(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090230 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.29

(22) Дата подачи заявки
2018.07.03

(51) Int. Cl. ***C07K 14/415*** (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)

(54) ПРОЦЕСС КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛИКОПРОТЕИНА

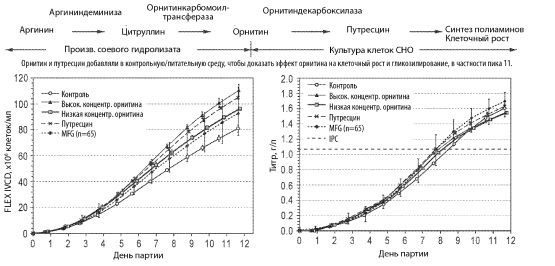
(31) **62/529,471; 62/625,744**
(32) **2017.07.06; 2018.02.02**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/040734**
(87) **WO 2019/010191 2019.01.10**

(71) Заявитель:
РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Чэнь Джон, Лоуренс Шон, Джонсон Эми, Лони Теодор, Пангул Равиндра, Ханг Та-Чун, Карвер Скотт, Шиллинг Бернхард (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Данная заявка предлагает способ для скрининга партий соевого гидролизата на желаемое количество его компонента, такого как орнитин или путресцин, и отбора только тех партий соевого гидролизата, которые содержат желаемое количество такого компонента. Данное изобретение также предоставляет способы культивирования клеток в среде, дополненной выбранными партиями сои для получения более стабильных, высококачественных партий белка, представляющего интерес. Дополнительно, согласно данному изобретению предложено множество партий белкового продукта, каждая из которых была произведена путем культивирования клеток в среде, дополненной отдельными партиями соевого гидролизата, содержащими желаемое количество орнитина или путресцина, в результате чего каждая партия получаемого белка демонстрирует улучшенное качество белка, представляющего интерес, или количество получаемого белка хорошего качества.



202090230 A1

202090230 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560719EA/085

ПРОЦЕСС КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛИКОПРОТЕИНА

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Содержимое текста, поданного под названием «REGE009P02US_SeqList.txt», который был создан 1 февраля 2018 года и имеет размер 11,2 КБ, включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Изобретение относится к способам культивирования клеток и получения рекомбинантных белков. Изобретение, в частности, относится к способам культивирования клеток в среде, содержащей гидролизат сои, для достижения стабильного производства высококачественного рекомбинантного белка.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Среды для клеточного культивирования, содержащие белковые гидролизаты, например, соевый гидролизат, обычно применяют в производстве рекомбинантных белков из культивируемых клеток. Тем не менее, белковые гидролизаты могут содержать соединения, которые отрицательно воздействуют на рост клеток или продуцирование рекомбинантного белка. Несмотря на эти недостатки, белковые гидролизаты широко используются в качестве добавки для культивирования клеток.

[0004] Человеческие биологические терапевтические средства (биофармацевтические), как правило, получают в культуре клеток млекопитающих. Тем не менее, качество и эффективность биологических терапевтических средств в значительной степени зависит от производственного процесса. Tebbey P. and Declerck, P. Generics and Biosimilars Initiative Journal (2016) 5:2, pp. 70-73 включен в данный документ для ознакомления с производством биологических лекарственных веществ с стабильным гликозилированием. Изменения, вносимые в процесс культивирования клеток для производства гликопротеинов, могут привести к изменению шаблона гликозилирования, присутствию кислотных соединений (например, сиаловой кислоты), или изменению количества гликанов на белке. Id. Такое изменение увеличивает неоднородность белковых изоформ в результате производства белка, что может изменять стабильность, эффективность или иммуногенность биологического терапевтического вещества, и в конечном итоге приводить к отбраковке большого количества белков.

[0005] Таким образом, весьма желательными являются способы культивирования клеток, устраняющие изменчивость выхода лекарственного продукта и композиции от партии к партии. Данное изобретение идентифицирует некоторые компоненты в растительном белковом гидролизате (например, соевом гидролизате), которые могут различаться от партии к партии и изменять состав композиции и выход высококачественных гликопротеинов, получаемых в культуре с использованием соевого гидролизата. Данное изобретение решает задачу улучшения способов культивирования

клеток посредством, среди прочего, скрининга партий растительного белкового гидролизата и отбора тех партий, которые содержат желаемую концентрацию компонента растительного белкового гидролизата, для применения в производстве биопрепаратов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Данное изобретение основывается отчасти на обнаружении того факта, что концентрация орнитина или путресцина в партии соевого гидролизата влияет на качество и состав белков, продуцируемых в клеточной культуре с использованием соевого гидролизата. Согласно данному изобретению также предложено то, что клетки, культивируемые в средах, содержащих соевый гидролизат, содержащий определенные концентрации орнитина или путресцина, производят большие количества высококачественных белков, демонстрирующих более стабильные шаблоны гликозилирования, количества гликанов и профили сиаловой кислоты, от партии к партии.

[0007] В одном аспекте, данное изобретение относится к способу культивирования популяции клеток, экспрессирующих рекомбинантный гетерологичный гликопротеин, в клеточной культуральной среде, содержащей соевый гидролизат, для получения рекомбинантного гетерологичного гликопротеина, и при этом соевый гидролизат содержит ≤ 0,067% (мас./мас.) орнитина или путресцина.

[0008] В некоторых вариантах осуществления, способ включает в себя этапы культивирования популяции клеток, экспрессирующих рекомбинантный гетерологичный гликопротеин, в клеточной культуральной среде, содержащей соевый гидролизат, содержащий ≤ меньше чем 0,67 миллиграмма (мг) орнитина на грамм (г) сои (мас./мас.), или около 0,003% - 0,067% (мас./мас.) орнитина. В одном варианте осуществления, культуральная среда содержит ≤ 5 мг/л орнитина, или около 0,6-3 мг/л орнитина. В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток получают путем клональной экспансии клеток, экспрессирующих рекомбинантный гетерологичный гликопротеин.

[0009] В одном аспекте, данное изобретение относится к способу получения гликопротеина. В одном варианте осуществления, способ включает в себя этапы культивирования популяции клеток, экспрессирующих рекомбинантный гетерологичный гликопротеин, в клеточной культуральной среде, содержащей соевый гидролизат, содержащий ≤ меньше чем 0,67 миллиграмма (мг) путресцина на грамм (г) сои (мас./мас.), или около 0,003% - 0,067% (мас./мас.) путресцина. В одном варианте осуществления, культуральная среда содержит ≤ 5 мг/л путресцина, или около 0,6-3 мг/л путресцина. В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток получают путем клональной экспансии клеток, экспрессирующих рекомбинантный гетерологичный гликопротеин.

[00010] В одном варианте осуществления, гликопротеин представляет собой молекулу-ловушку, например, рилонацепт (ловушка ИЛ1, раскрыто, например, в патенте США № 6927004), афлиберцепт (ловушка VEGF, раскрыто, например, в патенте США № 7087411), конберцепт (ловушка VEGF, раскрыто, например, в патентах США № 7750138 и № 8216575), и этанерцепт (ловушка ФНО, раскрыто, например, в патенте США № 5610279.) В одном варианте осуществления, ≥ 10% (мас./мас.) от общего количества всех

видов N-гликанов гликопротеина представляет собой N-гликан A1.

[00011] В одном аспекте, данное изобретение относится к способу получения гликопротеина. В другом аспекте, данное изобретение относится к способу применения соевого гидролизата в производстве гликопротеина. В другом аспекте, данное изобретение относится к способу выбора соевого гидролизата для применения в производстве гликопротеина путем оценки качества производимого гликопротеина. В одном варианте осуществления, способ включает в себя культивирование клетки, экспрессирующей гликозилированный белок, в среде для культивирования клеток для получения гликопротеина, очистку гликозилированного белка, анализ очищенного гликозилированного белка на характерные олигосахариды, определение относительного количества N-гликана A1 по отношению к общему количеству видов N-гликана гликопротеина; и выбор соевого гидролизата, который обеспечивает по меньшей мере 10% (мас./мас.) N-гликана A1 по отношению к общему количеству видов N-гликана гликопротеина.

[00012] В одном варианте осуществления, способ включает в себя этапы приготовления среды для культивирования клеток, содержащей соевый гидролизат, культивирование клетки, экспрессирующей гликопротеин, в среде для культивирования клеток, очистку гликозилированного белка, анализ очищенного гликозилированного белка на характерные олигосахариды, определение относительного количества N-гликана A1 по отношению к общему количеству видов N-гликана гликопротеина, и выбор соевого гидролизата, который обеспечивает продуцирование гликопротеина с по меньшей мере 10% (мас./мас.) N-гликана A1 по отношению к общему количеству видов N-гликана гликопротеина.

[00013] В одном варианте осуществления, выбранный соевый гидролизат содержит $\leq$ 0,67 мг орнитина на г сои (мас./мас.), или около 0,003% - 0,067% (мас./мас.) орнитина. В одном варианте осуществления, культуральная среда содержит $\leq$ 5 мг/л орнитина, или около 0,6-3 мг/л орнитина.

[00014] В одном варианте осуществления, выбранный соевый гидролизат содержит $\leq$ 0,67 мг путресцина на г сои (мас./мас.), или около 0,003% - 0,067% (мас./мас.) путресцина. В одном варианте осуществления, культуральная среда содержит $\leq$ 5 мг/л путресцина, или около 0,6-3 мг/л путресцина.

[00015] В одном аспекте, данное изобретение относится к способу выбора соевого гидролизата, для применения в производстве гликопротеина, путем измерения количества орнитина или путресцина в соевом гидролизате. В одном варианте осуществления, способ включает в себя этапы измерения количества орнитина в соевом гидролизате, выбор соевого гидролизата с $\leq$ 0,67 мг орнитина на г сои, или около 0,003% - 0,067% (мас./мас.) орнитина, и смешивание выбранного соевого гидролизата с дополнительным ингредиентом для формирования среды для культивирования клеток с $\leq$ 5 мг/л орнитина, или около 0,6-3 мг/л орнитина. В одном варианте осуществления, способ включает в себя этапы измерения количества путресцина в соевом гидролизате, выбор соевого гидролизата

с ≤ 0,67 мг путресцина на г сои, или около 0,003% - 0,067% (мас./мас.) путресцина, и смешивание выбранного соевого гидролизата с дополнительным ингредиентом для формирования среды для культивирования клеток с ≤ 5 мг/л путресцина, или около 0,6-3 мг/л путресцина.

[00016] В одном аспекте, данное изобретение относится к гликопротеину, содержащему N-гликан A1, и предложен по меньшей мере один другой вид N-гликана, в котором относительное количество N-гликана A1 составляет по меньшей мере 10% (мас./мас.) от общего количества N-гликанов гликопротеина. В одном варианте осуществления, относительное количество N-гликана A1 составляет около 10% - 17% (мас./мас.).

