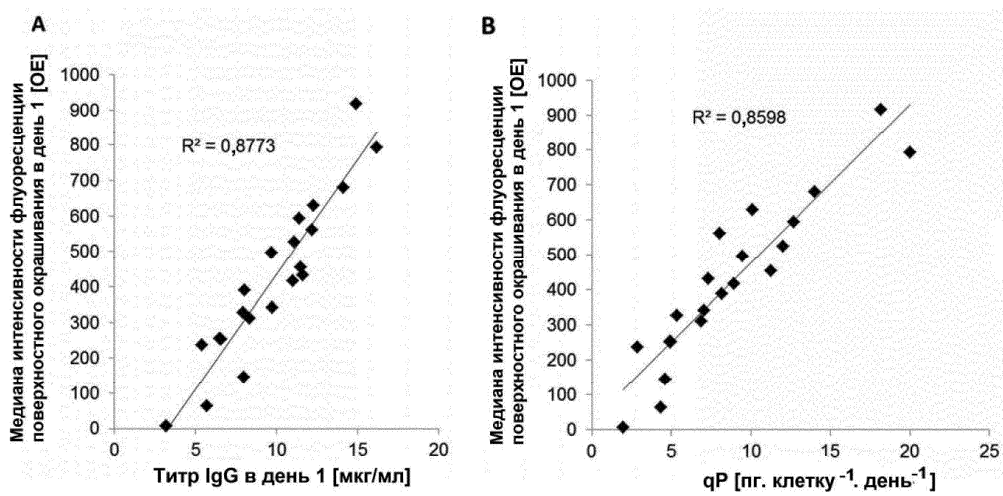
Фиг. 21



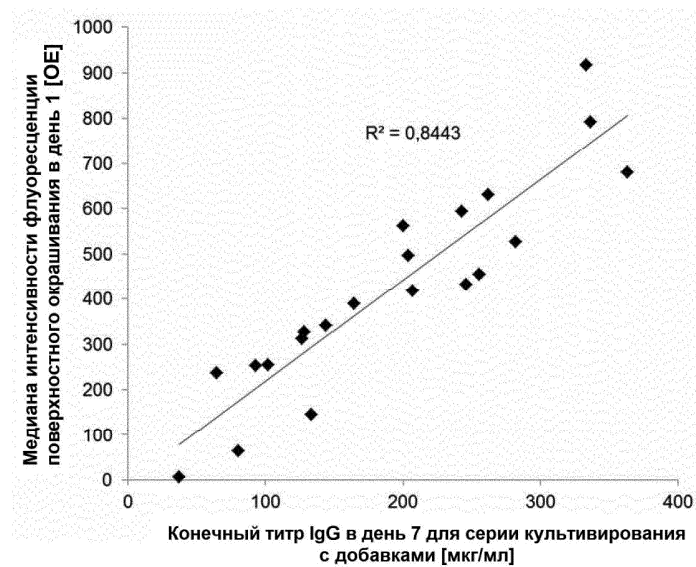
Фиг. 22



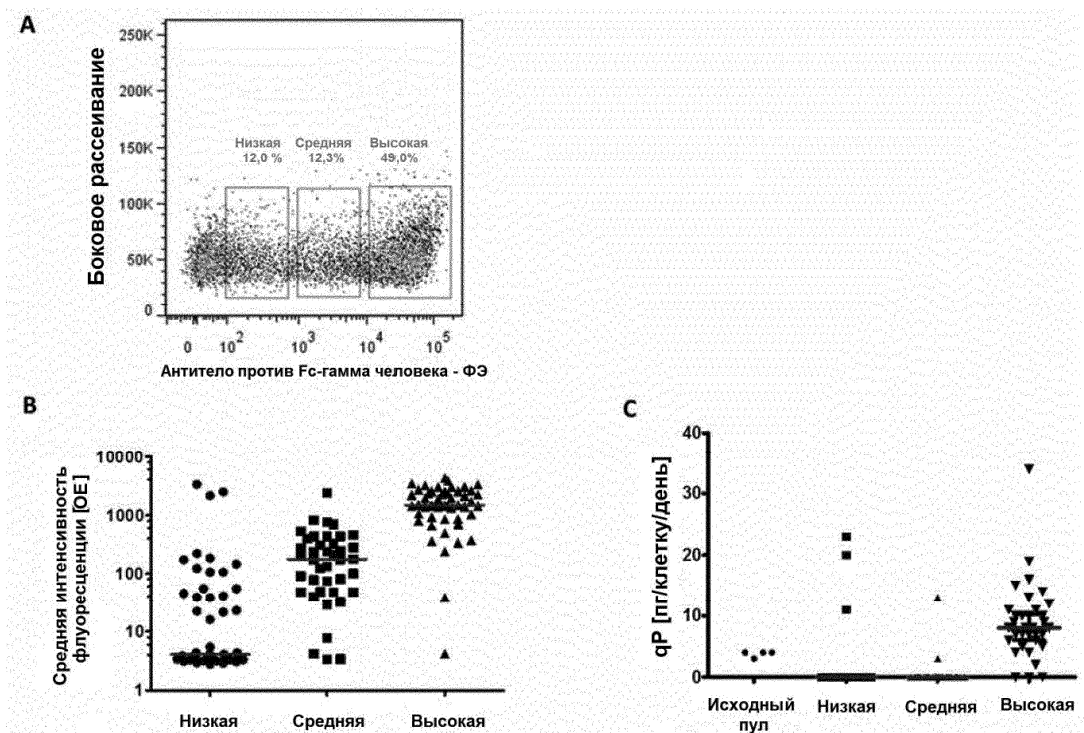
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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