

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035340**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.29

(21) Номер заявки
201790241

(22) Дата подачи заявки
2015.08.19

(51) Int. Cl. **C12P 21/06** (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(54) ЭФФЕКТИВНАЯ СЕЛЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

(31) 62/039,416

(32) 2014.08.19

(33) US

(43) 2017.06.30

(86) PCT/US2015/045793

(87) WO 2016/028838 2016.02.25

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

(72) Изобретатель:
**Дэшпанде Дипали, Бураков Дарья,
Чэнь Ган, Фандл Джэймс (US)**

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

(56) US-A1-20090162900

Scocca, et al. Sequence of a cDNA That Specifies the Uridine Diphosphate IV-Acetylo-glucosamine:Dolichol Phosphate N-Acetylglucosamine-1-phosphate Transferase from Chinese Hamster Ovary Cells. JBC 1990, 265(33):20621-20626; Abstract; pg 20621; GenBank: M36899.1. Hamster uridine diphosphate N-acetyl D-glucosamine dolichol phosphate N-acetyl-glucosamine-1-phosphate transferase mRNA. Transferase (27 April 1993) [Retrieved from the Internet 02 October 2015: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/191228>>]

(57) Изобретение предусматривает новую систему экспрессии, включающую селективный маркер млекопитающего, которая обеспечивает требуемые посттрансляционные модификации гликопротеинов. В частности, изобретение предусматривает способы и композиции для оптимальной экспрессии рекомбинантного белка в клетках млекопитающих с применением системы селективных маркеров на основе генов GPT, происходящих из млекопитающих. Настоящее изобретение включает способы, которые обеспечивают селективность и усиливают экспрессию копий, а также выход рекомбинантных белков в клетках млекопитающих, и способы применения систем экспрессии GPT.

B1

035340

035340

B1

Предпосылки изобретения **Перечень последовательностей**

Настоящая заявка включает посредством ссылки перечень последовательностей, поданных в машиночитаемой форме как файл 8700WO_ST25.txt, созданный 3 августа 2015 г. (75769 байт).

Область техники

Настоящее изобретение предусматривает экспрессию рекомбинантных белков в клетках млекопитающих стабильным и эффективным образом. В частности, настоящее изобретение предусматривает способы и композиции для улучшения экспрессии белков в клетках млекопитающих с использованием селективных маркеров млекопитающих. Настоящее изобретение предусматривает способы, которые обеспечивают селективность и усиливают экспрессию копий, а также выход рекомбинантных белков в клетках млекопитающих, и способы применения таких систем экспрессии.

Описание предшествующего уровня техники

Основной целью разработки клеточных систем экспрессии является обеспечение надежного и эффективного источника определенного белка для исследовательского и терапевтического применения. Экспрессия рекомбинантного белка в клетках млекопитающих часто является предпочтительной при производстве белков для терапевтического применения, например, в связи со способностью систем экспрессии млекопитающих соответствующим образом посттрансляционно модифицировать рекомбинантные белки.

Различные векторы способны к экспрессии в млекопитающих-хозяевах, каждый из которых содержит селективные маркеры, которые позволяют легко выделять рекомбинантные клетки, экспрессирующие белок во время культивирования клеток. Селективные маркерные гены (SMG) используют в таких системах, поскольку они придают селективное преимущество клеткам, экспрессирующим белок, представляющий интерес, однако SMG должны быть оптимизированы, среди прочих причин, для обеспечения их фенотипической нейтральности, эффективности и универсальности.

Несмотря на доступность многих векторов и систем экспрессии, содержащих SMG, экспрессия рекомбинантного белка, полученного в системах млекопитающих, часто неудовлетворительна, либо в количественном отношении, либо в качественном отношении, либо в обоих отношениях. Биологический "отпечаток пальца" молекулы, например посттрансляционные модификации, подобные гликозилированию, особенно важны для определения полезности и эффективности молекулы при разработке рекомбинантного белка для терапевтического применения (Cumming, D.A., 1990, *Glycobiology*, 1(2): 115-130). Особенно предпочтительны SMG, которые не оказывают негативного воздействия на биологические свойства экспрессированного белка, представляющего интерес.

Большинство SMG имеют бактериальное происхождение, и это приводит к другим недостаткам при применении их в системах млекопитающих по причине возрастания риска горизонтального переноса бактериальных генов, придающих устойчивость к антибиотикам, в бактерии окружающей среды (Breyer, D. et al., 2014, *Critical Reviews in Plant Sciences* 33:286-330). Устранение применения бактериальных генов, придающих устойчивость к антибиотикам, может положительно влиять на признание продукта потребителями и уменьшение таких существующих рисков.

Генно-инженерные аутологичные клетки быстро становятся успешными в клиническом отношении (см., например, Kershaw, M.H. et al., 2013, *Nature Reviews: Cancer* 13:525-541). Выбор и конструирование векторов для генетической модификации продуктов в аутологичной клетке человека имеет решающее значение главным образом из-за того, что нежелательное введение компонентов, не относящихся к человеку, в аутологичную клетку человека может иметь серьезные последствия в отношении безопасности пациента (Eaker, et al. 2013, *Stem cells Trans. Med.* 2:871-883; впервые опубликованная онлайн в SCT-MEXPRESS 7 октября 2013). Векторная система, имеющая только компоненты, происходящие из млекопитающих, а не бактерий, будет предпочтительнее для применения в персонифицированных Т-клетках при адоптивной иммунотерапии.

Поэтому желательно вводить селективные гены млекопитающих, особенно такие, которые дают трансформированным клеткам фенотипическое или метаболическое преимущество в системах экспрессии для получения белков млекопитающих, представляющих интерес. Более того, очень подходящей является линия клеток, которая надежно экспрессирует достаточно высокие уровни белка для терапевтического применения, а также соответствующим образом и стабильно модифицирует посттрансляционный белок для терапевтического применения. Соответственно, в данной области техники существует необходимость в улучшении систем экспрессии млекопитающих.

Краткое описание

Применение гена млекопитающего, придающего устойчивость к туникамицину (Tn), в качестве селективного маркера в системе экспрессии млекопитающего может повышать эффективность и число копий трансфектантов. Было обнаружено, что применение гена, придающего устойчивость к Tn, функционально связанного с представляющим интерес геном, создает селективное давление на популяцию клеток млекопитающего, вследствие чего повышается уровень случайной интеграции трансфектанта (т.е. гена, представляющего интерес). Понятно, что системы с использованием селективного маркера могут способствовать выбору требуемых трансфектантов, однако способы по настоящему изобретению приво-

дят к неожиданному повышению как эффективности, так и уровня случайной интеграции представляющего интерес гена, а также надежных биологических качеств требуемого белка. Композиции и способы по настоящему изобретению, таким образом, обеспечивают предпочтительный отбор качественно подходящих посттрансляционных модификаций для экспрессированных белков.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает выделенную клетку, содержащую ген млекопитающего, придающий устойчивость к туникамицину (Tn), кодирующий белок, который характеризуется по меньшей мере 93% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, функционально связанный с представляющим интерес геном (GOI), и по меньшей мере один регуляторный элемент.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ получения представляющего интерес рекомбинантного белка (POI), где способ включает обеспечение клетки-хозяина млекопитающего с кодирующей молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей (i) ген млекопитающего, придающий устойчивость к туникамицину (Tn), и (ii) ген, кодирующий POI; культивирование клетки в присутствии первой концентрации Tn; выделение клеточной популяции, экспрессирующей по меньшей мере одну копию гена, придающего устойчивость к Tn; культивирование клеточной популяции в присутствии возрастающих концентраций Tn, где возрастающие концентрации Tn приводят к увеличению продуцирования POI; и выделение POI из культуры клеток.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ гликозилирования белкового субстрата с N-гликанами, где способ включает обеспечение клетки-хозяина млекопитающего с кодирующей молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей (i) ген млекопитающего, придающий устойчивость к туникамицину (Tn), функционально связанный с геном, кодирующим белковый субстрат, нуждающийся в гликозилировании; культивирование клетки в присутствии первой концентрации Tn; выделение клеточной популяции, экспрессирующей по меньшей мере одну копию гена, придающего устойчивость к Tn; культивирование клеточной популяции в присутствии возрастающих концентраций Tn, где возрастающие концентрации Tn приводят к увеличению продуцирования POI; и выделение белкового субстрата из культуры клеток.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению ген, придающий устойчивость к Tn, функционально связан с геном, кодирующим POI, и ген, кодирующий POI, функционально связан по меньшей мере с одним регуляторным элементом.

В некоторых вариантах осуществления ген, придающий устойчивость к Tn, экзогенно добавлен в клетку. В других вариантах осуществления ген, придающий устойчивость к Tn, кодирует белок, который характеризуется по меньшей мере 93% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3. В других вариантах осуществления ген, придающий устойчивость к Tn, кодирует белок, который характеризуется по меньшей мере 94% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления ген, придающий устойчивость к Tn, кодирует белок, который характеризуется по меньшей мере 93% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. В еще других вариантах осуществления ген, придающий устойчивость к Tn, кодирует белок, который характеризуется по меньшей мере 94% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления ген млекопитающего, придающий устойчивость к Tn, включает ген китайского хомячка (*Cricetulus griseus*), придающий устойчивость к Tn. В других вариантах осуществления ген млекопитающего, придающий устойчивость к Tn, включает ген человека, придающий устойчивость к Tn.

Ген, придающий устойчивость к Tn, может также содержать последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17.

В определенных вариантах осуществления вышеупомянутых изобретений ген млекопитающего, придающий устойчивость к Tn, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере 92% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления ген млекопитающего, придающий устойчивость к Tn, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере 92% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 12.

По меньшей мере один регуляторный элемент, функционально связанный с геном, придающим устойчивость к Tn, обеспечивают в выделенной клетке по настоящему изобретению, где регуляторный элемент содержит без ограничения промотор, сайт связывания рибосомы и энхансер. В еще других вариантах осуществления GOI функционально связан с промотором. В другом варианте осуществления GOI функционально связан с сайтом связывания рибосомы, таким как IRES.

В некоторых вариантах осуществления изолированные клетки и способы по настоящему изобретению дополнительно содержат второй представляющий интерес ген (GOI), тогда как GOI кодирует белок, представляющий интерес (POI). В одном варианте осуществления представляющий интерес ген (GOI) является экзогенно добавленным GOI. В другом варианте осуществления экзогенно добавленный GOI представляет собой ген человека. В еще одном варианте осуществления регуляторный элемент представ-

ляет собой экзогенно добавленный регуляторный элемент.

В других вариантах осуществления первый и/или второй GOI кодирует POI, включающий без ограничения тяжелую цепь антитела, легкую цепь антитела, антигенсвязывающий фрагмент и/или слитый белок, содержащий Fc-фрагмент.

В другом варианте осуществления первый GOI и второй GOI независимо выбраны из группы, включающей ген, кодирующий легкую цепь антитела или ее антиген-специфический фрагмент, тяжелую цепь антитела или ее антиген-специфический фрагмент, слитый белок, содержащий Fc-фрагмент, или его фрагмент и рецептор или его лиганд-специфический фрагмент. В одном варианте осуществления сайт распознавания рекомбиназы присутствует между первым GOI и вторым GOI. В других вариантах осуществления настоящее изобретение дополнительно предусматривает сайт распознавания рекомбиназы на 5'-конце первого GOI и сайт распознавания рекомбиназы на 3'-конце в соответствии со вторым GOI.

В еще другом варианте осуществления GOI кодирует гликопротеин, выбранный из легкой цепи антитела или ее антигенсвязывающего фрагмента, тяжелой цепи антитела или ее антигенсвязывающего фрагмента, слитого белка, содержащего Fc-фрагмент, или его фрагмента, лиганда и рецептора или его лигандсвязывающего фрагмента.

Выделенные клетки, не встречающиеся в природе, согласно настоящему изобретению могут быть получены из эукариотической клетки. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой клетку человека *ex vivo*. В другом варианте осуществления клетка выбрана из группы, включающей CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), лимфоцит, стволовую клетку, клетку сетчатки, Vero, CV1, клетку почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальную), CV-1, U937, 3T3, L-клетку, клетку C127, SP2/0, NS-0, MMT клетку, опухолевую клетку и линию клеток, происходящую от вышеупомянутых клеток. В определенных вариантах осуществления выделенная клетка по настоящему изобретению представляет собой клетку CHO-K1, лимфоцит, клетку сетчатки или стволовую клетку.

В одном варианте осуществления первая концентрация Tn составляет 1 мкг/мл. В другом варианте осуществления возрастающие концентрации Tn предусматривают вторую и третью концентрацию Tn.

В некоторых вариантах осуществления вторая концентрация выше, чем первая концентрация Tn, а третья концентрация выше, чем вторая концентрация Tn. В определенных вариантах осуществления вторая концентрация Tn составляет 2,5 мкг/мл, а третья концентрация составляет 5 мкг/мл.

В еще других вариантах осуществления возрастающие концентрации Tn предусматривают вторую концентрацию Tn, где вторая концентрация Tn составляет 2,5 или 5 мкг/мл.

Любые аспекты и варианты осуществления по настоящему изобретению можно применять совместно с любым другим аспектом или вариантом осуществления по настоящему изобретению, если иное не упомянуто или не видно из контекста.

Другие цели и преимущества будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 проиллюстрирована блок-схема работающей экспрессионной кассеты при клонировании конструкции вектора, используемого для введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес ген, например eGFP, в геном клетки. Промотор SV40: промотор вируса обезьян 40; GPT: GlcNAc-1-P-трансфераза (например, CHO-GPT, SEQ ID NO: 2; или hGPT, SEQ ID NO: 12); IRES: внутренний сайт связывания рибосомы; eGFP: усиленный зеленый флуоресцентный белок; SV40polyA: polyA вируса обезьян 40.

На фиг. 2A-2C представлены выравнивания аминокислотных последовательностей GPT млекопитающих, а именно человека (GPT_HUMAN; UniProtKB Accn. № Q9H3H5; SEQ ID NO: 4), макаки-резус (GPT_MACMU; UniProtKB Accn. № F6TXM3; SEQ ID NO: 5), шимпанзе (GPT_PANTR; UniProtKB Accn. № H2R346; SEQ ID NO: 6), собаки (GPT_CANFA; UniProtKB Accn. № E2RQ47; SEQ ID NO: 7), морской свинки (GPT_CAVPO; UniProtKB Accn. № E2RQ47; SEQ ID NO: 8), крысы (GPT_RAT; UniProtKB Accn. № Q6P4Z8; SEQ ID NO: 9) и мыши (GPT_MOUSE; UniProtKB Accn. № P42867; SEQ ID NO: 10) по сравнению с аминокислотными последовательностями GPT китайского хомячка (GPT_CRIGR; UniProtKB Accn. № P24140; SEQ ID NO: 3).