[00017] В одном варианте осуществление, гликопротеин также имеет N-гликан A2, N-гликан A2F, N-гликан A1F, N-гликан NGA2F, N-гликан NA2G1F, N-гликан NA2, и N-гликан NA2F.

[00018] В одном варианте осуществления, гликопротеин содержит 8-65 молей сиаловой кислоты на моль гликопротеина. В одном варианте осуществления, в котором гликопротеин представляет собой рилонацепт, любой из остатков аспарагина N37, N98, N418, N511 SEQ ID NO: 1 содержит N-гликан A1. В одном варианте осуществления, в котором гликопротеин представляет собой афлиберцепт, любой из остатков аспарагина N123 и N196 SEQ ID NO: 2 содержит N-гликан A1.

[00019] В одном варианте осуществления, относительное количество N-гликана A1 гликопротеина определяют путем сравнения площади под пиком N-гликана A1 с общей площадью под пиком для всех N-гликанов, полученных из характерного паттерна олигосахаридов гликопротеина, полученного с помощью капиллярного электрофореза.

[00020] В одном аспекте, предложен способ изготовления соевого гидролизата, имеющего пониженное количество орнитина или путресцина. В одном варианте осуществления, способ включает в себя этапы ферментативного расщепления соевого экстракта в свободной от остатков реакционной емкости, измерения количества орнитина в соевом гидролизате, и выбора тех партий соевого гидролизата, которые содержат ≤ 0,067% (мас./мас.) орнитина или путресцина, для использования в среде для культивирования клеток. В одном варианте осуществления, способ включает в себя этапы ферментативного расщепления соевого экстракта в свободной от остатков реакционной емкости, измерения количества путресцина в соевом гидролизате, и выбора соевого гидролизата с ≤ 0,067% (мас./мас.) орнитина или путресцина, для использования в среде для культивирования клеток.

[00021] Термин «около» можно понимать как в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, или 0,01% от указанного значения. Если иное не следует из контекста, все числовые значения, предоставляемые в данном документе, видоизменяются термином «около».

[00022] Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы в практике или испытание

данного изобретения, ниже описаны подходящие способы и материалы. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие источники, упоминаемые в данном документе, включены посредством ссылки в полном объеме. Эти источники, на которые ссылаются в данном документе, не признаются предшествующим уровнем техники для заявленного изобретения. В случае конфликта, данное описание, включая определения, будет иметь преимущество. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены быть ограничивающими. Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00023] Любой из указанных выше аспектов и вариантов осуществления может быть объединен с любым другим аспектом или вариантом осуществления, как раскрыто в данном документе, в разделах СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ и/или ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ.

[00024] Патент или файл заявки содержит, по меньшей мере, одну цветную фигуру. Копии данного патента или заявки на патент с цветными фигурами будут предоставлены Бюро по запросу и уплаты необходимого сбора.

[00025] Различные объекты и преимущества, и более полное понимание данного изобретения являются очевидными и более понятными при обращении к следующему ПОДРОБНОМУ ОПИСАНИЮ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ и к прилагаемой ФОРМУЛЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ, при использовании в сочетании с прилагаемыми ГРАФИЧЕСКИМИ МАТЕРИАЛАМИ, при этом:

[00026] Фиг. 1 иллюстрирует хроматографический профиль элюирования аминокислот, полученных с помощью нингидрина. Ось X отображает время элюирования при колоночной хроматографии (время удержания), а ось Y отображает поглощение света при 570 нм. Панель A иллюстрирует партию, которая не соответствует критериям для получения приемлемой смеси N-гликанов согласно стандартов FDA. Панель B иллюстрирует приемлемый аминокислотный состав гидролизата соевого белка. Пик, представляющий орнитин отмечен кругом на обеих хроматограммах.

[00027] Фиг. 2 иллюстрирует капиллярную электрофореграмму олигосахаридов, освобожденных из гликопротеина с помощью расщепления пептид:N-гликозидаза F (PNGase F). Ось X отображает время элюирования из капилляра, а ось Y отображает поглощения света или интенсивность флуоресценции. Пики пронумерованы как 1-21. Пик 1 представляет собой N-гликан A2; пик 4 представляет собой N-гликан A2F; пик 11 представляет собой N-гликан A1; пик 14 представляет собой N-гликан A1F; пик 16 представляет собой N-гликан NGA2F; пик 19 представляет собой N-гликан NA2G1F; пик 20 представляет собой N-гликан NA2; и пик 21 представляет собой N-гликан NA2F.

[00028] Фиг. 3 иллюстрирует дот-блот относительного количества N-гликана A1 в зависимости от концентрации орнитина и цитруллина в гидролизате соевого белка. Ось X отображает концентрацию цитруллина или орнитина в мг/л. Ось Y отображает

относительную площадь пика 11, который представляет собой N-гликан A1.

[00029] Фиг. 4 представляет собой график корреляции, изображающий отрицательную корреляцию концентрации орнитина в соевом гидролизате (нижний правый квадрант) и относительного количества пика 11 в афлиберцепте (N-гликан A1, верхний левый квадрант).

[00030] Фиг. 5 представляет собой график, изображающий (i) отрицательную корреляцию концентрации орнитина в соевом гидролизате (нижний левый квадрант) и конечного титра рилонацепта (верхний правый квадрант); и (ii) положительную корреляцию концентрации орнитина в совом гидролизате (нижний левый квадрант) и накопление лактата в среде (нижний левый квадрант).

[00031] Фиг. 6A представляет собой пару графиков, изображающих количество полиамина, синтезированного из культуры клеток CHO, отображенное либо как IVCD x 10^6 клеток-день/мл, либо в виде титра (грамм/мл), в виде зависимости от дня партии при различных условиях, включая, контроль, высокие и низкие концентрации орнитина, путресцина, MFC и IPC.

[00032] Фиг. 6B представляет собой таблицу, предоставляющую данные по экспериментальных условиях для каждой исследуемой группы, изображенной на Фиг. 6A.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00033] Следует понимать, что объем данного изобретения не ограничивается описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Кроме того, следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена быть ограничивающей.

[00034] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение относится. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данной заявке, могут быть использованы в практике или испытание данного изобретения, некоторые конкретные способы и материалы описаны ниже. Единицы, приставки и символы могут быть указаны в их стандартной, принятой промышленностью, форме. Числовые диапазоны, изложенные в данном документе, представлены в квадратных скобках, и это означает, что они включают в себя число, определяющие диапазон. Если не указано иное, термины в единичном числе должны истолковываться как означающие «по меньшей мере, один из».

[00035] Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только целей структурирования, и не должны истолковываться как ограничивающие описанный объект изобретения. Способы и методы, описанные в данном документе, как правило, выполняют в соответствие с обычными способами, известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании, если не указано иное. Смотрите,

например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), Julio E. Celis, Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998), и Dieffenbach and Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995). Все публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00036] Определения

[00037] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение относится.

[00038] Фраза «относительное количество» обозначает количество вида молекул по отношению к общему количеству всех видов молекул общего типа. Например, относительное количество гликана A1 (то есть, (GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2(Gal)2(SA)1) рассчитывают как количество A1/сумма количеств всех N-гликанов. Относительное количество может быть выражено в виде абсолютного количества массы к массе (т. е. грамм/грамм) или процента, т. е., % (мас./мас.).

[00039] «Орнитин» представляет собой некодируемую аминокислоту, участвующую в цикле мочевины, синтезе полиаминов и метаболизме аргинина. Также известно, что орнитин влияет на содержание гликоформ рекомбинантных белков. Смотрите PCT/US2014/069378. На орнитин воздействуют несколько ферментов. Например, орнитин декарбоксилаза катализирует превращение орнитин в путресцин в пути биосинтеза полиаминов. Смотрите, Pegg A, J. of Biol. Chem. (2006) 281:21 pp. 14532. Кроме того, превращение орнитина в цитруллин катализируется орнитин транскарбамилазой, как часть цикла мочевины. Метаболизм орнитина происходит как в цитозоле, так и в митохондриях клеток в культуре. Наличие путресцина или наличие орнитина было признано критическим для роста и продуктивности клеток, культивируемых в средах с известным химическим составом, однако не было описано влияние на критические факторы качества белка, продуцируемого такими клетками.

[00040] «Путресцин» представляет собой некодируемую аминокислоту, полиамин, участвующей в цикле мочевины. Путресцин (также известный как 1,4-диаминобутан, имеющий химическую формулу $C_4H_{12}N_2$) производится путем декарбоксилирования орнитина, и служит в качестве предшественника гамма-аминобутират (γ-аминобутирата).

[00041] Как применяется в данном документе, термин «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле, содержащей два или большее количество аминокислотных остатков, соединенных друг с другом посредством пептидной связи. Пептиды, полипептиды и белки могут также содержать модификации, такие как гликозилирование, липидные присоединения, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксилирование

и АДФ-рибозилирование. Пептиды, полипептиды и белки могут иметь научный или коммерческий интерес, в том числе препараты на основе белков (биотерапевтические средства). Пептиды, полипептиды и белки включают в себя, среди прочего, антитела и химерные или гибридные белки. Пептиды, полипептиды и белки могут быть получены с помощью рекомбинантных клеточных линий животных, например линий клеток млекопитающих с использованием способов культивирования клеток.

[00042] Термин «полинуклеотидная последовательность» или «пептидная последовательность», как применяется в данном документе, относится к полимерам нуклеиновых кислот, кодирующих белки, представляющие интерес, такие как химерные белки (например, молекулы-ловушки), антитела или части антител (например, VH, VL, CDR3), которые получают в виде биофармацевтического лекарственного вещества. Полинуклеотидная последовательность может быть произведена с помощью методов генной инженерии (например, последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, последовательность без интронов), и введена в клетку, где она может находиться в виде эписомы или может быть интегрирована в геном клетки. Полинуклеотидная последовательность может представлять собой природную последовательность, которую вводят в эктопическую область генома клетки-хозяина. Пептидная последовательность может быть гетерологичной, например, природной последовательностью из другого организма, рекомбинантной последовательностью, генетически модифицированной последовательностью, или, кроме прочего, последовательностью, экспрессируемой под контролем промотора, отличающегося от такового дикого типа, например, нуклеотидной последовательностью, кодирующей человеческий ортолог, в результате чего клетка-хозяин (продуцент) представляет собой клетку CHO.

[00043] Фраза «антиген-связывающий белок» включает в себя белок, который имеет, по меньшей мере, одну CDR, и который способен селективно распознавать антиген, т. е. способен связывать антиген с КД, которая находится по меньшей мере в микромолярном диапазоне. Терапевтические антиген-связывающие белки (например, терапевтические антитела) часто требуют $K_Д$, которая находится в наномолярном или пикомолярном диапазоне. Как правило, антиген-связывающий белок содержит две или большее количество CDR, например 2, 3, 4, 5, или 6 CDR. Примеры антиген-связывающих белков включают в себя антитела, антиген-связывающие фрагменты антител, такие как полипептиды, содержащие вариабельные области тяжелых цепей и легких цепей антитела (например, Fab-фрагмент, F(ab')2-фрагмент), а также белки, содержащие вариабельные области тяжелых цепей и легких цепей антитела и содержащие дополнительные аминокислоты из константных областей тяжелых и/или легких цепей (например, один или большее количество константных доменов, то есть, один или большее количество доменов CL, CH1, шарнира, CH2 и CH3).