На фиг. 3A и 3B приведены примеры, как можно достичь оптимизации белков с применением способов и композиций по настоящему изобретению. На фиг. 3A изображен способ селекции клеток положительного трансфектанта из первого пула клеток, культивируемых с 1 мкг/мл туникамицина (Tn). Затем второй культуры клеток с увеличенной концентрацией туникамицина, например, до 2,5 или 5 мкг/мл, которая повышает экспрессию белка. На фиг. 3B изображен способ селекции клеток положительного трансфектанта из первого пула клеток, культивируемых с 1 мкг/мл туникамицина (Tn), а затем при серийном повышении концентраций Tn в следующих культурах клеток для того, чтобы оптимизировать экспрессию белка.

На фиг. 4A-4B показана диаграмма рассеяния FACS, отображающая различные параметры селективности с использованием гигромицина. Модифицированные клетки CHO содержат ген YFP, фланки-

роваемый сайтами lox. Селективные маркеры (ген, придающий устойчивость к антибиотикам, и eGFP), фланкированные сайтами lox, включены в сайт YFP и заменяют YFP посредством направленной интеграции с использованием рекомбиназы Cre. Случайные компоненты экспрессируют как YFP, так и eGFP. Фиг. 4A: клетки трансфицировали вектором рекомбиназы Cre и вектором экспрессии hprt, содержащим eGFP; но при этом культивировали без гигромицина в культуре. Фиг. 4B: клетки трансфицировали вектором рекомбиназы Cre и вектором экспрессии hprt, содержащим eGFP; в присутствии 400 мкг/мл гигромицина.

На фиг. 5A-5F показана диаграмма рассеяния FACS, отображающая различные параметры селективности туникамицина. Модифицированные клетки CHO содержат ген YFP, фланкированный сайтами lox. Селективные маркеры (ген, придающий устойчивость к антибиотикам, и eGFP), фланкированные сайтами lox, включены в сайт YFP и заменяют YFP посредством направленной интеграции с использованием рекомбиназы Cre. Случайные компоненты экспрессируют как YFP, так и eGFP. Фиг. 5A: клетки трансфицировали вектором рекомбиназы Cre и вектором экспрессии CHO-GPT, содержащим eGFP; но при этом культивировали без туникамицина в культуре. Фиг. 5B: клетки трансфицировали вектором рекомбиназы Cre и вектором экспрессии CHO-GPT, содержащим eGFP; в присутствии 1 мкг/мл Tn. Фиг. 5C: клетки трансфицировали вектором рекомбиназы Cre и вектором экспрессии CHO-GPT, содержащим eGFP; в присутствии 2,5 мкг/мл Tn. Фиг. 5D: клетки трансфицировали вектором рекомбиназы Cre и вектором экспрессии GPT, содержащим eGFP; но при этом культивировали без туникамицина в культуре. Фиг. 5E: клетки трансфицировали вектором рекомбиназы Cre и вектором экспрессии GPT человека, содержащим eGFP; в присутствии 1 мкг/мл Tn. Фиг. 5F: клетки трансфицировали вектором рекомбиназы Cre и вектором экспрессии GPT человека, содержащим eGFP; в присутствии 2,5 мкг/мл Tn.

На фиг. 6A и 6B показаны пулы клеток, экспрессирующие GPT, по сравнению с пулами, не экспрессирующими GPT, при их относительной возможности увеличивать экспрессию функционально связанного GOI, такого как eGFP. На фиг. 6A проиллюстрировано относительное число копий гена CHO-GPT, измеренное посредством ПЦР для следующих пулов клеток: клетки Pool-49 (без добавления экзогенного GPT) без селекции Tn; клетки Pool-49 (без экзогенного GPT) с селекцией Tn; клетки Pool-1, естественным образом экспрессирующие повышенные количества GPT (данные не указаны) и их тестируют без селекции; клетки Pool-78 (без экзогенного GPT) без селекции Tn; клетки CHO, экспрессирующие экзогенно-добавленный hprt, и с селекцией с использованием 400 мкг/мл гигромицина; клетки CHO, экспрессирующие экзогенный GPT в условиях селекции с 1 мкг/мл Tn; клетки CHO, выбранные из селекционного пула 1 мкг/мл Tn, дополнительно культивировали в 1 мкг/мл Tn; клетки CHO, экспрессирующие экзогенный GPT, выбранные из селекционного пула 1 мкг/мл Tn, дополнительно культивировали в 2,5 мкг/мл Tn; клетки CHO, экспрессирующие экзогенный GPT, выбранные из селекционного пула 1 мкг/мл Tn, дополнительно культивировали в 5 мкг/мл Tn. На фиг. 6B проиллюстрировано относительное число копий представляющего интерес гена, eGFP, измеренное посредством ПЦР для таких же пулов клеток (как на фиг. 6A).

На фиг. 7A-7D проиллюстрированы характеристики гликоформ содержащего Fc-фрагмент слитого белка 1 (FcFP1), полученные из культуры клеток, как указано ниже на фиг. 7A, клетки CHO не экспрессируют GPT с применением общепринятого протокола (серия B10002M410) по сравнению с фиг. 7B, где показаны клетки CHO, экспрессирующие CHO-GPT, и без селекции с Tn (серия 110728). Фиг. 7C: клетки CHO, экспрессирующие CHO-GPT и выбранные из 1 мкг/мл Tn (серия 110728-01), по сравнению с фиг. 7D, где клетки CHO, экспрессирующие CHO-GPT и выбранные из 5 мкг/мл Tn (серия 110728-02). На каждой хроматограмме указаны фракции, содержащие сialiрированные остатки, как указано ниже: OSA = ноль остатков сиаловой кислоты; ISA = один остаток сиаловой кислоты; 2SA = два остатка сиаловой кислоты; 3SA = три остатка сиаловой кислоты; 4SA = четыре остатка сиаловой кислоты.

На фиг. 8 проиллюстрировано наложение профиля гликозилирования содержащего Fc-фрагмент слитого белка 1 (FcFP1), отобранного из (A) серии B10002M410, (B) серии 110728, (C) серии 110728-01 и (D) серии 110728-02. Гликопрофили каждого белка, полученного из большого числа GPT, совмещали с эталоном белка, а главные виды гликоформ стабильно получали. Очевидно, что новые и уникальные виды гликоформ получали в сериях GPT по сравнению с эталоном белка.

Подробное описание изобретения

Перед описанием способов настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Используемые в данном документе и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на форму множественного числа, не считая контекста в котором четко продиктовано иное. Таким образом, например, ссылка на "способ" включает один или несколько способов и/или стадий, описанных в данном документе, и/или которые станут очевидными специалистам в данной области техники при прочтении настоящего раскрытия.

Если не определено иное или иное не упомянуто, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение.

Хотя при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только конкретные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Ряд генов, хорошо известных в данной области техники, может придавать селективируемый фенотип клеткам млекопитающих в культуре. Обычно селективные маркерные гены экспрессируют белки, как правило, ферменты, которые придают устойчивость к различным антибиотикам в культуре клеток. В некоторых условиях селекции клетки, которые экспрессируют флуоресцентный белок-маркер, становятся видимыми и таким образом селективными. Примеры в данной области техники включают β -лактамазу (bla; ген, придающий устойчивость к β -лактамам антибиотикам или ampR; ген, придающий устойчивость к ампициллину), bls (ген ацетилтрансферазы, придающий устойчивость к бластидину), гигромицинфототрансферазу (hpt; ген, придающий устойчивость к гигромицину) и другие.

Способы, описанные в данном документе, основаны на применении туникамицина и ферментов (маркеров), которые могут обеспечивать устойчивость клеток к туникамицину при росте в культуре клеток. Туникамицин (Tn) представляет собой смесь антибиотиков, которые воздействуют как ингибиторы бактериальных и эукариотических N-ацетилглюкозаминтрансфераз, предупреждающих образование промежуточных липидов с N-ацетилглюкозамин и гликозилирование вновь синтезированных гликопротеинов (King, I.A., and Tabiowo, A., 1981, Effect of tunicamycin on epidermal glycoprotein and glycosaminoglycan synthesis in vitro. *Biochem. J.*, 198(2):331-338). Tn является цитотоксическим препаратом, поскольку он специфически подавляет UDP-N-ацетилглюкозамин: долихолфосфат-N-ацетилглюкозамин-1-P-трансферазу (GPT), фермент, который катализирует начальную стадию биосинтеза олигосахаридов, связанных с долихолом. В присутствии туникамицина связанные с аспарагином гликопротеины, произведенные в эндоплазматическом ретикулуме (ER), не гликозилируются N-связанными гликанами и, следовательно, не могут правильно складываться в ER, и поэтому могут подвергаться целенаправленному разрушению (Koizumi, et al. 1999, *Plant Physiol.* 121(2):353-362). Поэтому Tn является значимым также фактором ответной реакции несвернутых белков (UPR), что приводит к апоптозу в бактериальных и эукариотических клетках.

Ген уридиндифосфата GPT (также известный как GlcNAc-1-P-трансфераза) определили как сверхэкспрессирующийся в определенных клеточных условиях для того, чтобы придать устойчивость Tn (Criscuolo and Krag, 1982, *J. Biol. Chem.*, 263(36): 19796-19803; Koizumi, et al., 1999, *Plant Physiology*, Vol. 121, pp. 353-361). Ген, кодирующий GPT, также описанный как GenBank Accn. № M36899 (SEQ ID NO: 2), выделяли из линии клеток яичника китайского хомячка, устойчивых к Tn, и при этом он кодирует белок из 408 аминокислот (SEQ ID NO: 3) (Scocca and Krag, 1990, *J. Biol. Chem.* 265(33):20621-20626; Lehrman, M. et al., 1988, *J. Biol. Chem.* 263(36): 19796-803). Сверхэкспрессировали GPT хомячка в дрожжевых клетках (*S. pombe*) и придавали устойчивость к Tn в данных клетках; при этом также обеспечивали подходящий источник для очистки фермента GPT (Scocca J.R., et al. 1995, *Glycobiology*, 5(1):129-36). Уровни транскриптов GPT анализировали в клетках гибридомы (В-клетки, экспрессирующие IgG, в сравнении с покоящимися В-клетками), при этом обнаружили, что клетки, продуцирующие IgG, не проявляют повышенных уровней транскриптов GPT или активности, до тех пор, пока небольшое увеличение в GPT не будет наблюдаться при переходе от покоящихся до активных В-клеток. Сделали заключение, что уровни GPT могут соответствовать раннему развитию пролиферативного ответа на стимуляцию LPS (антигеном) в В-клетках (Crick, D.C. et al, 1994, *J. Biol. Chem.* 269(14):10559-65).

Кроме того, ранее было известно, которое из двух изменений экспрессии в клеточной системе экспрессии GPT, с Tn или без Tn, будет оказывать воздействие на гликозилирование белкового продукта и, следовательно, на качество продукта. Понятно, что оптимальное и стабильное гликозилирование является решающим свойством белка при получении гликопротеинов для терапевтического применения.

Настоящее изобретение обеспечивает улучшение способа получения рекомбинантных белков в клеточных системах млекопитающих, используя ген млекопитающего, придающий устойчивость к Tn, GPT, в качестве регулируемого селективного маркера, тогда как увеличенное число копий представляющего интерес гена, функционально связанного с GPT, коррелирует с увеличенной случайной интеграцией экспрессионной кассеты GPT в клетку.

Из уровня техники известно, что производство белков для терапевтического применения, особенно гликопротеинов, основывается на системе экспрессии в клетках млекопитающих, имитирующей естественное гликозилирование таких белков (обзор см. в Bork, K. et al., 2009, *J. Pharm. Sci.* 98(10):3499-3508.) Например, терминальные моносахариды определенных гликопротеинов, такие как N-связанные сложные гликаны, как правило, заняты сиаловой кислотой. Сиалирование может влиять на фармакокинетические свойства гликопротеинов, такие как абсорбция, время полужизни в сыворотке крови и выведение или другие физико-химические или иммуногенные свойства гликопротеинов. Сверхэкспрессированные ре-

комбинантные гликопротеины часто характеризуются несовершенным или нестабильным гликозилированием. Надежные способы являются решающими для обеспечения консистенции и качества гликопротеинов для терапевтического применения, полученных в клеточных линиях млекопитающих.

Настоящее изобретение также предусматривает улучшенный способ гликозилирования рекомбинантных белков, т.е. способ получения гликопротеинов в клеточных системах млекопитающих для того, чтобы обеспечить стабильное качество выхода требуемых белков.

Определения.

Участки ДНК являются функционально связанными, если они функционально связаны друг с другом. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор способен участвовать в транскрипции последовательности; сайт связывания рибосомы является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы обеспечить трансляцию. Как правило, функционально связанный сайт может включать, но не требует, смежного расположения. В случае последовательностей, таких как секреторные лидерные, смежное расположение и правильность размещения в рамке считывания являются типичными признаками. Последовательность и усиливающая продуцирование, такая как промотор, является функционально связанной с представляющим интерес геном (GOI), если он функционально связан с GOI, например, где его присутствие приводит к увеличению экспрессии GOI.

В связи с этим, выражение "функционально связанный", а именно в контексте ДНК-конструкций на основе вектора экспрессии, контролирующая последовательность, например промотор или оператор, или маркер, расположена соответствующим образом в положении относительно кодирующей последовательности, так что контролирующая последовательность управляет или обеспечивает возможность продуцирования полипептида/белка, представляющего интерес, кодируемого кодирующей последовательностью. Например, поскольку селективный маркер необходим для выживания клеток в данных культуральных условиях, представляющий интерес ген является функционально связанным с селективным маркерным геном, поэтому экспрессия не будет происходить без присутствия функционального селективного маркерного белка.

"Промотор", используемый в данном документе, указывает на последовательность ДНК, достаточную для направленной транскрипции последовательности ДНК, с которой он функционально связан, т.е. причем связан таким образом, чтобы обеспечить транскрипцию представляющего интерес гена и/или селективного маркерного гена, если присутствуют подходящие сигналы. Экспрессия гена может происходить под контролем любого промоторного или энхансерного элемента, известного из уровня техники.

"Вектором экспрессии" в контексте настоящего изобретения может быть любой подходящий вектор, в том числе хромосомный вектор, вектор, отличный от хромосомного и векторы на основе синтетической нуклеиновой кислоты (последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, дрожжевые плазмиды, векторы, происходящие из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном варианте осуществления слитый белок, содержащий Fc-фрагмент, или молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, включены в голый вектор ДНК или РНК, в том числе, например, в линейный элемент экспрессии (как описано, к примеру, в Sykes and Johnston, 1997, Nat Biotech 12, 355-59), уплотненный вектор нуклеиновой кислоты (как описано, к примеру, в US 6077835 и/или WO 00/70087) или плазмидный вектор, такой как pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119. Такие векторы нуклеиновой кислоты и их применение хорошо известны в данной области техники (см., к примеру, US 5589466 и US 5973972).

Используемый в данном документе "оператор" указывает на последовательность ДНК, которая введена в ген или возле гена таким образом, что ген может регулироваться при связывании репрессорного белка с оператором и, вследствие этого, предотвратить или обеспечить транскрипцию GOI, т.е. нуклеотида, кодирующего полипептид или представляющий интерес белок.

Сайты связывания рибосомы включают "внутренние сайты связывания рибосомы" (IRES) или могут включать 5'-кэп. Многие последовательности IRES хорошо известны в данной области техники. IRES представляют контролируемую последовательность трансляции, где сайт IRES, как правило, расположен на 5'-конце представляющего интерес гена и обеспечивает трансляцию РНК кэп-независимым образом. Транскрибированные IRES могут направленно связывать рибосомные субъединицы таким образом, что расположение мРНК в инициаторных кодонах правильно ориентировано в рибосоме для трансляции. Последовательности IRES, как правило, расположены на 5'-конце UTR мРНК (непосредственно перед стартовым кодоном). IRES функционально заменяют необходимость в различных белковых факторах, которые взаимодействуют с комплексом трансляции эукариот.

Термины "усиленный" или "улучшенный" используют для описания экспрессии белка, включая увеличение в отношении количества и/или в отношении качества консистенции белка (т.е. продукта гена), полученного посредством системы экспрессии или способами по настоящему изобретению. В связи с этим, это включает усиление по меньшей мере от приблизительно 1,5-кратному до по меньшей мере приблизительно 3-кратного усиления экспрессии, выше той, которую, как правило, наблюдают при случайной интеграции в геном, например, по сравнению с пулом компонентов, применяемых в другой кон-

струкции селективного маркера. В связи с этим, кратное усиление экспрессии, наблюдаемое для представляющих интерес белков, сравнивали с уровнем экспрессии того же гена, измеренного при, главным образом, тех же условиях в отсутствие экспрессионной кассеты или клетки по настоящему изобретению, содержащей ген GPT, или в присутствии экспрессионной кассеты или клетки, содержащей другой селективный маркер. Усиление экспрессии можно также измерять с помощью результирующего числа событий случайной интеграции. Усиленная эффективность рекомбинации включает усиление способности локуса рекомбинировать (например, использовать сайты узнавания рекомбиназы). Усиление относится к измеряемой эффективности случайной рекомбинации, которая, как правило, составляет 0,1%. В определенных условиях усиление эффективности рекомбинации приблизительно в 10 раз выше случайного или приблизительно 1%. Если не указано иное, заявленное изобретение не ограничено конкретной эффективностью рекомбинации. Усиление экспрессии можно также измерять с помощью результирующего числа копий гена, измеренных посредством количественной полимеразной цепной реакции (qPCR) или другой хорошо известной методикой.

Усиленный или улучшенный продукт также относится к более стабильному качеству, например, посттрансляционным модификациям, наблюдаемым в системе экспрессии GPT по настоящему изобретению. Стабильное качество включает имеющийся, например, желаемый профиль гликозилирования после репликации производственных линий. Консистенция, в соответствии с качеством, относится к степени однородности и стандартизации, тогда как производственные серии репликаций в основном не содержат изменений. Вычисление Z-числа для измерения консистенции преподается в данном документе. Другие статистические показатели известны в данной области техники для измерения консистенции.

Выражение "селективное давление" представляет собой силу или стимул, применяемый в отношении живого организма (например, клетки) или системы (например, системы экспрессии), которая меняет поведение и выживаемость (такую как способность к выживанию) живого организма или системы в данных условиях окружающей среды.

Выражение "амплификация гена" подразумевает увеличение количества идентичных копий последовательности гена. Определенные клеточные процессы характеризуют при получении множественных копий определенного гена или генов, которые амплифицируют фенотип, который ген придает клетке, например устойчивость к антибиотикам.

Поскольку выражение "экзогенно добавленный ген" или "экзогенно добавленный GOI" используют со ссылкой на экспрессионную кассету, выражение относится к любому гену, который не присутствует в геноме клетки, обнаруженной в природе, или дополнительной копии гена, интегрированной в геном (в различные локусы). Например, "экзогенно добавленным геном" в геном СНО (например, селективный маркерный ген) может быть ген хомяка, не найденный в конкретном локусе СНО в природе (т.е. ген хомяка из другого локуса в геноме хомяка), ген из любых других видов (например, ген человека), химерный ген (например, человека/мыши) или может быть ген хомяка, не найденный в геноме СНО в природе (т.е. ген хомяка, имеющий мене чем 99,9% идентичности с геном из другого локуса в геноме хомяка), или любой другой ген, не найденный в природе, который существует в природном геноме СНО.

События случайной интеграции отличаются от событий направленной интеграции, поскольку вставка гена в геном клетки не является сайт-специфичной в событиях случайной интеграции. Примером направленной интеграции является гомологичная рекомбинация. Случайная (негомологичная) интеграция подразумевает, что расположение (локус) полученного компонента не известно или не указано. Случайная интеграция предположительно происходит путем негомологичного соединения концов (NHEJ), однако не ограничена настоящим способом.

Эффективность селекции подразумевает процент выживших клеток в популяции, которые экспрессируют селективный маркер, и, если необходимо, представляющий интерес белок под контролем селективного маркера.

Процент идентичности при описании белка, устойчивого к Tn, направлен на включение гомологичных последовательностей, которые проявляют перечисленную идентичность вдоль участков со смежной гомологией, но не принимают во внимание присутствие гэпов, делеций или вставок, которые не имеют гомолога со сравниваемой последовательностью при расчете процента идентичности. При объяснении применения "процента идентичности" в данном контексте следующее сравнение аминокислотной последовательности будет относиться к

1 MWAFPELPLPLPLLVNLIGSLLGFVATVTTLIPAFRSHFIAARLCGQDLNKLSSQQIPESQ 60 GPT_MOUSE

1 MWAFPELPL--PLLVNLFGSLLGFVATVTTLIPAFRSHFIAARLCGQDLNKLSSRQQIPESQ 58 GPT_CRIG

Применяемое в данном документе определение "процент идентичности" между "GPT_CRIG" вышеупомянутой последовательности (для китайского хомячка с GPT) и мышинного гомолога ("GPT_MOUSE") не включает сравнение аминокислот 10 и 11 хомяка из-за того, что гомолог хомяка не имеет гомологичных последовательностей по сравнению с последовательностями, расположенными на одной оси (т.е. мышинный GPT имеет вставку в данной точке, а гомолог хомяка имеет гэп или делецию, в зависимости от обстоятельств). Таким образом, сравниваемое выше сравнение процента идентичности будет распространяться от "MWA" на 5'-конце до "ESQ" на 3'-конце. В таком случае мышинный гомолог

отличается только в том, что имеет R в GPT хомяка в положении 51. При сравнении более 58 смежных оснований на протяжении 60 пар оснований только с одним аминокислотным отличием (которое не является гэпом, делецией или вставкой) идентичность между двумя последовательностями (хомяка и мыши) составляет более 98% от GPT хомяка в положении 1 до GPT хомяка в положении 58 (поскольку "процент идентичности" не включает потерь из-за гэпов, делеций и вставок). Хотя вышеупомянутый пример основан на аминокислотной последовательности, понятно, что процент идентичности последовательности нуклеиновой кислоты будет посчитан подобным образом.

Термин "клетка" включает любую клетку, которая подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот (одноклеточных или многоклеточных), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* и т.д.), клетки микобактерий, клетки грибов, клетки дрожжей (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* и т.д.), клетки растений, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, клетки насекомых, зараженные бакуловирусами, *Trichoplusia ni* и т.д.), клетки животных, отличных от человека, клетки млекопитающих, клетки человека или продукты слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квадромы. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клеток сетчатки, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальной), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, MMT клетки, опухольной клетки и линии клеток, происходящей из вышеупомянутых клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов, например клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6®).

Выражение "интегральная плотность клеток" или "ICD" подразумевает плотность клеток в среде для культивирования, взятую как интеграл в течение определенного периода времени, выраженное как клетка-дней на мл. В некоторых вариантах осуществления ICD измеряют примерно на двенадцатый день пребывания клетки в культуре.

"Гликозилирование" или выражение "гликозилирование белка" включает образование гликопротеинов, исходя из того, что олигосахариды присоединяются либо к боковой цепи остатка аспарагина (Asn) (т.е. N-связанного) или остатка серина (Ser)/треонина (Thr) (т.е. O-связанного) белка. Гликаны могут быть гомополимерами или гетерополимерами остатков моносахаридов, которые могут быть линейными или разветвленными. Известно, что N-связанное гликозилирование в первую очередь инициируется в эндоплазматическом ретикулуме, тогда как показано, что O-связанное гликозилирование инициируется либо в ER, либо в аппарате Гольджи.

"Белки с N-гликанами" или "белковый субстрат с N-гликанами" включает белки, которые содержат или могут присоединять N-связанные олигосахариды. N-гликаны могут содержать N-ацетилглюкозамин (GalNAc), маннозу (Man), фукозу (Fuc), галактозу (Gal), нейраминную кислоту (NANA) и другие моносахариды, однако N-гликаны обычно имеют единый комплекс структуры пентасахарида, включающий сахара трех манноз и двух N-ацетилглюкозаминов (GlcNAc). Белки со следующей друг за другом аминокислотной последовательностью (т.е. сиквеном) Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X представляет собой любую аминокислоту кроме пролина, могут обеспечивать сайт присоединения для N-гликанов.

Общее описание

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что в определенных условиях рекомбинантные белки можно получать в клетке, где ген кодирует белок, который функционально связан с геном, придающим устойчивость к Tn, GPT, и при этом селекцию клетки для получения белка формируют для увеличения событий случайной интеграции в геноме клетки и, таким образом, увеличения числа копий представляющего интерес гена, а в конечном итоге и получения белка.

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того, что клетку для получения белка можно оптимизировать для экспрессии белков со стабильными и надежными посттрансляционными модификациями. Экспрессионные кассеты GPT можно также интегрировать в клеточный геном, как и в конструкции для экспрессии, например, с помощью векторов для экспрессии и применения различных методик по изменению гена, известных в данной области техники. Векторы экспрессии, включающие GPT, можно интегрировать в геном путем случайной или направленной рекомбинации, такой как гомологичная рекомбинация или рекомбинация, опосредованная рекомбиназами, которые распознают конкретные сайты рекомбинации (например, Cre-lox-опосредованная рекомбинация).

Гомологичную рекомбинацию в эукариотических клетках можно облегчать при введении разрыва в сайте интеграции хромосомной ДНК. На модельных системах продемонстрировано, что частота гомологичных рекомбинаций во время направленного воздействия на ген увеличивается, если двухцепочечный разрыв введен в хромосомную последовательность-мишень. Данное может быть выполнено при направлении определенных нуклеаз в конкретные сайты интеграции. ДНК-связывающие белки, которые распознают последовательности ДНК в намеченном локусе, известны в данной области техники. Векторы, направленные на ген, также используют для облегчения гомологичной рекомбинации. При отсутствии

вектора, направленного на ген, для направленного восстановления гомологии, клетки зачастую закрывают двухцепочечный разрыв путем негомологичного соединения концов (NHEJ), что может привести к делеции или вставке множества нуклеотидов в сайт расщепления. Конструкция вектора, направленного на ген, и селекция нуклеазы находятся в пределах квалификации специалиста в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение.

В некоторых примерах цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), которые характеризуются модулярной структурой и содержат отдельные цинк-пальцевые домены, распознают конкретную 3-нуклеотидную последовательность в последовательности-мишени (например, в сайте направленной интеграции). В некоторых вариантах осуществления можно использовать ZFN в комбинации с отдельными доменами цинковых пальцев, нацеленных на множество последовательностей-мишеней.

Эффекторные нуклеазы (TALEN), подобные активатору транскрипции (TAL), также можно использовать для сайт-специфичного изменения генома. Эффекторный белок TAL ДНК-связывающего домена, как правило, используют в комбинации с неспецифическим доменом расщепления нуклеазы рестрикции, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий эффекторный белок TAL ДНК-связывающего домена и домен расщепления нуклеазы рестрикции, используют для распознавания и расщепления ДНК в локусе последовательности-мишени по настоящему изобретению (Boch J. et al., 2009 Science 326:1509-1512).

РНК-управляемые эндонуклеазы (RGEN) представляют собой программируемые инструменты для генной инженерии, которые разработаны благодаря бактериальному адаптивному иммунному механизму. В данной системе, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, (CRISPR)/CRISPR-ассоциированный (Cas) иммунный ответ, представляют собой белок Cas9, который формирует эндонуклеазу, специфичную к определенной последовательности при образовании комплекса с двумя РНК, одна из которых направлена на выбор мишени. RGEN включают компоненты (Cas9 и tracrRNA) и направленные CRISPR РНК (crRNA). Как эффективность направленного расщепления ДНК, так и расположение сайтов расщепления меняется на основании положения мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), дополнительно необходимого для распознавания мишени (Chen, H. et al, J. Biol. Chem., опубликованная онлайн 14 марта 2014, как Manuscript M113.539726).

Специалистам в данной области техники доступны еще и другие способы гомологичной рекомбинации, такие как BuD-получение нуклеаз (BuDN) с определенной ДНК-связывающей специфичностью (Stella, S. et al. Acta Cryst. 2014, D70, 2042-2052). Выбор способов точной модификации генома основан на доступных инструментах, совместимых с уникальными последовательностями-мишенями в геноме, поэтому избегают нарушения фенотипа клеток.

Клетки и способы предусматривают для стабильного интегрирования последовательности нуклеиновой кислоты (представляющего интерес гена) в клетку млекопитающих, где последовательность нуклеиновой кислоты способна к усиленной экспрессии благодаря интеграции с последовательностью GPT. Композиции и способы также предусматривают для применения GPT вместе с конструкциями для экспрессии, например векторами экспрессии, и для добавления экзогенных GPT в представляющую интерес клетку млекопитающих. Клетки и способы предусматривают для применения в стабильном, достаточно надежном способе получения гликопротеинов, в частности гликопротеинов для терапевтического применения.

Конструкция кассеты селективного маркера GPT.

Векторы экспрессии, содержащие работающую экспрессионную кассету GPT, предусмотрены в данном документе. Экспрессионная кассета содержит необходимые регуляторные элементы для разрешения и запуска транскрипции и трансляции GPT млекопитающих и продукта требуемого гена.

Могут быть также разработаны различные комбинации генов и регуляторных последовательностей, описанные в данном документе. Примеры других комбинаций подходящих последовательностей, описанных в данном документе, которые также можно разработать, включают последовательности, которые содержат множественные копии генов GPT, раскрытых в данном документе, или последовательности, полученные при объединении раскрытых GPT с другими последовательностями нуклеотидов, для достижения оптимальных комбинаций регуляторных элементов. Такие комбинации могут быть смежно связаны или расположены с обеспечением оптимального интервала между GPT, ориентированным к представляющему интерес гену и регуляторным элементам.