[00044] Термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей,

соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет вариабельную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет вариабельную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые перемежаются с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоят из трех CD и четырех FR, расположенных от амина-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Термин «антитело» включает в себя как гликозилированные, так и негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает в себя молекулы антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, например антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной нуклеотидной последовательностью, с целью экспрессии антитела. Термин «антитело» также включает в себя биспецифическое антитело, которое включает в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с больше чем одним эпитопом. Биспецифические антитела, в целом, описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00045] Термин «антиген-связывающий участок» антитела (или фрагмент антитела), или белка, представляющего интерес, относится к одному или большему количеству фрагментов антитела или белка, представляющего интерес, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Неограничивающие примеры белковых связывающих фрагментов, охватываемых термином «антиген-связывающая часть» антитела, включают в себя: (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')2-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature (1989) 241:544-546), который состоит из домена VH, (vi) изолированную CDR, и (vii) scFv, который состоит из двух доменов из фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером, что сформировать единую белковую цепь, в которой пара областей VL и VH формирует моновалентные молекулы. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином «антитело». Смотрите, например, Holliger et al., PNAS USA (1993) 90:6444-6448; Poljak et al., Structure (1994) 2:1121-1123.

[00046] Более того, антитело или его антиген-связывающая часть может быть частью более крупной молекулы иммуноадгезии, сформированной ковалентным или нековалентным объединением антитела или части антитела с одним или большим

количеством других белков или пептидов. Не ограничивающие примеры таких молекул иммуноадгезии включают в себя применение области кора стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas (1995) 6:93-101) и применение остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевого полигистидиновая тэга для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al. Mol. Immunol. (1994) 31:1047-1058). Части антитела, такие как фрагменты Fab и F(ab')2, могут быть получены из целых антител, применяя обычные методы, например путем расщепления целых антител папаином или пепсином. Кроме того, антитело, части антитела и молекулы иммуноадгезии могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК, широко известных в данной области техники (смотрите Sambrook et al., 1989).

[00047] Термин «человеческое антитело» включает в себя антитело, имеющее вариабельные и константные области, полученные из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Человеческие антитела согласно данному изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновыми последовательностями зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом in vitro или соматическим мутированием in vivo), например, в CDR, и, в частности в CDR3. Термин «рекомбинантное человеческое антитело», как применяется в данном документе, предназначен для включения в себя всех антител человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных способов, например антител, экспрессированных с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антител, выделенных из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител, антител, выделенных из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (смотрите, например, Taylor et al. Nucl. Acids Res. (1992) 20:6287-6295) или антител, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любыми другими способами, предполагающими вовлечение сплайсинга последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу in vitro (или, когда используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу in vivo), и, таким образом, аминокислотные последовательности из VH и VL областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хоть и получены из и связанные с последовательностями VH и VL зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в пределах репертуара антител зародышевой линии человека.

[00048] «Гибридные белки Fc» содержат часть двух или больше, или целые два или большее количество белков, один из которых представляет собой часть Fc молекулы

иммуноглобулина, которые в инном случае не обнаруживаются вместе в природе. Получение гибридных белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая домен Fc) было описано, например, Ashkenazi et al., PNAS USA (1991) 88:10535; Byrn et al., Nature (1990) 344:677; и Hollenbaugh et al., Current Protocols in Immunology (1992) Suppl. 4, pp. 10.19.1-10.19.11. «Гибридные белки рецептора Fc» содержат один или большее количество внеклеточных доменов рецептора, соединенного с фрагментом Fc, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которой следуют домен CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, Fc-гибридный белок содержит две или большее количество различных цепей рецепторов, которые связываются с одним или большим количеством лигандов.

[00049] В некоторых вариантах осуществления, «Fc-гибридный белок» представляет собой молекулу «ловушку», которая является рецепторной молекулой-ловушкой, которая содержит два отдельных компонента рецептора, которые имитируют связывающие домены соответствующего эндогенного рецептора и часть Fc антитела. Не ограничивающие примеры молекул-ловушек включают в себя ловушку ИЛ-1 (например, рилонацепт, который содержит область связывания лиганда ИЛ-1RAcP, слитую с внеклеточной областью ИЛ-1R1, которая, в свою очередь, слитая с Fc hIgG1) (например, SEQ ID NO: 1) (смотрите патент США № 6927004), или ловушку VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, который в свою очередь слит к Fc hIgG1. Смотрите, например, патенты США № 7087411, № 7279159; смотрите также патент США № 5610279 по этанерцепту (ловушка ФНО).

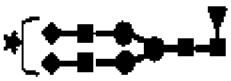
[00050] «Гликозилирование» включает в себя формирование гликопротеинов, при этом олигосахариды присоединяются либо к боковой цепи аспарагина (Asn) (т.е., N-опосредованное), или серина (Ser) или треонина (Thr) (т.е., O-опосредованное), белка. «Гликопротеины» включают в себя любой белок, который содержит O-опосредованный гликан или N-опосредованный гликан. Гликаны могут быть гомо- или гетерополимерами из моносахаридных остатков, которые могут быть линейными или разветвленными. N-опосредованное гликозилирование, как известно, инициируется в основном в эндоплазматическом ретикулуме, в то время показано, что O-опосредованное гликозилирование инициируется либо в ЭР, либо в аппарате Гольджи. Термин «N-гликан» используется взаимозаменяемо с термином «N-опосредованный олигосахарид.» Термин «O-гликан» используется взаимозаменяемо с термином «O-опосредованный олигосахарид.»

[00051] «N-гликановые белки» включают в себя белки, которые содержат или могут допускать наличие N-опосредованных олигосахаридов. N-гликаны могут состоять из N-ацетил галактозамина (GalNAc), маннозы (Man), фукозы (Fuc), галактозы (GAL), нейраминовой кислоты (NANA), и других моносахаридов, однако N-гликаны, как правило, имеют общую коровую пентасахаридную структуру, содержащую: три маннозы

и два углевода N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). Белки с идущей подряд аминокислотной последовательностью, Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X обозначает любую аминокислоту, кроме пролина, могут предоставлять сайт присоединения для N-гликанов.

[00052] N-гликаны, включают те N-опосредованные олигосахариды, которые перечислены в Таблице 1. Сокращенные обозначения перечисленных олигосахаридов используются в данном документе в качестве упрощенных имен для описания олигосахаридов. Таким образом, например, N-гликан A1 содержит аргинин, связанный с олигосахаридом, состоящим из (SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3.

Таблица 1: N-опосредованные олигосахариды

Название молекулы*	**Сокращенное обозначение**	**Ожидаемая масса (г/моль)**	**Графическое отображение****
(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	A1	2051,7	
(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	A1F	2197,7	
(SA)2(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	A2	2343,2	
(SA)2(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	A2F	2488,8	
(Man)5(GlcNAc)2	Man5	1354,4	
(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	NA2	1760,6	
(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	NA2F	1906,6	
(Gal)(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	NA2G1	1598,5	
(Gal)(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	NA2G1F	1744,1	
(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2	NGA2	1436,5	
(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2(Fuc)	NGA2F	1582,5	

*Сокращения для моносахаридов: сиаловая кислота (SA), галактоза (GAL), манноза (Man), GlcNAc (N-ацетилглюкозамин) и фукоза (Fuc). ** Ключ расшифровки гликана:

треугольник=фукоза; квадрат= N-ацетил глюкозамин; круг=манноза; звездочка=сиаловая кислота.

Скрининг

[00053] «Гидролизаты» представляют собой сложные материалы, полученные в результате гидролиза материала растительного, материал животного происхождения, сыворотки, дрожжей, и тому подобного. Термин «гидролизат» используется взаимозаменяемо с «белковым гидролизатом». «Растительные гидролизаты» (растительные белковые гидролизаты) представляют собой гидролизованный растительный материал, такой как рисовая мука, пшеничная мука, кукурузная мука, соевая мука, и тому подобное. Белковые гидролизаты могут быть получены с помощью трех основных способов: кислотный гидролиз, щелочной гидролиз, и ферментативный гидролиз. Для биологических применений, в том числе биотерапевтического производства, белковые гидролизаты главным образом получают путем ферментативного гидролиза. Например, соевый гидролизат, полученный путем расщепления пепсином, может называться «соевым пептоном», или дрожжевой гидролизат, полученный путем расщепления трипсином, может называться «дрожжевым триптоном». Franek et al., Biotechnol. Prog. 16(5): 688-92 (2000) включен в данный документ для информации по растительным белковым гидролизатам и способам их производства.

[00054] В некоторых вариантах осуществления, заявленный гидролизат представляет собой растительный гидролизат. В конкретном варианте осуществления, заявленный белковый гидролизат представляет собой соевый гидролизат. «Соевый гидролизат» представляет собой ферментативно расщепленный соевый продукт, полученный из соевых бобов, который в своем большинстве имеет неопределенный химический состав. В целом, соевый гидролизат состоит из разнородной смеси аминокислот, белков, углеводов, минералов и витаминов. Соевый гидролизат является белковым гидролизатом растительного происхождения, который является коммерчески доступным, например, в виде раствора высокой концентрации (например, HyClone™ HyQ Soy Hydrolysate solution) или порошка (например, Sigma Aldrich ® S1674 (Amisoy ™), белковый соевый гидролизат). А «партия» или «партия продукта» соевого гидролизата, как применяется в данном документе, относится к изготавливаемому количеству соевого гидролизата в результате гидролиза сырья соевых бобов. Например, каждый процесс гидролиза может давать уникальную «партию» или «партию продукта» соевого гидролизата с различными концентрациями компонентов, таких как витамины, аминокислоты, пептиды и углеводы. Соевый гидролизат обычно используется вместе с средой для культивирования клеток без животного белка, для выращивания клеточных линий млекопитающих при производстве коммерческих биотерапевтических агентов, таких как антитела. Более конкретно, соевый гидролизат добавляют к среде для культивирования клеток до или во время инокуляции клеток. Затем клетки культивируют в среде, содержащей гидролизат, до тех пор, пока их не будут собирать. Из-за неопределенной природы соевого гидролизата, партии соевого гидролизата будут

различаться от партии к партии (или от партии продукта к партии продукта), что может привести к нестабильности коммерческого производства биотерапевтических средств.