Гомологичные последовательности генов, кодирующих GPT, известны в клетках других видов млекопитающих (таких как, например, люди; см. фиг. 2), а также в клеточных линиях, полученных из других типов тканей млекопитающих, и при этом их можно изолировать с помощью методик, которые хорошо известны в данной области техники. На фиг. 2 предусматривают иллюстративный перечень аминокислотных последовательностей GPT млекопитающих. Изменения нуклеотидной последовательности, такие как оптимизация кодона, можно сделать в отношении нуклеотидных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 2 и 11-17, чтобы разрешить оптимальную экспрессию соответствующих белков GPT, изложенных в SEQ ID NO: 3-10. Кроме того, изменения можно сделать в аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3-10, при создании изменений в нуклеотидных последовательностях, кодирующих GPT. Такие методики включают без ограничения методики сайт-направленного или случай-

ного мутагенеза, хорошо известных в данной области техники.

Полученные варианты GPT могут затем тестировать на активность GPT, описанную в данном документе, например тестирование на устойчивость к туникамицину. Белки GPT, которые характеризуются по меньшей мере приблизительно 93% идентичностью, или по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью, или по меньшей мере приблизительно 96% идентичностью, или по меньшей мере приблизительно 97% идентичностью, или по меньшей мере приблизительно 98% идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, характеризующейся активностью GPT, могут быть выделены с помощью стандартных экспериментов, и, как ожидается, проявляют такую же устойчивость к Tn, селективную эффективность и посттрансляционные преимущества, как для SEQ ID NO: 3. Соответственно, гомологи GPT млекопитающих и варианты GPT включены в варианты осуществления по настоящему изобретению. На фиг. 2A-2C показаны выравнивания различных аминокислотных последовательностей GPT млекопитающих (а именно, SEQ ID NO: 3-10). Последовательности GPT млекопитающих (нуклеиновой кислоты и аминокислоты) остаются консервативными в геномах хомяка, человека, мыши и крысы. В табл. 1 определены иллюстративные белки GPT млекопитающих и уровень их гомологии.

Таблица 1A

Аминокислотная идентичность гомологов GPT

Животное	SEQ ID	%id человека	%id мыши	%id крысы	%id хомяка
	NO	человека			
Хомяк	3	93,87	96,08	96,08	-
Мышь	10	94,12	-	97,07	96,08
Человек	4	-	94,12	93,63	93,87
Крыса	9	93,63	97,07	-	96,08

Таблица 1B

Идентичность нуклеиновой кислоты представленных гомологов GPT

Животное	SEQ ID NO	%id хомяка
Хомяк	2	-
Мышь	11	92
Человек	12	92
Крыса	13	94
Макака	14	92
Шимпанзе	15	92

Можно разработать клеточные популяции, экспрессирующие повышенные уровни представляющего интерес белка с применением способов GPT/туникамицин, предусмотренных в данном документе. Абсолютный уровень экспрессии будет меняться с конкретным белком в зависимости от того, как эффективно белок процессируется в клетке.

Соответственно, настоящее изобретение также включает нуклеотидную последовательность, экспрессирующую GPT, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 11-17. Настоящее изобретение также охватывает нуклеотидную последовательность, экспрессирующую GPT, которая характеризуется по меньшей мере 92% идентичностью, по меньшей мере 93% идентичностью, по меньшей мере 94% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью, по меньшей мере 96% идентичностью, по меньшей мере 98% идентичностью или по меньшей мере 99% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 11-17.

Настоящее изобретение включает векторы, содержащие SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 12. Векторы, содержащие ген GPT млекопитающих и факультативные регуляторные элементы, включают векторы для временной или стабильной трансфекции.

В одном варианте осуществления ген GPT используют для повышения экспрессии GOI, как проиллюстрировано на фиг. 1. На фиг. 1 показан GOI, функционально связанный с IRES последовательностью и селективным маркером GPT. Кассета GPT дополнительно включает последовательность промотора, например промотора SV40, и полиаденилированную последовательность (поли(A)), например SV40 поли(A).

Усиленная экспрессионная кассета (включает GPT и предшествующий промотор) оптимально интегрирована в геном клетки. С применением способов по настоящему изобретению GOI экспрессируют в экспрессионной кассете GPT в культуральных условиях, основанных на возрастающих концентрациях Tn (фиг. 3A или 3B). Считывание FACS, таких как показано на фиг. 5B, 5C, 5E и 5F, служит примером распространения экспрессии в стабильно трансфицированной популяции клеток, в частности значительное увеличение эффективности селекции с применением селективных маркеров млекопитающих, придающих устойчивость к Tn, CHO-GPT и hGPT. Экспрессия GPT млекопитающих дополнительно повышает экспрессию продукта представляющего интерес гена, например получение флуоресцентного белка,

eGFP. Следующие друг за другом культуры с возрастающими концентрациями T_n приводят к приблизительно двукратному усилению экспрессии по сравнению с GOI, экспрессированному в системе экспрессии с применением GPT в культуральных условиях, основанных на концентрациях T_n, как представлено на фиг. 6B.

Настоящее изобретение включает клетку млекопитающих, содержащую такой ген GPT, где ген GPT является экзогенным и интегрирован в геном клетки посредством способов по настоящему изобретению. Клетки включают такой ген GPT, имеющий по меньшей мере один экзогеннодобавленный представляющий интерес ген (GOI), который расположен выше или ниже по отношению к гену GPT.

В различных вариантах осуществления экспрессию GOI можно усилить, помещая GOI под контроль селективного маркера GPT млекопитающих. В других вариантах осуществления события случайной интеграции GOI можно усилить, помещая GOI под контроль селективного маркера GPT млекопитающих и обеспечивая условия в культуре клеток, включающие концентрацию T_n в более чем 0,5 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления условия в культуре клеток включают концентрацию T_n в более чем 1 мкг/мл. Регуляторный элемент может быть функционально связан с GOI, где экспрессия GOI, на выбранном расстоянии от GOI и GPT (в 5'- или 3'-направлении), поддерживает способность повышать экспрессию GOI выше, например, той, которую, как правило, наблюдают при событии случайной интеграции. В различных вариантах осуществления усиление составляет от по меньшей мере приблизительно 1,5-кратного до приблизительно 2-кратного или более. Усиление экспрессии по сравнению со случайной интеграцией или случайной экспрессией является приблизительно 1,5-кратным или приблизительно 2-кратным или более.

В другом варианте осуществления можно достичь однородного гликозилирования белков с применением способов и композиций по настоящему изобретению. Как показано в табл. 4, партии рекомбинантных белков GPT/GOI обрабатывали посредством T_n, чтобы обеспечить репликацию партии эквивалентными профилями гликозилирования. В связи с этим усиленную экспрессию белка, а именно стабильные профили гликозилирования, можно непосредственно сравнить при подсчете Z-числа, как преподается в данном документе. Равенство Z-числа берут с учетом относительного числа пиков на хроматограмме, отображающих молекулы сиаловой кислоты (SA), а также соответствующей формы и интенсивности каждого пика. Z-число основано на площади, занимаемой каждым пиком, и его можно применять в качестве показателя для определения консистенции сложных гликопротеинов (см., например, фиг. 7A-7D, 8 и пример 3, описанные в данном документе).

Оптимизацию экспрессии белка можно также получить для каждого GOI, в том числе, например, ориентацию экспрессионной кассеты или оптимизацию кодона. Оптимизацию белка можно также получить путем постепенного изменения концентрации T_n в способах культивирования клеток.

Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать синтетические или полученные из кДНК фрагменты ДНК, кодирующие белок, функционально связанные с подходящим транскрипционным и/или трансляционным регуляторным элементом, полученным из генов млекопитающих, вирусов или насекомых. Такие регуляторные элементы содержат транскрипционные промоторы, энхансеры, последовательности, кодирующие подходящие сайты связывания рибосомы мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции, описанную подробно в данном документе. Векторы экспрессии млекопитающих могут также содержать нетранслируемые элементы, такие как точка начала репликации, другие 5' или 3' фланкированные нетранслируемые последовательности, и 5' или 3' нетранслируемые последовательности, такие как донор сплайсированного фрагмента и акцепторный сайт. Могут быть также включены дополнительные селективные маркерные гены (такие как флюоресцентные маркеры) для облегчения узнавания трансфектантов.

В другом варианте осуществления вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты (или представляющий интерес ген), кодирующую представляющий интерес белок, в том числе вектор экспрессии, содержащий описанные молекулы нуклеиновой кислоты (гены), где молекула нуклеиновой кислоты (ген) функционально связана с контролирующей экспрессию последовательностью.

Предусматривают вектор, содержащий представляющий интерес ген (GOI), где GOI функционально связан с контролирующей экспрессию последовательностью, подходящей для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающих.

Пригодные промоторы, которые можно применять в настоящем изобретении, включают без ограничения ранний промоторный участок SV40, промотор, содержащий на 3'-конце длинный терминальный повтор вируса саркомы Рауса, регуляторные последовательности гена металлотионеина, промотор IE цитомегаловируса мышей или человека (Gossen et al., (1995) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:5547-5551), промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты и промотор фотосинтетического фермента рибулозобифосфатдекарбоксилазы, промоторные элементы дрожжей или других грибов, такие как промотор Gal 4, промотор ADC (алкогольдегидрогеназы), промотор PGK (фосфоглицераткиназы), промотор щелочной фосфатазы и следующие участки регуляции транскрипции животных, которые проявляют тканевую специфичность и при этом их используют в отношении на трансгенных животных: эластазу I; инсулин; иммуноглобулин; вирус опухоли молочной железы мышей; альбумин; α-фетопроtein; α1-

антитрипсин; β -глобин и легкую цепь миозина-2.

Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть также функционально связаны с эффективной поли(А) терминальной последовательностью, например SV40 поли(А), точкой начала репликации для продукта плазмиды в *E. coli* и/или подходящим сайтом клонирования (например, полилинкером). Нуклеиновые кислоты могут также содержать регулируемый индуцируемый промотор (индуцируемый, репрессируемый, онтогенетически регулируемый) в отличие от конститутивного промотора, такого как CMV IE (специалистам в данной области техники будет понятно, что данные термины на самом деле являются показателями уровня экспрессии гена при определенных условиях).

Настоящее изобретение обеспечивает способы получения представляющего интерес белка, при этом предусмотрен вектор экспрессии, содержащий представляющий интерес ген (GOI). Такие векторы экспрессии можно применять для получения любого представляющего интерес рекомбинантного белка. Из вирусных источников можно обеспечить транскрипционные и трансляционные контролирующие последовательности в векторах экспрессии, пригодных для трансфицирования клеток позвоночных. Например, обычно применяемые промоторы и энхансеры получают из вирусов, таких как папиллома, аденовирус 2, вирус обезьян 40 (SV40) и цитомегаловирус человека (CMV). Вирусные геномные промоторы, контролирующие и/или сигнальные последовательности можно задействовать для запуска экспрессии, предусмотренной такими контролируемыми последовательностями, которые являются совместимыми с выбранной клеткой-хозяином. В зависимости от типа клетки, в которой рекомбинантный белок должен экспрессироваться, можно также применять невирусные клеточные промоторы (например, β -глобин и EF-1 α промоторы).

Последовательности ДНК, полученные из вирусного генома SV40, например точки начала репликации SV40, ранний и поздний промотор, энхансер, сплайсер и сайты полиаденилирования можно применять для обеспечения других генетических элементов, пригодных для экспрессии гетерологичной последовательности ДНК. Ранние и поздние промоторы как правило пригодны в связи с тем, что их обоим легко получают из вируса SV40 в качестве фрагмента, который также содержит вирусную точку начала репликации SV40 (Fiers et al., *Nature* 273:113, 1978). Можно также применять более мелкие или более крупные фрагменты SV40. Как правило, последовательность, включающая примерно 250 п.о., простирается от сайта HindIII до сайта BglI, расположенного в точке начала репликации SV40.

Бицистронные векторы экспрессии, применяемые для экспрессии множества транскриптов, были описаны ранее (Kim S.K. and Wold B.J., *Cell* 42:129, 1985; Kaufman et al. 1991, *supra*) и их можно применять в комбинации с системой экспрессии GPT. Другие типы векторов экспрессии будут также пригодны, например, как описанные в патенте США № 4634665 (Axel et al.) и патенте США № 4656134 (Ringold et al.).

Сайт интеграции, например, сайт распознавания рекомбиназы, можно поместить на 5'-конце или 3'-конце последовательности генов, кодирующих POI. Одним примером сайта интеграции является сайт lox p. Другим примером сайта интеграции является два сайта узнавания рекомбиназ, например, выбранных из группы, включающей сайт lox p, lox и сайт lox 5511.

Кассеты генной амплификации и их векторы экспрессии.

Пригодные регуляторные элементы, описанные ранее или известные в данной области техники, можно также включать в конструкции нуклеиновых кислот, применяемые для трансфекции клеток млекопитающих. На фиг. 1 приведен пример работающей кассеты в векторе GPT, дополнительно содержащей последовательность промотора, последовательность IRES, представляющий интерес ген и последовательность поли(А).

Вектором экспрессии в контексте настоящего изобретения может быть любой подходящий вектор, в том числе хромосомный, не хромосомный и синтетические векторы из нуклеиновой кислоты (последовательности нуклеиновой кислоты, содержащие набор контролирующих элементов экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловир, дрожжевые плазмиды, векторы, происходящие из комбинаций плазмид и фаговой ДНК и векторы вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, включена в голый вектор ДНК или РНК, в том числе, например, в линейный элемент экспрессии (как описано, к примеру, в Sykes and Johnston, 1997, *Nat Biotech* 12, 355-59), уплотненный вектор нуклеиновой кислоты (как описано, к примеру, в US 6077835 и/или WO 00/70087) или плазмидный вектор, такой как pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119. Такие векторы нуклеиновой кислоты и их применение хорошо известны в данной области техники (см., к примеру, US 5589466 и US 5973972).

Вектором экспрессии в качестве альтернативы может быть вектор, подходящий для экспрессии в системе дрожжей. Можно использовать любой вектор, подходящий для экспрессии в системе дрожжей. Подходящие векторы включают, например, векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как α -фактор дрожжей, алкогольоксидаза и PGH (рассмотренные в F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), and Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)).

В определенных вариантах осуществления вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты (или

представляющий интерес ген), кодирующую представляющий интерес белок, в том числе вектор экспрессии, содержащий описанные молекулы нуклеиновой кислоты (гены), при этом молекула нуклеиновой кислоты (ген) функционально связана с контролирующей экспрессию последовательностью, подходящей для экспрессии в клетке-хозяине.

Контролирующие экспрессию последовательности сконструированы для контроля и запуска транскрипции представляющих интерес генов и последующей экспрессии белков в различных системах клетки. В плазидах комбинируют экспрессируемый представляющий интерес ген с контролирующими экспрессию последовательностями (т.е. экспрессионными кассетами), которые содержат подходящие регуляторные элементы, такие как, например, промоторы, энхансеры, селективные маркеры, операторы и т.д. В векторе экспрессии по настоящему изобретению GPT и представляющие интерес белки, а именно молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела, могут содержать или ассоциироваться с любым подходящим промотором, энхансером, оператором, репрессорным белком, терминальными последовательностями поли (А) и другими облегчающими экспрессию элементами.

Экспрессия представляющего интерес гена, а именно нуклеотидной последовательности, кодирующей антитела, может происходить под контролем любого промоторного или энхансерного элемента, известного из уровня техники. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, промотор/энхансер CMV IE человека или основной промотор CMV IE (CMV-MIE), а также RSV, поздний промотор SV40, SL3-3, MMTV, убиквитин (Ubi), убиквитин С (UbC) и промоторы HIV LTR).

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит промотор, выбранный из группы, включающей SV40, CMV, CMV-IE, CMV-MIE, RSV, SL3-3, MMTV, Ubi, UbC и HIV LTR.

Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть также функционально связаны с эффективной поли(А) терминальной последовательностью, точкой начала репликации для продукта плазмиды в *E. coli*, геном, придающим устойчивость к антибиотикам, в качестве селективного маркера и/или с подходящим сайтом клонирования, (например, полилинкером). Нуклеиновые кислоты могут также содержать регулируемый индуцируемый промотор (индуцируемый, репрессируемый, онтогенетически регулируемый) в отличие от конститутивного промотора, такого как CMV IE (специалистам в данной области техники будет понятно, что данные термины на самом деле являются показателями уровня экспрессии гена при определенных условиях).

Селективными маркерами являются элементы, хорошо известные в данной области техники. При некоторых обстоятельствах дополнительные селективные маркеры можно применять в дополнение к GPT, где такие маркеры делают клетки видимыми. Можно применять позитивную или негативную селекцию.

В некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий один или более селективных маркерных генов, кодирует зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP), циано-флуоресцентный белок (CFP), усиленный циано-флуоресцентный белок (eCFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) или усиленный желтый флуоресцентный белок (eYFP).

Для целей настоящего изобретения экспрессия гена в эукариотических клетках может строго регулироваться с применением сильного промотора, который регулируется оператором, который, в свою очередь, регулируется регуляторным слитым белком (RFP). RFP состоит в основном из блокирующего транскрипцию домена, и лигандсвязывающего домена, который регулирует их активность. Примеры таких систем экспрессии описаны в US 20090162901 A1, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Количество операторов в прокариотических клетках и бактериофагах было хорошо изучено (Neidhardt, ed. *Escherichia coli and Salmonella; Cellular and Molecular Biology* 2d. Vol. 2 ASM Press, Washington D.C. 1996). Они включают без ограничения операторный участок гена LexA *E. coli*, который связан с пептидом LexA, операторами лактозы и триптофана, которые связывают репрессорные белки, кодируемые генами LacI и trpR *E. coli*. Также они включают бактериофаговые операторы из лямбда-фага P_R и гены ant/mnt фага P22, которые связывают репрессорные белки, кодируемые лямбда-фагом cI и P22 agc. В некоторых вариантах осуществления когда блокирующий транскрипцию домен репрессорного белка является рестриктазой, такой как NotI, оператором является последовательность, распознающая данный фермент. Специалисту в данной области техники будет понятно, что оператор должен расположиться близко к промотору или 3'-концу промотора таким образом, чтобы он мог контролировать транскрипцию посредством промотора. Например, в патенте США № 5972650, который включен в данный документ посредством ссылки, установлено, что последовательности tetO находятся на определенном расстоянии от ТАТА-бокса. В конкретных вариантах осуществления оператор предпочтительно расположен непосредственно перед промотором. В других вариантах осуществления оператор расположен внутри 10 пар оснований промотора.

В определенных вариантах осуществления оператор выбран из группы, включающей tet-оператор (tetO), последовательность, распознающую NotI, оператор LexA, лактозный оператор, триптофановый оператор и оператор Arg (AO). В некоторых вариантах осуществления репрессорный белок выбран из группы, включающей TetR, LexA, LacI, TrpR, Arc, LambdaC1 и GAL4. В других вариантах осуществления блокирующий транскрипцию домен получен из репрессорного белка эукариот, например репрессор-

ный домен, полученный из GAL4.

В иллюстративной системе экспрессии в клетке, клетки сконструированы для экспрессии репрессорного белка в отношении тетрациклина (TetR) и представляющего интерес белка, расположенного под транскрипционным контролем промотора, чья активность регулируется посредством TetR. Два расположенных друг за другом оператора TetR (tetO) расположены непосредственно перед промотором/энхансером CMV-MIE в векторе. Транскрипция гена, кодирующего представляющий интерес белок, управляемая промотором CMV-MIE в таком векторе, может блокироваться посредством TetR при отсутствии тетрациклина или некоторых других подходящих индукторов (например, доксициклина). В присутствии индуктора белок TetR не способен связывать tetO, поэтому происходит транскрипция, а затем трансляция (экспрессия) представляющего интерес белка. (См., например, патент США № 7435553, который включен в настоящий документ посредством ссылки во своей полноте).

Другая иллюстративная система экспрессии в клетке содержит регуляторные слитые белки, такие как слитый белок TetR-ER_{LBD}T2, в котором блокирующий транскрипцию домен слитого белка представляет собой TetR, и лигандсвязывающий домен представляет собой лигандсвязывающий домен рецептора эстрогена (ER_{LBD}) с мутациями T2 (ER_{LBD}T2; Feil et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:752-757). Когда последовательности tetO располагались перед сильным промотором и близко к сильному промотору CMV-MIE, транскрипция представляющей интерес нуклеотидной последовательности блокировалась благодаря промотору CMV-MIE/tetO в присутствии тамоксифена и разблокировалась при удалении тамоксифена. В другом примере применяют слитый белок Arg2-ER_{LBD}T2, слитый белок, включающий одноцепочечный димер, включающий два белка Arg, связанных с помощью линкера из 15 аминокислот, и ER_{LBD}T2 (выше), включающего оператор Arg (AO), а именно два расположенных друг за другом оператора arg непосредственно перед промотором/энхансером CMV-MIE. Клеточные линии могут подвергаться регуляции посредством Arg2-ER_{LBD}T2, где клетки, экспрессирующие представляющий интерес белок, управляются промотором CMV-MIE/ArgO2 и индуцируются при удалении тамоксифена. (См., например, US 20090162901 A1, который включен в настоящий документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению включает гибридный промотор CMV-MIE/TetO или гибридный промотор CMV-MIE/AO2.

В векторах по настоящему изобретению могут также применять инструменты для рекомбинантных технологий Cre-lox для облегчения репликации представляющего интерес гена. Для стратегии Cre-lox требуется по меньшей мере два компонента: 1) рекомбиназа Cre, фермент, который катализирует рекомбинацию между двумя сайтами loxP; и 2) сайты loxV (например, конкретная 34 пара оснований последовательности п.о., включающая сердцевинную последовательность из 8 п.о., где происходит рекомбинация, и два фланкированных инвертированных повтора 13 п.о.) или мутантные сайты lox (см, например, Araki et al. *PNAS* 92:160-4 (1995); Nagy, A. et al. *Genesis* 26:99-109 (2000); Araki et al. *Nuc Acids Res* 30(19):e103 (2002); и US 20100291626 A1, все из которых включены в данный документ посредством ссылки).

В другой рекомбинантной стратегии полученную из дрожжей рекомбиназу FLP можно задействовать с консенсусной последовательностью FRT (см. также, например, Dumeckí, S. *PNAS* 93(12): 6191-6196 (1996)).

В другом аспекте ген (т.е. нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению) вставлен выше или ниже гена GPT в экспрессионной кассете и обязательно функционально связан с промотором, где ген, связанный с промотором, фланкирован первым сайтом узнавания рекомбиназ на 5'-конце и вторым сайтом узнавания рекомбиназ на 3'-конце. Такие сайты узнавания рекомбиназ принадлежат Cre-опосредованной рекомбинации в системе экспрессии в клетке-хозяине. В некоторых случаях второй ген, связанный с промотором, расположен ниже первого гена (3') и фланкирован вторым сайтом узнавания рекомбиназ на 3'-конце. В еще некоторых случаях второй ген, связанный с промотором, фланкирован вторым сайтом узнавания рекомбиназ на 5'-конце и фланкирован третьим сайтом узнавания рекомбиназ на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления сайты узнавания рекомбиназ выбраны из сайта loxP, сайта lox511, сайта lox2272 и сайта FRT. В других вариантах осуществления различаются сайты узнавания рекомбиназ. В дополнительном варианте осуществления клетка-хозяин содержит ген, способный экспрессировать рекомбиназу Cre.

В одном варианте осуществления вектор содержит первый ген, кодирующий легкую цепь антитела или тяжелую цепь антитела по настоящему изобретению, и второй ген, кодирующий легкую цепь антитела или тяжелую цепь антитела по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит ген X-бокссвязывающего белка 1 (mXBP1), способный дополнительно усиливать получение белка/секрецию белка путем осуществления контроля экспрессии генов, включенных в белковую структуру эндоплазматического ретикулума (ER). (См., например, Ron D., and Walter P. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:519-529 (2007)).

Любая клетка подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Клетки, применяемые в настоящем изобретении, включают клетки млекопитающих, а именно клетки животного, отличные от человека, клетки человека или продукты слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квадромы. В определенных вариантах осуществления клет-

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

В еще дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину млекопитающих, а именно трансфектоте, которая вырабатывает иммуноглобулин, а именно антитело или биспецифическую молекулу. Примеры таких клеток-хозяев включают сконструированные клетки млекопитающих, а именно клетки CHO или HEK. Например, в одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, стабильно интегрированную в клеточный геном, который содержит кодирующую последовательность для экспрессии антитела, содержащего рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую неинтегрированную нуклеиновую кислоту (т.е. эписомальную), а именно плазмиду, космиду, фагмиду или линейно экспрессированный элемент, которая содержит кодирующую последовательность для экспрессии антитела, содержащего рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает линию клеток, полученную при стабильной трансфекции клетки-хозяина посредством плазмиды, содержащей вектор экспрессии по настоящему изобретению.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую (а) рекомбинантный полинуклеотид, который кодирует экзогенно добавленный ген GPT млекопитающих, и (b) полинуклеотид, который кодирует мультисубъединичный белок. В некоторых вариантах осуществления экзогенно добавленный ген GPT характеризуется 90% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2, неограничивающие примеры которой предусмотрены в SEQ ID NO: 11-17, и при этом мультисубъединичный белок представляет собой антитело. В других вариантах осуществления клетка также содержит экзогенно добавленный ген GPT и регуляторные элементы. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающих, а именно клетку CHO, применяемую для производства биофармацевтических препаратов.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает линию клеток, полученных из клетки, описанной в предыдущих аспектах. "Полученный из", означает популяцию клеток, полученных клонально из отдельной клетки, и характеризующиеся некоторыми отобранными качествами, такими как способность вырабатывать определенный титр активного белка или способность размножаться до конкретной плотности. В некоторых вариантах осуществления линия клеток, которая получена из клетки, содержащей рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий ген GPT млекопитающих, и полинуклеотид, кодирующий мультисубъединичный белок, способна вырабатывать мультисубъединичный белок в титре по меньшей мере 3 г/л среды, по меньшей мере 5 г/л или по меньшей мере 8 г/л. В некоторых вариантах осуществления линия клеток может достигать интегральной плотности клеток (ICD), которая по меньшей мере на 30% больше, по меньшей мере на 50% больше, по меньшей мере на 60% больше или по меньшей мере на 90% больше, чем интегральная плотность клеток, которая достигается в линии клеток, полученных, в сущности, из той же клетки, но без рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего GPT.

Предусмотрен способ амплификации GOI. В иллюстративных способах применяют увеличение концентраций туникамицина в эукариотической системе экспрессии GPT, таким образом обеспечивая амплификацию копии гена GOI, функционально связанного с экзогенно добавленным геном GPT млекопитающих.

Представляющие интерес белки.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую представляющий интерес белок, можно легко интегрировать в клетку, содержащую маркерный ген, придающий устойчивость к Tn, и IRES, и необязательно фланкировать сайтами узнавания для рекомбиназ. Можно применять любой представляющий интерес белок, подходящий для экспрессии в клетках млекопитающих, однако гликопротеины будут особенно полезными в способах по настоящему изобретению. Например, представляющим интерес белком может быть антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, биспецифическое антитело или его фрагмент, гибридное антитело или его фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-меченый белок (например, Tгаp белок) или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент.

Гликопротеины с аспарагинсвязанными (N-связанными) гликанами распространены во всех эукариотических клетках. Биосинтез таких гликанов и их перенос в полипептиды происходит в эндоплазматическом ретикулуме (ER). В ER и аппарате Гольджи дополнительно модифицируют структуры N-гликанов с помощью некоторого количества гликозидаз и гликозилтрансфераз. Получение белка с применением настоящего изобретения направлено на консистенцию нативной структуры N-гликанов для устранения иммуногенных эпитопов ("гликотопов").

С применением способов по настоящему изобретению серии рекомбинантных белков проявляют подходящие характеристики. Благодаря HPLC (с флуоресцентным выявлением) полученных партий реплицированных белков продемонстрировано, что гликопротеины характеризовались единообразными образцами экспрессии и гликозилирования, как представлено на фиг. 7-8 данного документа. Предусмотрен способ гликозилирования белкового субстрата с N-гликанами, где обеспечивают клетку-хозяина млекопитающего с кодирующей молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей (i) ген млекопитающего, придающий устойчивость к туникамицину (Tn), функционально связанный с геном, кодирующим белковый субстрат, нуждающийся в гликозилировании; при этом клетку культивируют в присутствии первой концентрации Tn; выделяют клеточную популяцию, экспрессирующую по меньшей мере одну копию гена, придающего устойчивость к Tn; клеточную популяцию культивируют в присутствии возрастающих концентраций Tn; и при этом выделяют белковый субстрат с N-гликанами из культуры клеток. Содержимое белкового субстрата с N-гликанами можно оценить на наличие моносахаридов и олигосахаридов с помощью любого способа, известного в данной области техники.

Результаты подробного структурного анализа белков, связанных с гликанами, могут коррелировать с функциональными признаками белка. Такой анализ, характеризующий белковое гликозилирование, как правило, включает несколько стадий: i) ферментное или химическое выделение прикрепленных гликанов; ii) получение выделенных гликанов посредством восстановительного аминирования с использованием ароматических или алифатических аминов, или гиперметилирования; iii) анализ гликанов. Специалисту в данной области техники известно множество вариаций анализа образцов гликозилирования. Гликопротеины могут нести несколько типов гликоформ, занимающих различные сайты в определенных количествах, и, следовательно, их комплексность может затруднять воспроизводство данных способов получения. Согласованность типа и количества гликоформ измерима и представляет собой желаемый результат при получении белка для терапевтического применения.

Клетки-хозяева и трансфекция.

Клетками-хозяевами млекопитающих, применяемыми в способах по настоящему изобретению, являются эукариотические клетки-хозяева, обычные клетки млекопитающих, в том числе, например, клетки CHO и клетки мыши. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует маркерный белок, придающий устойчивость к Tn, полученный из *Cricetulus griseus* (китайского хомячка) (изложенный в SEQ ID NO: 3), или гомолог или его вариант. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит множественные копии гена маркерного гена, устойчивого к Tn. В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует маркерный белок, придающий устойчивость к Tn, полученный от человека (SEQ ID NO: 4), макаки-резус (SEQ ID NO: 5), шимпанзе (SEQ ID NO: 6), собаки (SEQ ID NO: 7), морской свинки (SEQ ID NO: 8), крысы (SEQ ID NO: 9) или мыши (SEQ ID NO: 10).