[00055] Согласно данному изобретению определено, что концентрации некоторых компонентов в партии соевого гидролизата влияют на качество и состав белков, продуцируемых в клеточной культуре с применением соевого гидролизата. Согласно данному изобретению предложены способы скрининга партий соевого гидролизата, чтобы выбрать определенные партии соевого гидролизата, которые содержат желаемое количество компонента, такого как, например, орнитин, цитруллин, путресцин, аргинин, или их комбинацию.

[00056] В некоторых вариантах осуществления, способ скрининга включает в себя измерение количества орнитина или путресцина, по меньшей мере, в части (то есть, образце) партии соевого гидролизата. В конкретном варианте осуществления, образец соевого гидролизата взвешивают и его часть разводят до требуемой концентрации. В некоторых вариантах осуществления, раствор соевого гидролизата затем разбавляют в растворителе до второй желаемой концентрации (например, от 1 г/л до 25 г/л) и затем может проводится определение состава полученных растворов соевого гидролизата.

[00057] В некоторых вариантах осуществления, на этапе измерения используют подходящий способ определения молекулярного состава образца соевого гидролизата, включая, например, колориметрическое обнаружение, выполняемое нингидриновой реакцией на элюате, или хроматографию элюированных нингидрин-положительных соединений, такую как ВЭЖХ или СВЭЖХ, и единицы, используемые для выражения измеренного количества каждого компонента (например, орнитина или путресцина) могут представлять собой любые подходящие единицы (например, микромоль/л, мг/л или г/л). В некоторых вариантах осуществления, измерение количества орнитин или путресцина включает в себя измерение концентрации орнитина в образце или измерения общего количества орнитина в образце соевого гидролизата. Однако, измеряют количество орнитина или путресцина, и какими бы ни были единицы, используемые для выражения измеренного количества, концентрации орнитина или путресцина в выбранной партии соевого гидролизата меньше чем или равны 0,67 мг орнитина или путресцина на г сои.

[00058] В одном варианте осуществления, получают образец партии соевого гидролизата, и определяют содержание в образце орнитина или путресцина с помощью хроматографии аминокислот на ионнообменной колонке с обнаружением нингидрином на элюате. Более конкретно, в конкретном варианте осуществления способы скрининга включают в себя кислотный гидролиз образца соевого гидролизата и разведение в буфере для образцов. Гидролизованный образец затем подвергают высокоэффективному катионообменному разделению на, например, колонке из сульфированной полистирольной смолы (Dowex 50), после чего следует дериватизация элюата, что делает возможным чувствительное обнаружение отдельных аминокислот в образце. Смотрите, например, Moore and Stein. J. Biol. Chem. (1954) Vol. 211 pp. 907-913; Nemkov, et al., Amino Acids 2015 Nov; 47(11): 2345-2357; Wahl and Holzgrabe, “Amino acid analysis for

pharmacopoeial purposes" Talanta 154:150-163,1 July 2016. После проявления цвета в элюате с помощью реагента нингидрина, измеряют оптическую плотность в диапазоне фиолетового от нингидрина, например, 570 нм. Сбор данных выполняют с использованием программного обеспечения для хроматографии (например, программного обеспечения для хроматографии версии 3.1.5b EZChrom Elite для Hitachi), чтобы получить количественную хроматограмму, показывающую мкмоль/л для каждой аминокислоты, мг/л для каждой аминокислоты, или г/л для каждой аминокислоты.

[00059] Обычному специалисту в данной области техники будет понятно, что могут быть использованы другие способы для идентификации и измерения количества аминокислот в составе образца в соответствии с способами данного изобретения, например хроматографией с доколоночной дериватизацией, или способами жидкостной хроматографии с обращенной фазой с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектроскопии.

[00060] В некоторых вариантах осуществления, жидкостная хроматография используются для скрининга образца соевого гидролизата. Например, образец партии соевого гидролизата может быть получен, как указано в данном документе, и подвержен хроматографическому прогону, или серии хроматографических прогонов на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), например Agilent 1100 или Agilent 1200SL. Масс-спектрометрический анализ может быть проведен для получения количественных данных высокого разрешения, характеризующих состав образца соевого гидролизата, который анализируют.

[00061] В некоторых вариантах осуществления, согласно данному изобретению предложен способ, который включает в себя скрининг партий соевого гидролизата на желаемое количество компонента, такого как орнитин, путресцин и/или цитруллин, и отбора тех партий соевого гидролизата, которые имеют желаемое количество такого компонента. Например, образец, включая часть партии порошка соевого гидролизата, может быть подвергнут скринингу, как описано выше, и подвергнут сравнению с стандартным аминокислотным профилем, получаемым при тех же условиях, что и образец прогона. Как показано на Фиг. 1А-1В, полученная хроматограмма(ы) будет предоставлять данные об концентрации каждого аминокислотного компонента, присутствующего в образце соевого гидролизата (например, мкмоль/л для каждой аминокислоты, мг/л для каждой аминокислоты, или г/л для каждой аминокислоты). Анализ хроматограммы облегчает идентификацию партий соевого гидролизата (т.е. образцов), которые содержат нужную концентрацию компонента, такого как орнитин, путресцин и/или цитруллин. Каждая партия соевого гидролизата, которая содержит необходимое количество определенного компонента или компонентов, затем отбирается для дальнейшего использования, например, в клеточном культивировании, как описано в данном документе. Фиг. 1, панель А иллюстрирует отбракованную партию после идентификации аминокислот. Фиг. 1, панель В иллюстрирует пример приемлемого прогона партии соевого гидролизата в идентичных условиях. Пик аминокислоты, соответствующий

орнитину обведен кругом на обеих фигурах. Концентрация орнитина или путресцина может быть определена отрисовкой стандартной кривой и интерполяцией образца концентрации орнитина или путресцина. В альтернативном варианте, относительное количество орнитина или путресцина может быть определено путем определения площади под кривой пика орнитина или путресцина, и разделения на сумму площадей под пиками для всех аминокислот, или путем сравнение площади пика с стандартом.

[00062] В некоторых вариантах осуществления, желаемую концентрацию компонента соевого гидролизата (например, орнитина или путресцина), выбирают как 5 мг/л или меньше. В одном варианте осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии соевого гидролизата будет выбираться в пределах от 0,5 мг/л до 5,0 мг/л или от 0,5 мг/л до 2,0 мг/л. В других вариантах осуществления, концентрация орнитина или путресцина в выбранной партии соевого гидролизата будет в пределах от 0,5 мг/л до 4,5 мг/л, от 0,5 мг/л до 4,0 мг/л, от 0,5 мг/л до 3,5 мг/л, от 0,5 мг/л до 3,0 мг/л, от 0,5 мг/л до 2,5 мг/л, от 0,5 мг/л до 2,0 мг/л, от 0,5 мг/л до 1,5 мг/л, или от 0,5 мг/л до 1,0 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация орнитина или путресцина в выбранной партии соевого гидролизата будет в пределах от 1,0 мг/л до 5,0 мг/л, от 1,5 мг/л до 5,0 мг/л, от 2,0 мг/л до 5,0 мг/л, от 2,5 мг/л до 5,0 мг/л, от 3,0 мг/л до 5,0 мг/л, от 3,5 мг/л до 5,0 мг/л, от 4,0 мг/л до 5,0 мг/л, или от 4,5 мг/л до 5,0 мг/л.

[00063] В конкретных вариантах осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии соевого гидролизата составляет по меньшей мере 0,5 мг/л, 0,6 мг/л, 0,7 мг/л, 0,8 мг/л, 0,9 мг/л, 1,1 мг/л, 1,2 мг/л, 1,3 мг/л, 1,4 мг/л, 1,5 мг/л, 1,6 мг/л, 1,7 мг/л, 1,8 мг/л, 1,9 мг/л, 2,0 мг/л, 2,1 мг/л, 2,2 мг/л, 2,3 мг/л, 2,4 мг/л, 2,5 мг/л, 2,6 мг/л, 2,7 мг/л, 2,8 мг/л, 2,9 мг/л, 3,0 мг/л, 3,1 мг/л, 3,2 мг/л, 3,3 мг/л, 3,4 мг/л, 3,5 мг/л, 3,6 мг/л, 3,7 мг/л, 3,8 мг/л, 3,9 мг/л, 4,0 мг/л, 4,1 мг/л, 4,2 мг/л, 4,3 мг/л, 4,4 мг/л, 4,5 мг/л, 4,6 мг/л, 4,7 мг/л, 4,8 мг/л, 4,9 мг/л, или 5,0 мг/л орнитина или путресцина.

[00064] В других вариантах осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии соевого гидролизата составляет не больше чем 0,67 мг орнитина на г сои. В еще других вариантах осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии соевого гидролизата составляет не больше чем 0,27 мг орнитина на г сои. В другом варианте осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии соевого гидролизата составляет не больше чем 0,24 мг орнитина или путресцина на г сои. В некоторых вариантах осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии сои составляет от 0,067 мг до 0,67 мг орнитина или путресцина на г сои. В еще других вариантах осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии соевого гидролизата находиться в диапазоне от 0,067 мг до 0,27 мг орнитина на г сои. В еще одном варианте осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии соевого гидролизата находиться в диапазоне от 0,067 мг до 0,24 мг орнитина на г сои.

[00065] В одном варианте осуществления, относительное количество по массе орнитина или путресцина (% мас./мас.) в выбранном соевом гидролизате (мас./мас. =

масса орнитина или путресцина/совокупная масса гидролизата) составляет ≤ 0,067%, например, 0,0001%, 0,0002%, 0,0003%, 0,0004%, 0,0005%, 0,0006%, 0,0007%, 0,0008%, 0,0009%, 0,001%, 0,0015%, 0,002%, 0,0025%, 0,003%, 0,0035%, 0,004%, 0,0045%, 0,005%, 0,0055%, 0,006%, 0,0061%, 0,0062%, 0,0063%, 0,0064%, 0,0065%, 0,0066%, по мас./мас.

[00066] В одном варианте осуществления, растительный белковый гидролизат выбирают на основе получения гликопротеина с атрибутом определенного качества. Качество гликопротеина может быть определено путем оценки уровня одного или большего количества специфических N-гликанов на гликопротеине, или путем оценки уровня одного или большего количества специфических углеводов на гликопротеине, или комбинацией нескольких атрибутов. Так, например, гликопротеин, имеющий определенный уровень фукозы, например, 5-10 молей фукозы на моль гликопротеина, может быть критерием атрибута качества; или конкретный уровень сиаловой кислоты, например, 5-15 молей сиаловой кислоты на моль гликопротеина; или специфичное соотношение N-гликана A1 и всех N-гликанов, например, 10-17% (мас./мас.) могут рассматриваться как соответствующие требуемому атрибуту качества. Растительный белковый гидролизат, допускающий производство указанного гликопротеина, будет рассматриваться как таков, что может быть выбран.