Настоящее изобретение включает клетку-хозяина млекопитающего, трансфицированную вектором экспрессии по настоящему изобретению. Трансфицированные клетки-хозяева включают клетки, которые были трансфицированы векторами экспрессии, которые содержат кодирующую белок последовательность или представляющий интерес полипептид. Экспрессированные белки, как правило, будут подвергаться селекции в среде культивирования в зависимости от выбранной последовательности нуклеиновой кислоты, но при этом могут оставлять в клетке или депонировать в клеточную мембрану. Для экспрессии рекомбинантных белков можно применять различные системы культуры клеток млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линии клеток почки обезьяны COS-7, описанные Gluzman (1981) Cell. 23:175, и другие линии клеток, способные экспрессировать подходящий вектор, в том числе, например, линии клеток CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478), клетки L, C127, 3T3, CHO, HeLa и линии клеток ВНК. Другие линии клеток, полученные при специфической селекции или в схемах амплификации, также будут пригодны в способах и композициях, предусмотренных в данном документе. В одном варианте осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой линию клеток CHO, обозначенную как K1 (т.е. клетка CHO K1). Для достижения цели по получению высокого объема рекомбинантных белков в определенном случае линию клетки-хозяина нужно предварительно адаптировать к среде биореактора.

Несколько протоколов для трансфекции известно в данной области техники и рассмотрено в Kaufman (1988) Meth. Enzymology 185:537. Выбранный протокол трансфекции будет зависеть от типа клетки-хозяина и природы GOI, и его можно выбрать на основании стандартного эксперимента. Основными требованиями любого такого протокола являются, во первых, введение ДНК, кодирующей представляющий интерес белок в подходящую клетку-хозяина, и затем определение и выделение клеток-хозяев, которые имели включенную гетерологичную ДНК, относительно устойчивым экспрессируемым образом.

Данные реагенты, пригодные для введения гетерологичной ДНК в клетку млекопитающих, включают Lipofectin™ Reagent и Lipofectamine™ Reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.). Оба данных реагента являются коммерчески доступными реагентами, применяемыми для образования комплексов из липида и нуклеиновой кислоты (или липосом), которые облегчают введение нуклеиновой кислоты в клетки, при

использовании для культивирования клеток.

Выбор протокола трансфекции и элементов, выбранных для применения в данном документе, будет зависеть от применяемого типа клетки-хозяина. Специалисты в данной области техники знают много различных протоколов и клеток-хозяев и могут выбрать подходящую систему для экспрессии требуемого белка на основании требований к применяемой системе клеточной культуры. В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, кодирующему полипептид, включая без ограничения антитело, биспецифическое антитело, гибридное антитело, ScFv, антигенсвязывающий белок или слитый белок, содержащий Fc-фрагмент. Такие векторы экспрессии можно применять для получения рекомбинантных полипептидов с применением способов и композиций по настоящему изобретению.

Другие признаки по настоящему изобретению будут становиться очевидными в следующих описаниях иллюстративных вариантов осуществления, которые даны в иллюстративных целях по настоящему изобретению и не предназначены для его ограничения.

Примеры

Следующие примеры изложены с тем, чтобы обеспечить специалистов в данной области техники тем, как осуществлять и применять способы, а также получать и применять композиции, описанные в данном документе, и при этом они не предполагают ограничение объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности по отношению к применяемым числам (например, количеству, температуре и т.п.), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Эффективность селекции трансфектанта, экспрессирующего GPT.

Модифицированные клетки CHO K1 трансфицировали плазмидным вектором, содержащим CHO-GPT (SEQ ID NO: 2), GPT человека (SEQ ID NO: 12) или плазмидным вектором, содержащим гигромицинфосфотрансферазу (Hpt, ген, придающий устойчивость к гигромицину); например, селективный маркерный ген (CHO-GPT или hpt) был транскрипционно связан с расположенным ниже геном eGFP через последовательность IRES в соответствующих векторах. Например, каждую плазмиду конструировали таким образом, чтобы она содержала следующие последовательности генов в направлении от 5'-конца к 3'-концу: сайт Lox, поздний промотор SV40 или CHO-GPT (или Hpt), IRES, усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) и второй сайт Lox. Очищенные рекомбинантные плазмиды трансфицировали вместе с плазмидой, которая экспрессирует рекомбиназу Cre, в модифицированную линию клеток-хозяев CHO, содержащих: от 5'-конца к 3'-концу, сайт lox, YFP и второй сайт lox в транскрипционно активном локусе. Следовательно, клетку-хозяин CHO можно выделить с помощью проточной цитометрии, как клетку, позитивную по зеленому флуоресцентному белку, или клетку, негативную по желтому флуоресцентному белку. Когда рекомбинантную плазмиду, экспрессирующую eGFP (оказывали транскрипционную регуляцию с помощью GPT или генов hpt), трансфицировали вместе с плазмидой, экспрессирующей рекомбиназу Cre, рекомбинация, опосредованная рекомбиназой Cre, приводила к сайт-специфической интеграции кассеты GPT/eGFP в хромосомный локус, содержащий сайты lox, и происходила замена гена YFP (т.е. клетка, позитивная по зеленому флуоресцентному белку). Если eGFP интегрирован случайно, тогда будет проявляться как клетка, позитивная по зеленому флуоресцентному белку, так и клетка, негативная по желтому флуоресцентному белку.

Клеточные популяции инкубировали либо с 0,1 мкг/мл, 2,5 мкг/мл или 5 мкг/мл туникамицина (Tn), либо с 400 мкг гигромицина (Hug), как уже указано в табл. 2. Наблюдаемые рекомбинантные популяции (ORP) измеряли с помощью анализа сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Клетки сортировали для количественного анализа каждой клеточной популяции и эффективность селекции подсчитывали для клеток, экспрессирующих только GFP, а не YFP (фиг. 4 или 5).

Эффективность селекции (процент популяции с выжившими клетками, экспрессирующими GFP) сравнивали между пулами клеток устойчивых либо к Tn, либо к Hug (табл. 2).

Эффективность селекции			
Нрт или GPT	Cre	Средство селекции (мкг/мл Нуг или Tn)	Эффективность селекции % (общая GFP+)
Hpt	+	-	1,35
Hpt	+	+ (400 Нуг)	98,8
choGPT	+	-	0,89
choGPT	+	+ (1Tn)	86,9
choGPT	+	+ (2,5 Tn)	96,1
hGPT	+	-	2,6
hGPT	+	+ (1Tn)	97
hGPT	+	+ (2,5 Tn)	96,7

Обнаружили, что селекция туникамицином так же эффективна, как и селекция гиромоцином. Как CHO-GPT, так и GPT человека были эффективными при селекции компонентов в присутствии 1 мкг/мл или 2,5 мкг/мл туникамицина.

Пример 2. Амплификация продукта гена.

Поэтапную селекцию выполняли посредством внесения возрастающих концентраций туникамицина в систему экспрессии GPT. Клетки CHO K1 трансфицировали плазмидным вектором, содержащим ген CHO-GPT (SEQ ID NO: 2), как указано выше. Плазида содержала в направлении от 5'-конца к 3'-концу первый сайт Lox, поздний промотор SV40, ген CHO-GPT, IRES, eGFP и второй сайт Lox. В сайтах CRE-Lox, направленная интеграция представляющего интерес гена в геном, приводила к стабильно трансфицированному пулу клеток по меньшей мере с одной вставкой GPT на клетку. (Большее число компонентов может приводить к случайной интеграции, как показано выше). Клетки CHO первоначально культивировали в присутствии 1 мкг/мл туникамицина (Tn). Трансфектанты затем подвергали селекции из стабильного пула (названного Cell Pool 2) и впоследствии распространяли в присутствии 1 мкг/мл, 2,5 мкг/мл или 5 мкг/мл Tn. Селекционные циклы проводили для определения клеточных популяций, способных к усиленной экспрессии (множественные копии) eGFP. Количество событий случайной интеграции сильно увеличивалось в присутствии 2,5 мкг/мл или 5 мкг/мл Tn.

Число копий продукта гена либо CHO GPT, eGFP, либо mGapdh (приведенный в норму контроль) измеряли с применением стандартных способов qPCR. Число копий eGFP в клетках из 1 мкг/мл пула клеток, устойчивых к Tn, которые инкубировали дополнительно с 2,5 мкг/мл Tn, было по меньшей мере в 2 раза больше по отношению к числу копий eGFP из 1 мкг/мл пула клеток, устойчивых к Tn, которые инкубировали дополнительно с 1 мкг/мл Tn. Число копий гена дополнительно увеличивалось, когда 1 мкг/мл пула клеток, обработанных Tn, инкубировали дополнительно с 5 мкг/мл Tn. Увеличение копий гена eGFP коррелировало с увеличением копий гена CHO-GPT. (См., фиг. 6А и 6В.)

Для определения каким образом увеличение числа копий гена транслируется в увеличенную экспрессию белка, среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) измеряли с помощью FACS для таких же пулов клеток, экспрессирующих GPT и eGFP, которые обрабатывали множеством циклов селекции Tn, а именно 1, 2,5 или 5 мкг Tn (см., например, образцы 7, 8 и 9 на фиг. 6В). Сравнение экспрессии eGFP для таких пулов клеток представлено в табл. 3.

Пул клеток, экспрессирующих GPT, который подвергали второму циклу селекции посредством 5 мкг Tn, приводил к увеличению производственной выработки более чем в 2,5 раза по сравнению с обработкой посредством 1 мкг Tn и увеличению производственной выработки в 1,5 раза по сравнению с обработкой посредством 2,5 мкг Tn, в соответствии с получением eGFP (табл. 3).

Таблица 3

Получение белка eGFP	
GPT 1 мкг пул + вторая обработка посредством Tn (мкг)	MFI
1 мкг	1098
2,5 мкг	1867
5 мкг	2854

Без ограничения любой теорией, поэтапное увеличение концентрации Tn усиливает селективное давление на клетки управляемым способом, тем самым увеличивая производственную выработку.

Также использовали Tn-устойчивые векторы экспрессии в дополнительных экспериментах, описанных ниже, чтобы протестировать влияния селекции Tn на образцах гликозилирования.

Пример 3. Профиль экспрессии и гликозилирования иллюстративного димерного белка.

Клетки CHO, экспрессирующие "Трап" белок (содержащий Fc-фрагмент слитый белок 1, в дальнейшем указанный как FcFP1), трансфицировали GPT-содержащим вектором экспрессии. Плазмида содержала в направлении от 5'-конца к 3'-концу сайт Lox, поздний промотор SV40, ген, придающий устойчивость к Tn(CHO-GPT), IRES eGFP, polyA SV40 и второй сайт Lox. Применяли 1 мкг/мл Tn или 5 мкг/мл Tn для селекции селективного маркера GPT. Количество клеток из пулов, которые подвергали селекции, увеличивали в суспензионных культурах в бессывороточной среде. Подтверждали GPT трансфекцию посредством экспрессии eGFP с помощью анализа FACS. Гранулы, собранные из селективного пула, посылали на анализ числа копий для экспрессии GPT, и на 12 день анализа продуктивности помещали для определения уровня экспрессии FcFP1 в пулах, подверженных селекции с различными концентрациями туникамицина.

Подвергали селекции FcFP1 для их сложного образца гликозилирования, имеющего большое количество сайтов гликозилирования. Для определения профилей гликозилирования в культуре клеток распространяли клетки, экспрессирующие белок FcF1, в рамках общепринятого протокола (без Tn) или в условиях обработки посредством Tn, как представлено в табл. 4, а затем белок изолировали и очищали.

Таблица 4

Получение белка FcFP1

Белок	Серия №	Обработка
FcFP1 Трап	110728	Отсутствует
FcFP1 Трап	110728-1	1 мкг/мл Tn
FcFP1 Трап	110728-2	5 мкг/мл Tn

Проводили подробный анализ гликанов с применением хроматографии на основании хорошо известных способов для HPLC и меток флуоресцентной антралиновой кислотой (AA) (Anumula, and Dhume, *Glycobiology*, 8(7):685-694, 1998), для каждой серии гликопротеинов определяли имеет ли Tn отрицательное воздействие на профили гликозилирования. Также сравнивали серии продукции с эталоном, который представляет собой партию белка для терапевтического применения. Репрезентативный анализ гликанов показан на фиг. 7A-7D. Каждая серия по сравнению с указанной серией стабильно вырабатывает такое же число пиков соответствующей формы и соответствующей интенсивности. Совпадение каждой хроматограммы (фиг. 8) указывает, что не обнаруживают уникальные или необычные пики.

Анализ профиля олигосахаридов выполняли с помощью хорошо известных способов HPLC на основании эталонной серии белка FcFP1. Уровни сиалирования измеряли для серий белка FcFP1, а Z-число подсчитывали для каждой серии (3 репликаций). Z-число представляет собой показатель вариации между сериями. Равенство Z-числа берут с учетом относительного числа пиков, а также соответствующей формы и интенсивности каждого пика. Например, площадь каждого пика OSA, ISA, 2SA, 3SA и 4SA на фиг. 7A-7D количественно оценивали, как в табл. 5.

Таблица 5

Количественный анализ олигосахаридов

Белок Серия	Повторность	OSA	ISA	2SA	3SA	4SA	ПРОФИЛЬ OS (Z-число)
Ссылка B100002M410	1	6506,43	13388,34	11268,60	5176,21	1728,15	1,53
	2	5869,80	11932,32	10159,21	4196,10	1550,09	1,51
	3	6870,18	14536,84	12090,21	5200,58	1707,74	1,51
	Ср.	6415,47	13285,83	11172,65	4857,63	1661,99	1,52±0,01
FcFP1 Трап 110728	1	6159,09	9394,92	7368,03	3074,66	675,48	1,34
	2	7530,49	12117,03	9589,08	2951,63	810,09	1,36
	3	5508,95	8580,56	6902,59	3794,81	630,79	1,34
	Ср.	6399,51	10030,84	7953,23	3074,66	705,45	1,35±0,01
FcFP1 trap 110728-1	1	5330,22	8149,81	6539,33	2490,06	641,37	1,35
	2	5034,39	9009,42	7059,61	2698,05	812,21	1,40
	3	6222,44	10235,08	8428,04	3276,75	848,83	1,39
	Ср.	5529,02	9131,44	7342,33	2821,62	767,47	1,38±0,03
FcFP1 trap 110728-2	1	6300,77	10001,93	8109,12	3000,96	790,99	1,36
	2	5999,09	9952,47	7968,58	2885,50	717,70	1,36
	3	4322,29	6176,33	5187,48	1742,26	458,52	1,32
	Ср.	5540,72	8710,24	7088,39	2542,91	655,74	1,35±0,02

OS = олигосахарид; OSA = ноль остатков сиаловой кислоты; ISA = один остаток сиаловой кислоты; 2SA = два остатка сиаловой кислоты; 3SA = три остатка сиаловой кислоты; 4SA = четыре остатка сиаловой кислоты.

$$Z\text{-число} = \frac{(\text{площадь}1SA + 2*\text{площадь}2SA + 3*\text{площадь}3SA + 4*\text{площадь}4SA)}{(\text{площадь}0SA + \text{площадь}1SA + \text{площадь}2SA + \text{площадь}3SA + \text{площадь}4SA)}$$

Z-число подсчитывали для каждой серии в допустимом диапазоне по сравнению с указанной серией, следовательно, каждую серию белка подразумевают для получения такого же материала, как молекула для терапевтического применения. Из-за присутствия Tn, известного своим негативным влиянием на гликозилирование N-связанных гликопротеинов, было неожиданно, что получение белка было надежным и стабильным, а также продуктивным, учитывая условия повышенного давления отбора с использованием Tn.

Настоящее изобретение можно воплотить в других конкретных вариантах осуществления без отклонения от истинного смысла или его сущности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная клетка млекопитающего для получения представляющего интерес рекомбинантного белка (POI), содержащая ген млекопитающего, придающий устойчивость к туникамицину (Tn), кодирующий белок, который характеризуется по меньшей мере 93% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, функционально связанный с представляющим интерес первым геном (GOI), кодирующим первый POI, и по меньшей мере одним регуляторным элементом.

2. Выделенная клетка по п.1, где ген, придающий устойчивость к Tn, экзогенно добавлен в клетку.

3. Выделенная клетка по п.1 или 2, где ген, придающий устойчивость к Tn, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17.

4. Выделенная клетка по п.1, где по меньшей мере один регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из промотора, сайта связывания рибосомы и энхансера.

5. Выделенная клетка по п.1, дополнительно содержащая второй GOI, кодирующий второй POI.

6. Выделенная клетка по п.1 или 5, где первый GOI выбран из группы, состоящей из гена, кодирующего легкую цепь антитела или ее антиген-специфический фрагмент, тяжелую цепь антитела или ее антиген-специфический фрагмент, слитый белок, содержащий Fc-фрагмент, или его фрагмента и рецептора или его лиганд-специфического фрагмента.

7. Выделенная клетка по п.5, где второй GOI выбран из группы, состоящей из гена, кодирующего легкую цепь антитела или ее антиген-специфический фрагмент, тяжелую цепь антитела или ее антиген-специфический фрагмент, слитый белок, содержащий Fc-фрагмент, или его фрагмента и рецептора или его лиганд-специфического фрагмента.

8. Выделенная клетка по п.5, дополнительно содержащая сайт распознавания для рекомбиназы между первым GOI и вторым GOI.

9. Выделенная клетка по п.5, дополнительно содержащая сайт распознавания для рекомбиназы, расположенный в направлении 5' от первого GOI, и сайт распознавания для рекомбиназы в направлении 3' от второго GOI.

10. Выделенная клетка по п.1, где клетка выбрана из группы, состоящей из CHO-K1, COS-7, HEK293, опухолевой клетки, лимфоцита, клетки сетчатки и стволовой клетки.

11. Способ получения представляющего интерес рекомбинантного белка (POI), где способ включает:

- a) обеспечение клетки млекопитающего по п.1;
- b) культивирование клетки в присутствии первой концентрации Tn;
- c) выделение клеточной популяции, экспрессирующей по меньшей мере одну копию гена, придающего устойчивость к Tn;
- d) культивирование клеточной популяции в присутствии второй концентрации Tn, где вторая концентрация Tn превышает первую концентрацию Tn; и
- e) выделение первого POI из культуры клеток.

12. Способ по п.11, где ген млекопитающего, придающий устойчивость к Tn, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2.

13. Способ по п.11, где ген млекопитающего, придающий устойчивость к Tn, содержит ген китайского хомячка (*Cricetulus griseus*), придающий устойчивость к Tn.

14. Способ по п.12, где ген млекопитающего, придающий устойчивость к Tn, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17.

15. Способ по п.11, где по меньшей мере один регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из промотора, сайта связывания рибосомы и энхансера.

16. Способ по п.11, где клетка дополнительно содержит второй ген, кодирующий второй POI.

17. Способ по п.11, где первый POI выбран из группы, состоящей из легкой цепи антитела или ее антиген-специфического фрагмента, тяжелой цепи антитела или ее антиген-специфического фрагмента,

слитого белка, содержащего Fc-фрагмент, или его фрагмента и рецептора или его лиганд-специфического фрагмента.

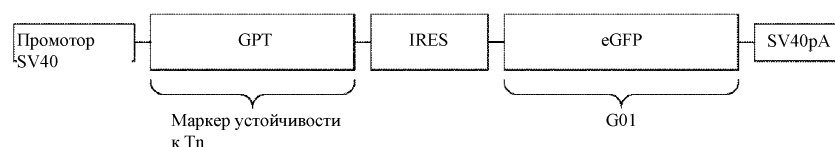
18. Способ по п.16, где второй ROI выбран из группы, состоящей из легкой цепи антитела или ее антиген-специфического фрагмента, тяжелой цепи антитела или ее антиген-специфического фрагмента, слитого белка, содержащего Fc-фрагмент, или его фрагмента и рецептора или его лиганд-специфического фрагмента.

19. Способ по п.11, где первая концентрация Tn составляет 1 мкг/мл.

20. Способ по п.11, дополнительно включающий после стадии d) и до стадии e) культивирование клеточной популяции в присутствии третьей концентрации Tn, где третья концентрация Tn превышает вторую концентрацию Tn.

21. Способ по п.20, где вторая концентрация Tn составляет 2,5 мкг/мл, и третья концентрация составляет 5 мкг/мл.

22. Способ по п.12, где первый ROI, выделенный из культуры клеток, содержит N-гликан.



Фиг. 1

```

**** *:*  ***.*.  *****.*****.*****.*****.*****.*****
1 MWAFAELP--MPLLINLIVSLLGFVATVTLIPAFRQHFI AARLCGQDLNKTSRQQIPESQ      58 GPT_HUMAN
1 MWAFAELP--MPLLINLIVSLLGFVATVTLIPAFRQHFI AARLCGQDLNKTSRQQIPESQ      58 GPT_MACMU
1 MWAFAELP--MPLLINLIVSLLGFVATVTLIPAFRQHFI AARLCGQDLNKTSRQQIPESQ      58 GPT_PANTR
1 MWAFAELP--MPLLINLVGSLGDFVATVTLIPAFRQHFI AAHLCGQDLNKTRQQIPESQ      58 GPT_CANFA
1 MWAFAEVP--IPLLINLVGSLGDFVATVTLIPAFRQHFI AARLCGQDLNKTRQQIPESQ      58 GPT_CAVPO
1 MWAFAELPPLPLPLLINLVGSLGDFVATVTLIPAFRSHFI AARLCGQDLNKLSRQQIPESQ      60 GPT_RAT
1 MWAFAELPPLPLPLLINLVGSLGDFVATVTLIPAFRSHFI AARLCGQDLNKLSRQQIPESQ      60 GPT_MOUSE
1 MWAFAELPPLPLPLLINLVGSLGDFVATVTLIPAFRSHFI AARLCGQDLNKLSRQQIPESQ      58 GPT_CRIGR

***.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
59 GVISGAVFLIILFCFIPFPFLNCFVKEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVL      118 GPT_HUMAN
59 GVISGAVFLIILFCFIPFPFLNCFVKEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVL      118 GPT_MACMU
59 GVISGAVFLIILFCFIPFPFLNCFVKEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVL      118 GPT_PANTR
59 GVISGAVFLIILFCFIPFPFLNCFVKEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVL      118 GPT_CANFA
59 GVISGAVFLIILFCFIPFPFLNCFVKEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVL      118 GPT_CAVPO
61 GVISGAVFLIILFCFIPFPFLNCFVEEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVL      120 GPT_RAT
61 GVISGAVFLIILFCFIPFPFLNCFVEEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVL      120 GPT_MOUSE
59 GVISGAVFLIILFCFIPFPFLNCFVEEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVL      118 GPT_CRIGR

*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
119 NLRWRHKLLLPAAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFRLILGLHLDLGLIYYVVMGLLAV      178 GPT_HUMAN
119 NLRWRHKLLLPAAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFRLILGLHLDLGLIYYVVMGLLAV      178 GPT_MACMU
119 NLRWRHKLLLPAAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFRLILGLHLDLGLIYYVVMGLLAV      178 GPT_PANTR
119 NLRWRHKLLLPAAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFRLILGLHLDLGLIYYVVMGLLAV      178 GPT_CANFA
119 NLRWRHKLLLPAAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFRLVILGLHLDLGLIYYVVMGLLAV      178 GPT_CAVPO
121 NLRWRHKLLLPAAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFRLVILGLHLDLGLIYYVVMGLLAV      180 GPT_RAT
121 NLRWRHKLLLPAAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFRLVILGLHLDLGLIYYVVMGLLAV      180 GPT_MOUSE
119 NLRWRHKLLLPAAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFRLVILGLHLDLGLIYYVVMGLLAV      178 GPT_CRIGR

```

Фиг. 2А

```

*****.*****.*****.*****.*****
179 FCTNAINTLAGINGLEAGQSLVISASTIVFNLVELEGDCRDDHVFSLYFMIPFFFTTLGL 238 GPT_HUMAN
179 FCTNAINTLAGINGLEAGQSLVISASTIVFNLVELEGDCRDDHVFSLYFMIPFFFTTLGL 238 GPT_MACMU
179 FCTNAINTLAGINGLEAGQSLVISASTIVFNLVELEGDCRDDHVFSLYFMIPFFFTTLGL 238 GPT_PANTR
179 FCTNAINTLAGINGLEAGQSLVISASTIVFNLVELEGDYRDDHVFSLYFMIPFFFTTLGL 238 GPT_CANFA
179 FCTNAINTLAGINGLEAGQSLVISASTIVFNLVELEGDYRDDHVFSLYFMIPFFFTTLGL 238 GPT_CAVPO
181 FCTNAINTLAGINGLEAGQSLVISASTIVFNLVELEGDYRDDHVFSLYFMIPFFFTTLGL 240 GPT_RAT
181 FCTNAINTLAGINGLEAGQSLVISASTIVFNLVELEGDYRDDHIFSLYFMIPFFFTTLGL 240 GPT_MOUSE
179 FCTNAINTLAGINGLEAGQSLVISASTIVFNLVELEGDYRDDHVFSLYFMIPFFFTTLGL 238 GPT_CRIGR

*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
239 LYHNWYPSRVFVGDTCYFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPOVFNFLYSLPOLLHIIP 298 GPT_HUMAN
239 LYHNWYPSRVFVGDTCYFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPOVFNFLYSLPOLLHIIP 298 GPT_MACMU
239 LYHNWYPSRVFVGDTCYFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPOVFNFLYSLPOLLHIIP 298 GPT_PANTR
239 LYHNWYPSQVFVGDTCYFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPOVFNFLYSLPOLLHIIP 298 GPT_CANFA
239 LYHNWYPSQVFVGDTCYFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPOVFNFLYSLPOLLHIIP 298 GPT_CAVPO
241 LYHNWYPSRVFVGDTCYFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPOVFNFLYSLPOLFQIIP 300 GPT_RAT
241 LYHNWYPSRVFVGDTCYFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPOVFNFLYSLPOLFHTIP 300 GPT_MOUSE
239 LYHNWYPSQVFVGDTCYFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFIPOVFNFLYSLPOLLHAIP 298 GPT_CRIGR

*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
299 CPRHRIPRLNKTGKLEMSYSKFKTKLSLFLGTFILKVAESLQLVTVHQSETEDEGEFTFC 358 GPT_HUMAN
299 CPRHRIPRLNKTGKLEMSYSKFKTKLSLFLGTFILKVAESLRLVTTHQSDTEDEGEFTFC 358 GPT_MACMU
299 CPRHRIPRLNKTGKLEMSYSKFKTKLSLFLGTFILKVAESLQLVTVHQSETEDEGEFTFC 358 GPT_PANTR
299 CPRHRIPRLNKTGKLEMSYSKFKTKLSLFLGNFLLKVAESLQLVTVHQSENEDEGAFTFC 358 GPT_CANFA
299 CPRHRIPRLNKTGKLEMSYSKFKTKNSLFLGTFILKVAERLQLVTVHRSEGEDEGAFTFC 358 GPT_CAVPO
301 CPRHRMPRLNKTGKLEMSYSKFKTKLSLFLGTFILKVAESLRLVTVHRGESEDEGAFTFC 360 GPT_RAT
301 CPRHRMPRLNAKTGKLEMSYSKFKTKNLSLFLGTFILKVAENLRLVTVHRGESEDEGAFTFC 360 GPT_MOUSE
299 CPRHRIPRLNPKTGKLEMSYSKFKTKNLSLFLGTFILKVAERLQLVTVHRGESEDEGAFTFC 358 GPT_CRIGR

```

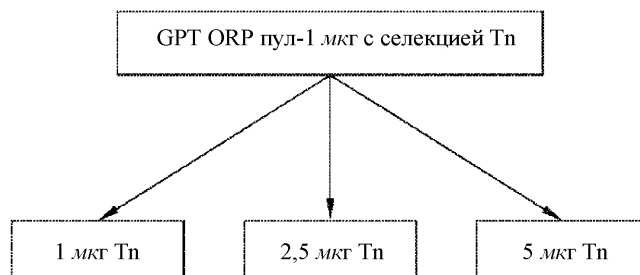
Фиг. 2B

```

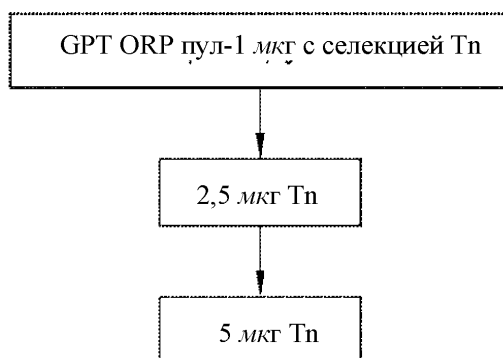
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
359 NNMTLINLLKLVLPPIHERNLTLLLLLLOILGSAITFSIRYQLVRLFYDV 408 GPT_HUMAN
359 NNMTLINLLKIFGPIHERNLTLLLLLLOITLGSATFSIRYQLVRLFYDV 408 GPT_MACMU
359 NNMTLINLLKILGPIHERNLTLLLLLLOILGSAITFSIRYQLVRLFYDV 408 GPT_PANTR
359 NNMTLINLLKLVLPMPHERNLTLLLLLLOILGSAITFSIRYQLVRLFYDV 408 GPT_CANFA
359 NNMTLINLLKIFGPIHERNLTLLLLLLOIVGSAITFSIRYQLVRLFYDV 408 GPT_CAVPO
361 NNMTLINLLKLVFGPIHERNLTLLFLLLOVLSSAVTFSIRYQLVRLFYDV 410 GPT_RAT
361 NNMTLINLLKLVFGPIHERNLTLLLLLLOVLSSAATFSIRYQLVRLFYDV 410 GPT_MOUSE
359 NNMTLINLLKIFGPIHERNLTLLLLLLOILSSAVTFSIRYQLVRLFYDV 408 GPT_CRIGR