[00067] В одном варианте осуществления, растительный белковый гидролизат выбирают путем продуцирования гликопротеина в клетке, культивируемой в питательной среде, содержащей возможный выбранный (потенциально выбираемый) растительный белковый гидролизат (например, соевый гидролизат), очищая гликопротеин, подвергая гликопротеин анализу на характерные олигосахариды, и определяя относительное количество N-гликана A1 путем вычисления площади под пиком, связанным с N-гликаном A1, и разделения этой величины на совокупную площадь пиков всех N-гликанов, и выбирая растительный белковый гидролизат, который делает возможным продуцирование гликопротеина с относительным количеством N-гликана A1 ≥ 10%, ≥ 10,5%, 10-17%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, или 18%.

[00068] Культивирование клеток

[00069] Согласно данному изобретению предложен способ культивирования клеток, экспрессирующих белок, представляющий интерес, в среде для культивирования клеток с использованием выбранной партии соевого гидролизата, как описано выше. Согласно рассматриваемому в данный момент изобретению в первый раз обнаружено, что использование выбранных партий соевого гидролизата, содержащего 5,0 мг/л орнитина или меньше в среде для культивирования клеток, уменьшает изменчивость от партии к партии и улучшает качество белкового продукта. Согласно рассматриваемому в данный момент изобретению в первый раз обнаружено, что использование выбранных партий соевого гидролизата, содержащего 5,0 мг/л путресцина или меньше в среде для культивирования клеток, уменьшает изменчивость от партии к партии и улучшает качество белкового продукта.

[00070] «Культивирование клеток» или «культивирование» обозначает рост и размножение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования для клеток млекопитающих известны в данной области техники. Смотрите, например, Animal cell culture: A Practical Approach, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих можно культивировать в суспензии или тогда, когда они присоединены к твердой подложке. Для культивирования клеток млекопитающих доступны биореакторы с псевдоожиженным слоем, биореакторы с полыми волокнами, вращающиеся флаконы, встряхиваемые колбы или биореакторы с мешалкой, с или без микроносителей, и работающие в режиме одной загрузки, периодической подпитки, непрерывном, полунепрерывном режиме или режиме перфузии. Среда для культивирования клеток или концентрированная питательная среда может добавляться в культуру непрерывно или с интервалами в течение культивирования. Например, культура может подпитываться один раз в день, через день, раз в три дня, или может подпитываться, когда концентрация специфического компонента среды, который контролируют, находится за пределами желаемого диапазона.

[00071] Как применяется в данном документе, термины «среда для культивирования клеток», «среда», «клеточная среда», «клеточная питательная среда» или «питательная среда» относятся к любому питательному раствору, используемому для выращивания клеток, например, клеток животных или млекопитающих, и который как правило, обеспечивает по меньшей мере один или большее количество следующих компонентов: источник энергии (обычно в виде углеводов, таких как глюкоза); одну или большее количество основных аминокислот, и, как правило двадцать основных аминокислот, а также цистеин; витамины и/или другие органические соединения, как правило, требуемые в низких концентрациях; липиды или свободные жирные кислоты; и микроэлементы, например, неорганические соединения или природные элементы, которые, как правило, требуются в очень низких концентрациях, как правило, в микромолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления, среду для культивирования клеток готовят путем объединения соевого или другого растительного белкового гидролизата с дополнительным ингредиентом.

[00072] Как применяется в данном документе, термин «дополнительный ингредиент» включает в себя любой один или большее количество из компонентов среды для культивирования клеток, включая, но не ограничиваясь лишь этими: воду, источник энергии, одну или большее количество основных аминокислот, и, как правило, двадцать основных аминокислот, а также цистеин; витамины и/или другие органические соединения, которые как правило требуются в низких концентрациях, липиды или свободные жирные кислоты, и микроэлементы.

[00073] В конкретных вариантах осуществления, среду для культивирования клеток дополняют порцией выбранной партии соевого гидролизата. В некоторых вариантах осуществления, среду для культивирования клеток дополняют от около 0,5 г/л до около 25 г/л выбранного соевого гидролизата. В некоторых вариантах осуществления,

в среду для культивирования клеток добавляют около 0,5 г/л, 1 г/л, 1,5 г/л, 2 г/л, 2,5 г/л, 2 г/л, 2,5 г/л, 3 г/л, 3,5 г/л, 4 г/л, 4,5 г/л, 5 г/л, 5,5 г/л, 6 г/л, 6,5 г/л, 7 г/л, 7,5 г/л, 8 г/л, 8,5 г/л, 9 г/л, 9,5 г/л, 10 г/л, 10,5 г/л, 11 г/л, 11,5 г/л, 12 г/л, 12,5 г/л, 13 г/л, 13,5 г/л, 14 г/л, 14,5 г/л, 15 г/л, 15,5 г/л, 16 г/л, 16,5 г/л, 17 г/л, 17,5 г/л, 18 г/л, 18,5 г/л, 19 г/л, 19,5 г/л, 20 г/л, 20,5 г/л, 21 г/л, 21,5 г/л, 22 г/л, 22,5 г/л, 23 г/л, 23,5 г/л, 24 г/л, 24,5 г/л, или около 25 г/л выбранной партии соевого гидролизата.

[00074] В одном варианте осуществления, концентрация орнитина или путресцина в среде для культивирования клеток, после добавления растительного белкового гидролизата, представляет собой ≤ 5 мг/л, 0,6-3 мг/л, 0,01 мг/л, 0,02 мг/л, 0,03 мг/л, 0,04 мг/л, 0,05 мг/л, 0,06 мг/л, 0,07 мг/л, 0,08 мг/л, 0,09 мг/л, 0,010 мг/л, 0,015 мг/л, 0,02 мг/л, 0,025 мг/л, 0,03 мг/л, 0,035 мг/л, 0,04 мг/л, 0,045 мг/л, 0,05 мг/л, 0,055 мг/л, 0,06 мг/л, 0,065 мг/л, 0,07 мг/л, 0,075 мг/л, 0,08 мг/л, 0,085 мг/л, 0,09 мг/л, 0,095 мг/л, 0,1 мг/л, 0,15 мг/л, 0,2 мг/л, 0,25 мг/л, 0,3 мг/л, 0,35 мг/л, 0,4 мг/л, 0,45 мг/л, 0,5 мг/л, 0,55 мг/л, 0,6 мг/л, 0,65 мг/л, 0,7 мг/л, 0,75 мг/л, 0,8 мг/л, 0,85 мг/л, 0,9 мг/л, 0,95 мг/л, 1 мг/л, 1,5 мг/л, 2 мг/л, 2,5 мг/л, 3 мг/л, 3,5 мг/л, 4 мг/л, 4,5 мг/л, или 5 мг/л.

[00075] В одном варианте осуществления, клетки которые культивируют представляют собой клетками клеточной линии, способной продуцировать биотерапевтический белок. Не ограничивающие примеры клеточных линий, которые используются для производства белковых биотерапевтических средств включают в себя, в частности, первичные клетки, клетки BSC, клетки HeLa, клетки HepG2, клетки LLC-MK, клетки CV-1, клетки COS, клетки VERO, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки CRFK, клетки RAF, клетки RK, клетки TCMK-1, клетки LLCPK, клетки PK15, клетки LLC-RK, клетки MDOK, клетки BHK, клетки BHK-21, клетки CHO, клетки CHO-K1, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки BHK, клетки 3T3, клетки 293, клетки RK, клетки Per.C6 и эмбриональные клетки курицы. В одном варианте осуществления, клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO, или один или большее количество из нескольких конкретных вариантов клеток CHO, оптимизированных для крупномасштабного белкового производства, например, CHO-K1, или клеток EESYR®, полученных из CHO-K1 (повышенная экспрессия и стабильность областей) (патент США № 7771997).

[00076] В одном варианте осуществление, клетки, которые культивируют, и которые экспрессируют гетерологичный гликопротеин, представляют собой популяцию клеток, полученных путем клональной экспансии клетки (т. е. из клетки-предшественницы), которая содержит и экспрессирует полинуклеотид, кодирующий гликопротеин или субъединицу гликопротеина, при этом гликопротеин представляет собой комплекс мульти-субъединичного белка, подобного антителу. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или около 100% основной массы клеток популяции клеток, полученных или размноженых клональной экспансией клетки-предшественницы,

содержат полинуклеотид, кодирующий гликопротеин, и экспрессируют гликопротеин.

[00077] Клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, могут культивироваться в сосудах для клеточных культур малого объема, например, в 125 мл сосудах, содержащих около 25 мл среды, в 250 мл сосудах, содержащих около от 50 до 100 мл среды, в 500 мл сосудах, содержащих около от 100 до 200 мл среды. В альтернативном варианте, культуры могут быть большего масштаба, например, в 1000 мл сосудах, содержащих около от 300 до 1000 мл среды, в 3000 мл сосудах, содержащих около от 500 мл до 3000 мл среды, в 8000 мл сосудах, содержащих около от 2000 мл до 8000 мл среды, и в 15000 мл сосудах, содержащих около от 4000 мл до 15000 мл среды. Культуры для производства (т. е. производственные клеточные культуры) могут содержать 10000 л среды или больше. Клеточные культуры большого масштаба или «производственные клеточные культуры», такие как для клинического изготовления белковых терапевтических средств, обычно поддерживают в течение нескольких дней или даже недель, в то время как клетки продуцируют нужный белок (белки). В течение этого времени культуру могут дополнять концентрированной питательной средой, содержащей компоненты, такие как питательные вещества и аминокислоты, которые потребляются в процессе культивирования.

[00078] В некоторых вариантах осуществления, используют концентрированную питательную среду. Концентрированная питательная среда может основываться на любом составе среды для культивирования клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать большую часть компонентов среды для культивирования клеток, описанных в данном документе, например, около 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X, или даже около 1000X их нормального эффективного количества. Концентрированные питательные среды часто используют в процессах стационарного культивирования с подпиткой.

[00079] В некоторых вариантах осуществления, среду для культивирования клеток дополняют «добавками по требованию», также известными как добавки, ингредиенты по требования, или химические вещества по требованию, в процессе выращивания клеток или продуцирования белка. Добавки по требованию включают в себя любой один или большее количество факторов роста или других белков, буфер, источник энергии, соль, аминокислоту, метал, и хелатирующий агент. Другие белки включают в себя трансферрин и альбумин. Факторы роста, которые включают в себя цитокины и хемокины, как правило, известны в данной области техники и, как известно, стимулируют рост клеток, или в некоторых случаях, клеточную дифференциацию. Фактор роста обычно представляет собой белок (например, инсулин), небольшой пептид или стероидный гормон, такой как эстроген, ДГЭА, тестостерон, и тому подобное. В некоторых случаях, фактор роста может представлять собой неприродное химическое вещество, которое способствует пролиферации клеток или производству белка, такое как, например, тетрагидрофолат (ТГФ), метотрексат и т. п. Не ограничивающие примеры белковых и пептидных факторов роста включают в себя ангиопоэтины, костные морфогенетические белки (BMP), полученный из головного мозга нейротрофический фактор (BDNF), эпидермальный

фактор роста (ЭФР), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), полученный из линии глиальных клеток нейротрофический фактор (GDNF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста и дифференциации 9 (GDF9), фактор роста гепатоцитов (HGF), полученный из гепатомы фактор роста (HDGF), инсулин, инсулиноподобный фактор роста (IGF), стимулирующий миграцию фактор, миостатин (GDF-8), фактор роста нервов (ФРН) и другие нейротрофины, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), тромбопоэтин (TPO), трансформирующий фактор роста альфа (TGF-альфа), трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), агонистов сигнального пути Wnt, плацентарный фактор роста (PlGF), соматотрофин фетальной бычьей (FBS), интерлейкин-1 (ИЛ-1), ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, и тому подобное. В одном варианте осуществления, среду для культивирования клеток дополняют добавкой по требованию в виде фактора роста - инсулина. В одном варианте осуществления, концентрация инсулина в среде, то есть, количество инсулина в среде для культивирования клеток после добавления составляет около от 0,1 мМ до 10 мМ. В состав среды некоторых вариантов осуществления может быть включена одна или большее количество добавок по требованию.

[00080] Буферы, как правило, являются известными в данной области техники. Изобретение не ограничено каким-либо конкретным буфером или буферами, и любой из специалистов в данной области техники может выбрать подходящий буфер или буферную систему для использования с конкретной клеточной линией, продуцирующей конкретный белок. В одном варианте осуществления, добавочным буфером по требованию является система NaHCO3/CO2. В одном варианте осуществления, добавочный буфер по требованию содержит NaHCO3. В другом варианте осуществления, буфер представляет собой HEPES.

[00081] Источники энергии для использования в виде добавки по требованию в культуре клеток также хорошо известны в данной области техники. Без ограничения, в одном варианте осуществления, добавочный источник энергии по требованию представляет собой глюкозу. С учетом конкретных и специфических требований конкретной клеточной линии и белка, который хотят продуцировать, в одном варианте осуществления глюкоза может быть добавлена в серду в концентрации около от 1 до 20 мМ.

[00082] Хелаторы также хорошо известны в данной области культивирования клеток и производства белка. Тетранатрий ЭДТА дигидрат и цитрат представляют собой два общеизвестных энтеросорбента, которые используют в данной области техники, хотя в практическом применение данного изобретения могут быть использованы и другие энтеросорбенты. В одном варианте осуществления, добавочный хелатор по требованию представляет собой тетранатрий ЭДТА дигидрат. В одном варианте осуществления, добавочный хелатор по требованию представляет собой цитрат, такой как Na3C6H5O7.

[00083] В одном варианте осуществления, в клеточную культуру может быть добавлена одна или большее количество добавочных аминокислот по требования, например глутамин. Другие добавки по требованию включают в себя одну или большее количество различных солей металлов, таких как соли железа, никеля, цинка и меди. В одном варианте осуществления, среду для культивирования клеток дополняют любым одним или большим количеством из: сульфатом меди, сульфатом цинка, хлоридом железа; и сульфатом никеля.

[00084] В одном варианте осуществления, среду дополняют с интервалами в течение культивирования клеток в соответствии с процессом периодической подпитки. Культивирование с периодической подпиткой, как правило, известно в данной области техники и используется для оптимизированного производства белка. Смотрите, например, Y.M. Huang et al., Biotechnol Prog. (2010) 26(5) pp.1400-1410.

[00085] В другом аспекте данного изобретения, клетки, которые культивировали в среде, содержащей соевый гидролизат, содержащий орнитин или путресцин в желаемой концентрации (т. е. меньшей или составляющей 5,0 мг/л, например, от 0,5 мг/л до 5,0 мг/л, или от 0,5 мг/л до 2,0 мг/л), продуцируют белок представляющий интерес с улучшенным качеством, по сравнению с клетками, которые культивировали в среде, содержащей соевый гидролизат, содержащий орнитин или путресцин в концентрации больше чем 5 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, улучшенное качество белка измеряют посредством: наличие или отсутствие гликозилирования по одной или большему количеству аминокислот на белке интереса, количество гликанов на белке интереса, наличие сиаловой кислоты в одном или большем количестве сайтов гликозилирования на белке интереса, или их комбинация. Как применяется в данном документе, термин «улучшение качества», «повышение качества» или «высокое качество» белкового продукта может также относиться к более стабильному качеству, например, пост-трансляционным модификациям, наблюдаемым в партии продукта белкового биотерапевтического средства. Устойчивое качество включает в себя наличие, например, повторяемого желаемого профиля гликозилирования после повторяющихся этапов производства. Устойчивость, по отношению к качеству, относится к степени однородности и стандартизации, поскольку партии продукта из повторяемого производства по существу являются не подверженными вариациям.

[00086] В некоторых вариантах осуществления, белковый продукт (белок представляющий интерес) представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифичное антитело, биспецифичное антитело, антиген-связывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')2, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления, антитело

представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

[00087] В некоторых вариантах осуществления, антитело выбирают из группы, состоящей из: антитела к белку 1 программированной клеточной гибели (например, анти-PD1 антитело, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела к лиганду белка 1 программированной клеточной гибели (например, анти-PD-L1 антитела, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), анти-Dll4 антитела, анити-ангиопоетин-2 антитела (например, анти-ANG2 антитела, как описано в патенте США № 9402898), антитела к белку 3, подобному ангиопоетину (например, анти-AngPtl3 антитела, как описано в патенте США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, анти-PDGFR антитела, как описано в патенте США № 9265827), анти-Erb3 антитела, антитела к рецептору пролактина (например, анти-PRLR антитела, как описано в патенте США № 9302015), антитела к компоненту 5 комплемента (например, анти-C5 антитела, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0313194A1), анти-ФНО антитела, антитела к рецептору эпидермного фактора роста (например, анти-EGFR антитела, как описано в патенте США № 9132192, или анти-EGFRvIII антитела, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0259423A1), антитела к пропротеиновой конвертазе субтилизин/кексин 9 (например, анти-PCSK9 антитела, как описано в патенте США № 8062640 или в публикации заявки на патент США № US2014/0044730A1), антитела к фактору 8 роста и дифференциации (например, анти-GDF8 антитела, также известного как антитела к миостатину, как описано в патентах США № 8871209 или № 9260515), антитела к рецептору глюкагона (например, анти-GCGR антитела, как описано в публикациях заявок на патент США № US2015/0337045A1 или № US2016/0075778A1), анти-VEGF антитела, анти-IL1R антитела, антитела к рецептора интерлейкину 4 (например, анти-ИЛ4R антитела, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271681A1, или патентах США № 8735095 или № 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, анти-IL6R антитела, как описано в патентах США № 7582298, № 8043617 или № 9173880), анти-IL-1 антитела, анти-IL-2 антитела, анти-IL-3 антитела, анти-IL-4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL-6 антитела, анти-IL-7 антитела, антитела к интерлейкину 33 (например, анти-IL33 антитела, как описано в публикациях заявок на патент США № US2014/0271658A1 или № US2014/0271642A1), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, анти-RSV-антитела, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271653A1), антитела к кластеру дифференциации 3 (например, анти-CD3-антитела, как описано в публикациях заявок на патент США № US2014/0088295A1 и US20150266966A1, а также в заявке на патент США № 62/222605), антитела к кластеру дифференциации 20 (например, анти-CD20 антитела, как описано в публикациях заявок на патент США № US2014/0088295A1 и US20150266966A1, и в

патенте США № 7879984), анти-CD19 антитела, анти-CD28-антитела, антитела к кластеру дифференциации-48 (например, анти-CD48 антитела, как описано в патенте США № 9228014), анти-Fel d1 антитела (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, анти-MERC антитела, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0337029A1), антитела к вирусу Эбола (например, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к белку гена 3 активации лимфоцитов (например, анти-LAG-3-антитела или анти-CD223 антитела), антитела к фактору роста нервов (например, анти-NGF антитела, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0017029 и в патентах США № 8309088 и № 9353176), и антитела к активину A. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело выбирают из группы, состоящей из: анти-CD3 x анти-CD20 биспецифического антитела (как описано в публикациях заявок на патент США № US2014/0088295A1 и № US20150266966A1), анти-CD3-x анти-муцин 16 биспецифического антитела (например, анти-CD3 x анти-Muc16 биспецифического антитела), и анти-CD3 x анти-простатспецифический мембранный антиген биспецифического антитела (например, анти-CD3 x анти-PSMA биспецифического антитела). В некоторых вариантах осуществления, белок представляющий интерес выбирают из группы, состоящей из: алирокумаба, сарилумаба, фасинумаба, несвацумаба, дупилумаба, тревогрумаба, евинакумаба и ринакумаба. Все публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00088] В других вариантах осуществления, белок представляющий интерес представляет собой рекомбинантный белок, который содержит фрагмент Fc и другой домен, (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления, Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или большее количество внеклеточных доменов рецептора, соединенных с фрагментом Fc. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fc содержит шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления, рецепторный Fc-слитый белок содержит две или большее количество разных рецепторных цепей, которые связываются либо с одним лигандом, либо со множеством лигандов. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок-ловушку, такую как, например, ловушка ИЛ-1 (например, рилонацепт, который содержит лиганда-связывающую область ИЛ-1RAcP, слитую с внеклеточной областью ИЛ-1R1, слитую с Fc из hIgG1; смотрите патент США № 6927004, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме), ловушку VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлибирцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hIgG1; смотрите патенты США № 7087411 и № 7279159; или конберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитый с доменом 4 Ig рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hIgG1; смотрите патент США № 8216575), или ловушку ФНО (например, этанерцепт, который содержит

рецептор ФНО, слитый с Fc hIgG1, смотрите патент США № US-A-5610279). В других вариантах осуществления, Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или большее количество антиген-связывающих доменов, например фрагмент вариабельной тяжелой цепи и фрагмент вариабельной легкой цепи антитела, соединенного с фрагментом Fc.

[00089] Производство белка

[00090] Белок представляющий интерес может быть экспрессирован с помощью клетки-хозяина с использованием способов, известных специалистам в данной области техники. Как правило, любой белок представляющий интерес, пригодный для экспрессии в клетках млекопитающих, может быть произведен с помощью быстрых способов, однако гликопротеины будут особенно выгодны с данными способами. Например, в конкретных вариантах осуществления, белок представляющий интерес представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, биспецифическое антитело или его фрагмент, химерное антитело или его фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-тэггированный белок (например, белок-ловушку) или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент, или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент.