```

Фиг. 2C

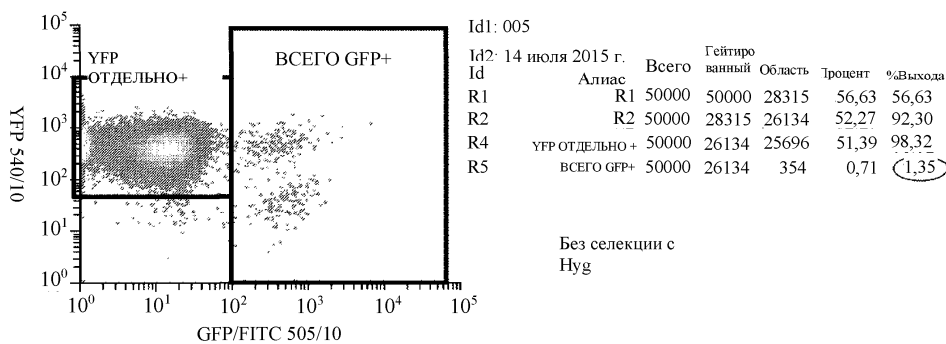


Фиг. 3A



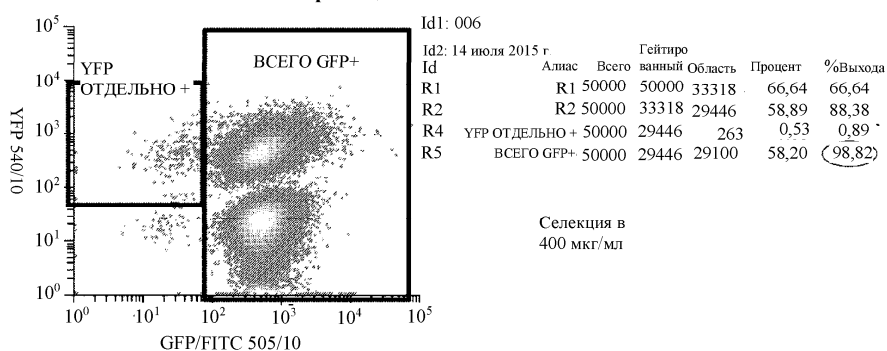
Фиг. 3B

Эффективность селекции гигромицином



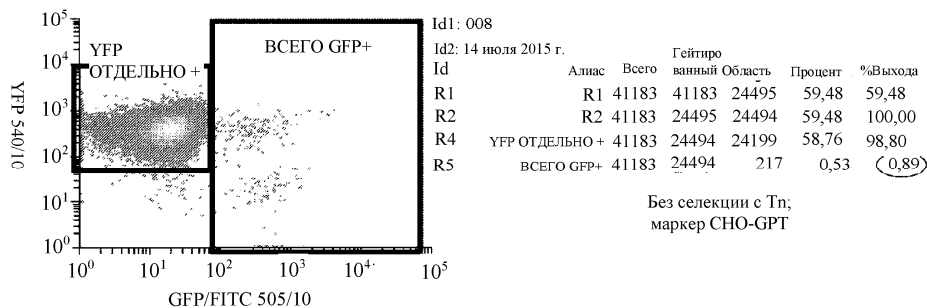
Фиг. 4А

Эффективность селекции гигромицином



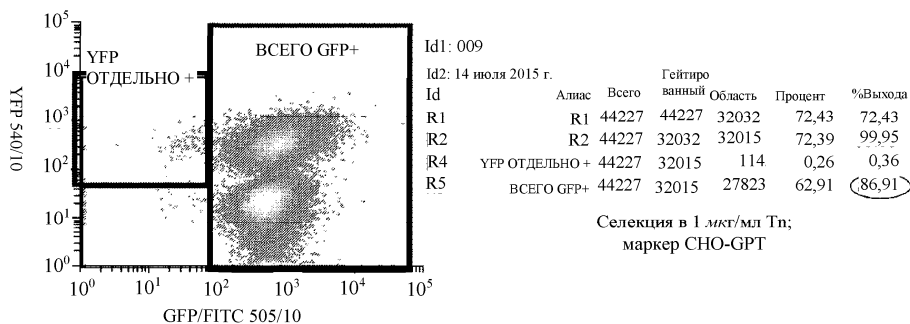
Фиг. 4В

Эффективность селекции с Tn и GPT в качестве селективного маркера



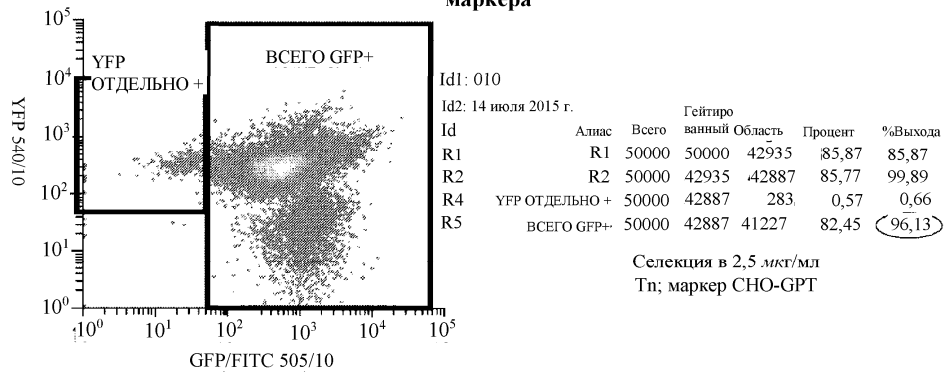
Фиг. 5А

Эффективность селекции с Tn и GPT в качестве селективного маркера



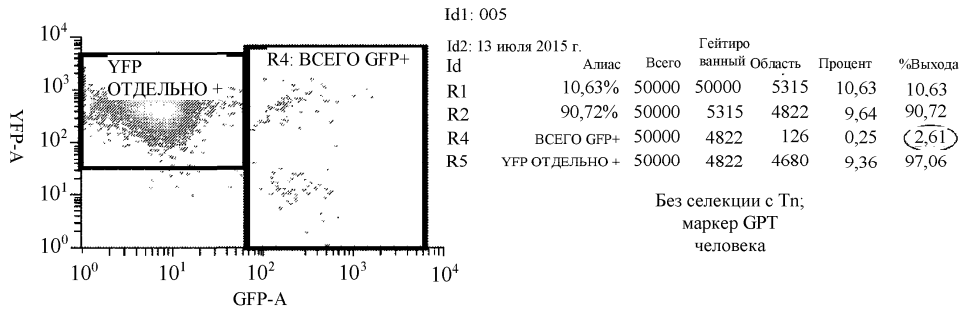
Фиг. 5В

Эффективность селекции с Тп и
GPT в качестве селективного
маркера



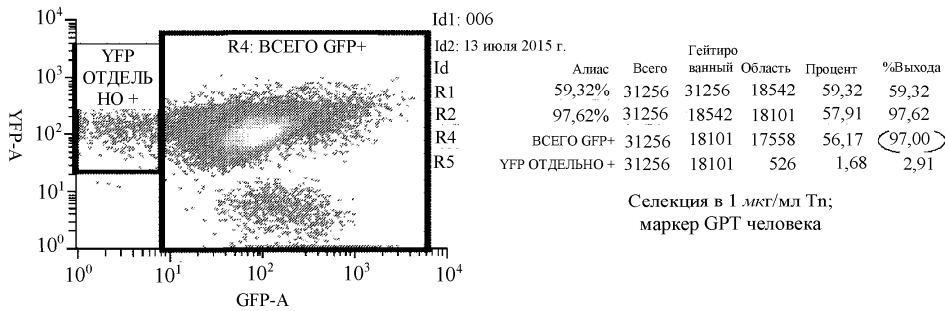
Фиг. 5С

Эффективность селекции с Тп и
GPT в качестве селективного
маркера



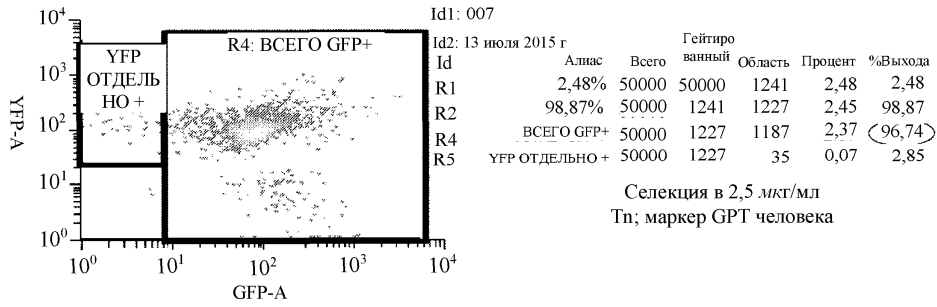
Фиг. 5D

Эффективность селекции с Тп и
GPT в качестве селективного
маркера

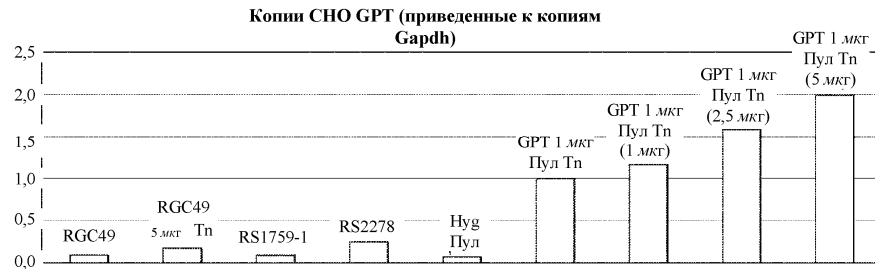


Фиг. 5E

Эффективность селекции с Tn и GPT в качестве селективного маркера



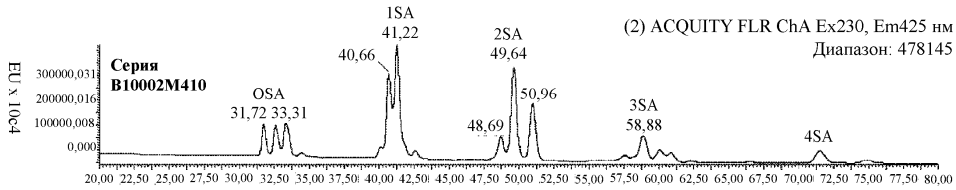
Фиг. 5F



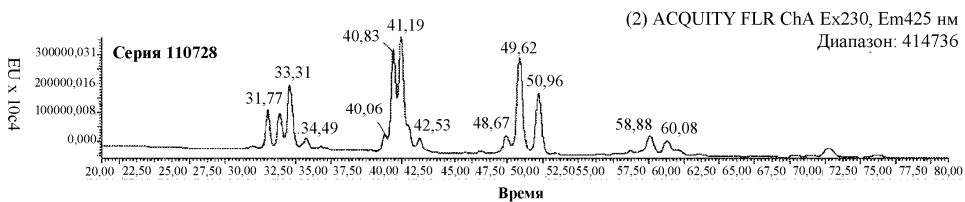
Фиг. 6A



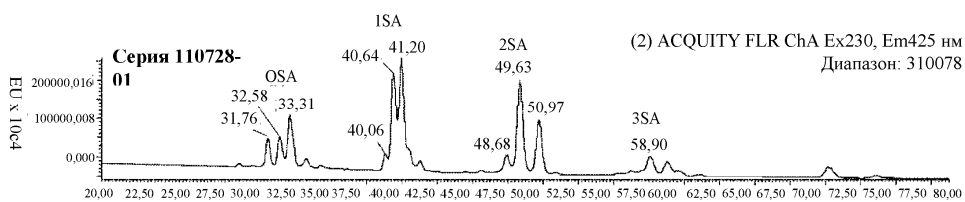
Фиг. 6B



Фиг. 7A

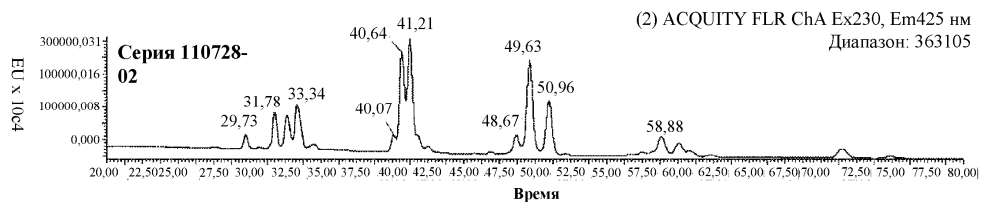


Фиг. 7B

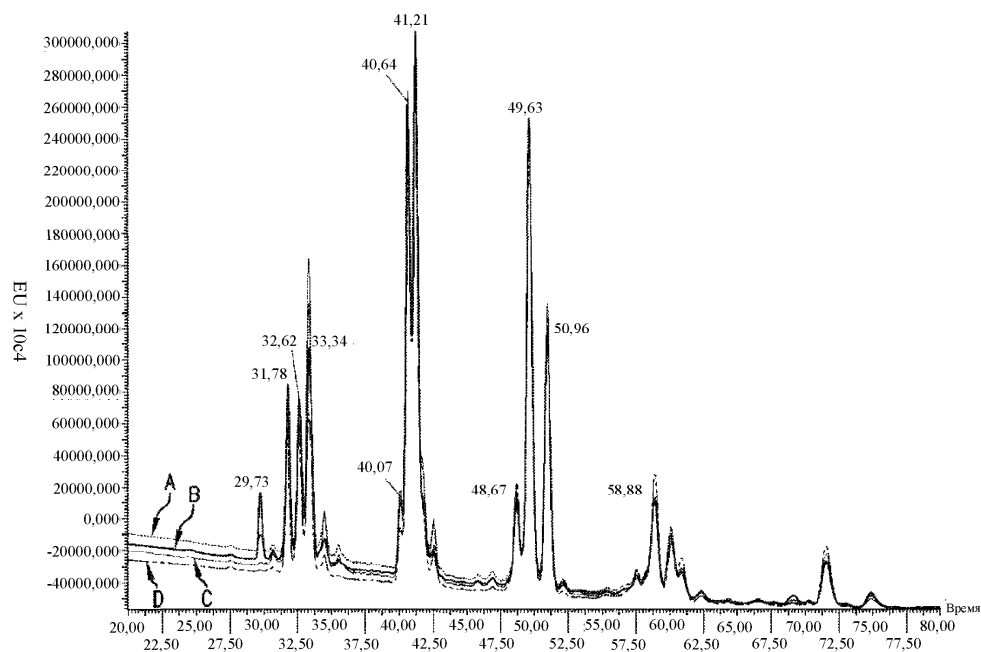


Фиг. 7C

035340



Фиг. 7D



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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