[00091] Гликопротеины с аспарагин-присоединенными (N-опосредованными) гликанами широко распространены в эукариотических клетках. Биосинтез таких гликанов и их перенос на полипептиды происходит в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Структуры N-гликанов дополнительно модифицируются рядом гликозидаз и гликозил-трансфераз в ЭР и комплексе Гольджи. Получение белка с использованием существующих способов направлено на улучшение постоянства желаемой структуры N-гликана с целью устранения иммуногенных эпитопов («гликотопов»). Детальный структурный анализ гликан-связанных белков может быть соотнесен с функциональными особенностями белка. Такой анализ, характеризующий гликозилирование белков, как правило, включает в себя несколько этапов: i) ферментативное или химическое высвобождение прикрепленных гликанов; ii) дериватизация освобожденных гликанов посредством восстановительного аминирования с помощью ароматических или алифатических аминов или перметилирования; iii) анализ гликанов. Многочисленные варианты анализа паттернов гликозилирования известны специалисту в данной области техники. Гликопротеины могут нести несколько видов гликоформ, занимающих различные сайты в определенных количествах, и поэтому их сложность может сделать трудным их воспроизведение в некоторых способах производства. Стабильность типа и количества гликоформ является измеримым и представляет собой желаемый результат для производства терапевтического белка.

[00092] Согласно данному изобретению показано, что получение многочисленных партий белка представляющего интерес культивированием с одной загрузкой или с периодической подпиткой, путем культивирования клеток, экспрессирующих белок представляющий интерес в среде, содержащей соевый гидролизат с определенными

концентрациями орнитина или путресцина, приводит к улучшению качества белков, которые производят, и улучшению постоянства от партии к партии. Таким образом, согласно другом аспекту данного изобретения, предложено множество партий белкового продукта, каждая из которых была произведена путем культивирования клеток в среде, содержащей отдельные партии соевого гидролизата, содержащие заранее определенное количество орнитина или путресцина. В некоторых вариантах осуществления, каждая партия соевого гидролизата, которую выбирают для использования в культивировании клеток, имеет концентрацию 0,67 мг орнитина или путресцина на г сои или меньше, в частности, от 0,0067 мг до 0,67 мг орнитина или путресцина на г сои, или от 0,0067 до 0,27 мг орнитина или путресцин на г сои.

[00093] В других вариантах осуществления, концентрация орнитина или путресцина в среде для культивирования клеток, содержащей соевый гидролизат, находится в диапазоне от 0,5 мг/л до 4,5 мг/л, 0,5 мг/л до 4,0 мг/л, 0,5 мг/л до 3,5 мг/л, 0,5 мг/л до 3,0 мг/л, 0,5 мг/л до 2,5 мг/л, 0,5 мг/л до 2,0 мг/л, 0,5 мг/л до 1,5 мг/л или 0,5 мг/л до 1,0 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация орнитина или путресцина в среде для культивирования клеток, содержащей соевый гидролизат, находится в диапазоне от 1,0 мг/л до 5,0 мг/л, 1,5 мг/л до 5,0 мг/л, 2,0 мг/л до 5,0 мг/л, 2,5 мг/л до 5,0 мг/л, 3,0 мг/л до 5,0 мг/л, 3,5 мг/л до 5,0 мг/л, 4,0 мг/л до 5,0 мг/л или 4,5 мг/л до 5,0 мг/л.

[00094] В конкретных вариантах осуществления, среда для культивирования клеток, содержащая соевый гидролизат, содержит орнитин или путресцин в количестве 0,5 мг/л, 0,6 мг/л, 0,7 мг/л, 0,8 мг/л, 0,9 мг/л, 1,1 мг/л, 1,2 мг/л, 1,3 мг/л, 1,4 мг/л, 1,5 мг/л, 1,6 мг/л, 1,7 мг/л, 1,8 мг/л, 1,9 мг/л, 2,0 мг/л, 2,1 мг/л, 2,2 мг/л, 2,3 мг/л, 2,4 мг/л, 2,5 мг/л, 2,6 мг/л, 2,7 мг/л, 2,8 мг/л, 2,9 мг/л, 3,0 мг/л, 3,1 мг/л, 3,2 мг/л, 3,3 мг/л, 3,4 мг/л, 3,5 мг/л, 3,6 мг/л, 3,7 мг/л, 3,8 мг/л, 3,9 мг/л, 4,0 мг/л, 4,1 мг/л, 4,2 мг/л, 4,3 мг/л, 4,4 мг/л, 4,5 мг/л, 4,6 мг/л, 4,7 мг/л, 4,8 мг/л, 4,9 мг/л, или 5,0 мг/л.

[00095] В других вариантах осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии среды, содержащей соевый гидролизат, составляет не больше чем 5,0 мг/л. В еще других вариантах осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии среды, содержащей соевый гидролизат, составляет не больше чем 2,0 мг/л. В другом варианте осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии среды, содержащей соевый гидролизат, составляет не больше чем 1,8 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии среды, содержащей сою, составляет от 0,5 мг/л до 5,0 мг/л. В еще других вариантах осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии среды, содержащей соевый гидролизат, находиться диапазоне от 0,5 мг/л до 2,0 мг/л. В еще другом варианте осуществления, желаемая концентрация орнитина или путресцина в партии среды, содержащей соевый гидролизат, находиться диапазоне от 0,5 мг/л до 1,8 мг/л.

[00096] В некоторых вариантах осуществления, качество белка представляющего

интерес или количество определенных гликанов, получаемых в каждой партии белкового продукта из множества партий белкового продукта, улучшаются по сравнению с белковым продуктом, полученным способом, включающим в себя культивирование клеток в среде, дополненной соевым гидролизатом, содержащим орнитин или путресцин в концентрации большей чем 5 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, улучшенное качество белка, демонстрируемое каждой партией белкового продукта, измеряют посредством: наличие или отсутствие гликозилирования по одной или большему количеству аминокислот на белке интереса, количество гликанов на белке интереса, наличие сиаловой кислоты в одном или большем количестве сайтов гликозилирования на белке интереса, или их комбинация. В одном варианте осуществления, качество белка соответствует статусу гликозилирования отдельных членов популяции белков, продуцируемых в культуре. В некоторых вариантах осуществления, качество улучшают путем варьирования гликозилирования на отдельных гликопротеинах популяции белков, продуцируемых в культуре, посредством культивирования клеток в среде с соевым гидролизатом, содержащем концентрацию 5,0 мг/л или меньше орнитина или путресцина, от 0,5 мг/л до 5,0 мг/л путресцина или орнитина, или от 0,5 мг/л до 2,0 мг/л путресцина или орнитина.

[00097] В одном варианте осуществления, качество белка определяют путем сравнения содержания по меньшей мере одной молекулы гликана в каждой партии белков из множества партий белкового продукта, с содержанием той же молекулы (молекул) гликана в другой партии белков. Термин «содержание», как применяется в данном документе, относится к доле белков, содержащих конкретную молекулу гликана в конкретной партии продукта, или количеству белков, содержащих конкретную молекулу гликана по отношению к количеству всех типов молекул гликана в партии продукта. В некоторых вариантах осуществления, молекулу гликана выбирают из группы, состоящей из A1, A2, A1F, A2F, man5, NA2, NA2F, NA2G1, NA2G1F, NGA2 и NGA2FI. В конкретном варианте осуществления, молекула гликана представляет собой A1 (например, Пик 11 на Фиг. 2).

[00098] Белки интереса, полученные с помощью способов культивирования клеток рассматриваемого в данный момент изобретения, демонстрируют подходящие характеристики качества. Качество белка может быть оценено, например, с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например слабой катионообменной хроматографией, капиллярным изоэлектрическим фокусированием, гель-хроматографией, высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), ИФА, и/или анализом вестерн-блоттинг. В некоторых вариантах осуществления, качество белка оценивают с помощью масс-спектрометрии, например, капиллярным электрофорезом с масс-спектрометрей (CE-MS). В конкретных вариантах осуществления, качество белка определяют путем сравнения результатов масс-спектрометрии для каждой партии белков из множества партий белкового продукта.

[00099] Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с

флуоресцентным обнаружением, выполненная для иллюстративных полученных партий, показывает, что белки интереса (гликопротеины), полученные из клеток, культивируемых в среде, содержащей соевый гидролизат с орнитином или путресцином в количестве от 0,5 мг/л до 5,0 мг/л, имеют более стабильную экспрессию гликанов и паттерны гликозилирования, как показано в Таблицах 2-4, в данном документе.

[000100] Профилирование олигосахаридов

[000101] Степень и распределение специфических N-опосредованных углеводных цепей на гликопротеинах могут быть установлены путем профилирования олигосахаридов. В одном варианте осуществления, гликопротеин дегликозилируют пептидом:N-гликозидаза F (PNGase F), чтобы расщепить и удалить N-опосредованные олигосахариды из боковых цепей аспарагина. Олигосахариды затем дериватизируют флуоресцентным реагентом, таким как антраниловая кислота. Углеводные цепи затем разделяют с помощью обычной фазовой анионообменной ВЭЖХ и детектируют с помощью детектора флуоресценции, получая хроматограмму ВЭЖХ.

[000102] В другом варианте осуществления, как часть общего анализа охарактеризования углеводов, выделяют отдельные гликопептиды после расщепления трипсином восстановленного и алкилированного гликопротеина. Отдельные триптические гликопептиды разделяют ВЭЖХ с обращенной фазой, в сочетании с последующим прогоном через колонку C18 для увеличения разрешения по мере необходимости. Олигосахариды высвобождают из каждого отделенного гликопептида с помощью расщепления PNGase F, дериватизируют антраниловой кислотой, и анализируют с помощью флуоресцентной ВЭЖХ с получением сайта-специфического олигосахаридного профиля гликопротеина. В одном варианте осуществления, в котором гликопротеин представляет собой рилонацепт (SEQ ID NO: 1), остатки аспарагина в N37, N87, N91, N98, необязательно N176, N189, N279, N418, N511, N551, N567, N581, N615 и N730, являются гликозилированными. В одном варианте осуществления, любой один или большее количество остатков N37, N98, N418, N511 рилонацепта (позиции остатков, сопоставленные с SEQ ID NO: 1) содержат олигосахарид A1. В одном варианте осуществления, в котором гликопротеин представляет собой афлиберцепт (SEQ ID NO: 2), остатки аспарагина N36, N68, N123, N196 и N282 являются гликозилированными. В одном варианте осуществления, любой один или оба остатка N123 и N196 афлиберцепта (позиции остатков, сопоставленные с SEQ ID NO: 2) содержат олигосахарид A1.

[000103] В другом варианте осуществления, совокупность олигосахаридов из гликопротеина получают дегликозилированием белков с помощью PNGase F, с последующей кислотной дериватизацией антраниловой кислотой, и последующей твердофазной экстракцией (SPE). Массы олигосахаридов затем измеряют с помощью MALDI-TOF в отрицательном линейном режиме с 2,4,6-тригидроацетофеноном (THAP) в качестве матрицы.

[000104] Каждую наблюдаемую массу ставят в соответствие с уникальной структурой олигосахарида исходя из масс, обычно наблюдаемых для N-опосредованных

гликанов в рекомбинантных белках. Ожидаемые присвоения масс для всех пиков подытожены в Таблице 1. Ожидаемые массы представляют собой среднюю массу, вычисляемую на основе предложенных структур N-опосредованных углеводных цепей с добавлением массы остатка антраниловой кислоты. Моносахаридные композиции также приведены на основе предположенных структур N-опосредованных углеводных цепей.

[000105] В другом варианте осуществления, количественный анализ характерных олигосахаридов с использованием капиллярного электрофореза применяют для охарактеризования структуры N-гликанов (олигосахаридов) исследуемого гликопротеина. Гликопротеин денатурирует и затем дегликозилируют путем обработки с помощью PNGase F. Высвобожденные олигосахариды затем выделяют путем осаждения после удаления белка. Выделенные совокупности олигосахаридов метят флуорофором 8-аминопирен 1,3,6-трисульфонат (APTS). Меченые олигосахариды затем разделяют с помощью капиллярного электрофореза и оценивают с помощью индуцированного лазером детектора флуоресценции, используя длину волны возбуждения 488 нм и длину волны эмиссии 520 нм.

[000106] Получают электрофореграмму, как показано на Фиг. 2 для гликопротеина афлиберцепта, причем все исчисляемые пики нумеруют (в общей сложности 21 пик в данном примере). Определяют полную интегрированную площадь пика (общая площадь пика) для характерных олигосахаридов. Относительное количество каждого олигосахарида может быть определено путем деления площади пика для данного конкретного олигосахарида (например, площадь пика A1) на совокупную площадь пиков.

[000107] В некоторых вариантах осуществления, качество исследуемого гликопротеина оценивают путем определения уровня сиалилирования (количество сиаловых остатков на одном гликопротеине) или фукозилирования (количество остатков фукозы на одном гликопротеине). В одном варианте осуществления, общее количество сиаловых кислот на гликопротеине определяют путем использования количественного анализа ВЭЖХ. В данном анализе, сиаловые кислоты высвобождают из гликопротеина путем использования мягкого кислотного гидролиза, затем дериватизируют о-фенилендиамином, разделяют с помощью ВЭЖХ и детектируют либо с помощью УФ, либо детекторов флуоресценции. Количество сиаловой кислоты может быть оценено относительно стандартной кривой с использованием, например, сиалиллактозы. Содержание сиаловой кислоты рассчитывают из молей высвобожденной сиаловой кислоты и молей используемого гликопротеина в реакции.

[000108] В одном варианте осуществления, содержание сиаловой кислоты в гликопротеине рилонацепте составляет около 30-70 молей сиаловой кислоты на 1 моль гликопротеина (моль/моль), около 35-65 моль/моль, 30 моль/моль, 31 моль/моль, 32 моль/моль, 33 моль/моль, 34 моль/моль, 35 моль/моль, 36 моль/моль, 37 моль/моль, 38 моль/моль, 39 моль/моль, 40 моль/моль, 41 моль/моль, 42 моль/моль, 43 моль/моль, 44 моль/моль, 45 моль/моль, 46 моль/моль, 47 моль/моль, 48 моль/моль, 49 моль/моль, 50 моль/моль, 51 моль/моль, 52 моль/моль, 53 моль/моль, 54 моль/моль, 55 моль/моль, 56

моль/моль, 57 моль/моль, 58 моль/моль, 59 моль/моль, 60 моль/моль, 61 моль/моль, 62 моль/моль, 63 моль/моль, 64 моль/моль, 65 моль/моль, 66 моль/моль, 67 моль/моль, 68 моль/моль, 69 моль/моль, или 70 моль/моль.

[000109] В одном варианте осуществления, содержание сиаловой кислоты в гликопротеине афлиберцепте составляет около 5-15 молей сиаловой кислоты на 1 моль гликопротеина (моль/моль), около 8-12 моль/моль, 4 моль/моль, 5 моль/моль, 6 моль/моль, 7 моль/моль, 8 моль/моль, 9 моль/моль, 10 моль/моль, 11 моль/моль, 12 моль/моль, 13 моль/моль, 14 моль/моль, 15 моль/моль, 16 моль/моль, 17 моль/моль, 18 моль/моль, 19 моль/моль, или 20 моль/моль.

[000110] В одном варианте осуществления, олигосахаридное профилирование используют для определения степени и распределения сиалилирования N-опосредованных углеводных цепей на гликопротеине. Гликопротеин дегликозилируют с помощью PNGase F, и затем дериватизируют флуоресцентным реагентом - антраниловой кислотой. Олигосахариды затем разделяют с помощью обычной фазовой анионообменной ВЭЖХ и детектируют с помощью детектора флуоресценции для получения хроматограммы ВЭЖХ олигосахаридного профиля. Число Z (которое является мерой средней степени сиалилирования) для гликопротеина вычисляют по следующей формуле:

[000111] (OS A*O)+(ISA*111-(2SA*2)+(3SA*3)+...(nSA*n)1/(OSA+15A+2SA+35A+..n5A)

[000112] Для того, чтобы определить число Z, интегрируют площадь каждого пика из олигосахаридного профиля. Совокупное количество сиаловой кислоты рассчитывают, как сумму площадей 0 сиаловой кислоты/пиков цепей, умноженное на 0, 1 сиаловой кислоты/пиков цепей, умноженное на 1, 2 сиаловой кислоты/пиков цепей, умноженное на 2, 3 сиаловой кислоты/пиков цепей, умноженное на 3, и т. д. Совокупное число углеводных цепей получают как сумму площадей всех пиков. Число Z является совокупной площадью сиаловой кислоты, разделенной на совокупную площадь углеводных цепей.

[000113] В одном варианте осуществления, Z число сиаловой кислоты гликопротеина рилонацепта составляет около 1,3-1,6, 1,4-1,5, 1,41-1,48, 1,3, 1,31, 1,32, 1,33, 1,34, 1,35, 1,36, 1,37, 1,38, 1,39, 1,4, 1,41, 1,42, 1,43, 1,44, 1,45, 1,46, 1,47, 1,48, 1,49, 1,5, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59 или 1,60.

[000114] В одном варианте осуществления, Z число сиаловой кислоты гликопротеина афлиберцепта составляет около 0,5-2, 1-1,5, 1-1,2, 0,5, 0,51, 0,52, 0,53, 0,54, 0,55, 0,56, 0,57, 0,58, 0,59, 0,6, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64, 0,65, 0,66, 0,67, 0,68, 0,69, 0,7, 0,71, 0,72, 0,73, 0,74, 0,75, 0,76, 0,77, 0,78, 0,79, 0,8, 0,81, 0,82, 0,83, 0,84, 0,86, 0,87, 0,88, 0,89, 0,9, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99, 1, 1,01, 1,02, 1,03, 1,04, 1,05, 1,06, 1,07, 1,08, 1,09, 1,1, 1,11, 1,12, 1,13, 1,14, 1,15, 1,16, 1,17, 1,18, 1,19, 1,2, 1,21, 1,22, 1,23, 1,24, 1,25, 1,26,, 1,27, 1,28, 1,29, или 1,3.

Примеры

[000115] Следующие примеры предложены для того, чтобы обеспечить

возможностью обычного специалиста в данной области техники осуществлять и использовать способы и композиции, описанные в данном документе, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т. д.), но нужно учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температуру представлена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1: Скрининг соевого гидролизата для определения концентрации аминокислот.

[000116] Взвешивали образец соевого гидролизата и его 20 граммовую порцию разводили в 1 л воды до стоковой концентрации 20 г/л. Полученный раствор соевого гидролизата затем дополнительно разбавляли водой до желаемой концентрации для использования в клеточном культивировании, и молекулярный состав полученного раствора соевого гидролизата определяли с помощью хроматографии.

[000117] Концентрацию аминокислот в образце соевого гидролизата измеряли с помощью хроматографии на ионнообменной колонке с последующим обнаружением нингидрином. Смотрите, например, Moore and Stein. J. Biol. Chem. (1954) Vol. 211 pp. 907-913. Образцы соевого гидролизата разбавляли, чтобы обеспечить чувствительное разделение и разрешение отдельных пиков (аминокислот) при элюирование из колонки ВЭЖХ и сравнение со стандартом. Каждую площадь пика на хроматограмме, как показано на Фиг. 1А и 1В, сравнивали со стандартом, чтобы определить концентрации каждого элюата.

[000118] Для того, чтобы определить, содержит ли партия порошка соевого гидролизата меньше чем 0,67 миллиграмма орнитина или путресцина на грамм сои, хроматограмму каждого репрезентативного образца сравнивают с стандартом. Например, на Фиг. 1А показана партия соевого гидролизата с элюатом, содержащим орнитин с временем удерживания 89,02, который показывает площадь пика, эквивалентную 1,57 мг орнитина на г сои, по сравнению со стандартом. Фиг. 1В иллюстрирует партию соевого гидролизата, содержащую количество орнитина меньше чем 0,67 мг орнитина на г сои. Отбирали партии соевого гидролизата с от 0,067 и до 0,67 мг орнитина на г сои для использования в способах культивирования клеток для получения биотерапевтических белков с более стабильным от партии к партии гликозилированием белка. Однако, партии соевого гидролизата, содержащие орнитин в концентрации большей чем меньшей чем 0,67 мг орнитина на г сои, были использованы в дальнейших экспериментах, как описано ниже, чтобы определить влияние концентрации орнитина в соевом гидролизате на производство белка.

Пример 2: Экспрессия и профиль гликозилирования белка представляющего интерес.

[000119] Клетки CHO, экспрессирующие белок-ловушку (гибридный белок рецептор-Fc, ловушка VEGF) культивировали в коммерческой среде, содержащей соевый гидролизат, содержащий различные количества орнитина, путресцина и цитруллина, или их комбинации, для того, чтобы определить, какие аминокислотные компоненты влияют на качество производимых белков. Таблица 2 демонстрирует, что уровни орнитина в гидролизате отрицательно коррелируют с качеством партий белкового продукта, на что указывает увеличенная площадь под кривой ключевого N-гликана партий полученного белка, что является результатом культивирования клеток CHO в среде, дополненной соевым гидролизатом, содержащим орнитин в концентрации меньше чем 5,0 мг/л в независимости от концентрации цитруллина.

[000120] Как показано в Таблице 2 и изображено на Фиг. 3, партии белкового продукта - ловушки VEGF, продуцируемого клетками, которые культивируют в среде, содержащей соевый гидролизат с концентрацией орнитина 2,0 мг/л или меньше, дают белковый продукт более высокого качества по сравнению с клетками, культивируемыми в среде, содержащей больше чем 5,0 мг/л орнитина, цитруллина или путресцина.

Таблица 2:

Соевые концентрации аминокислот	Относительное количество N-гликана A1 (% площадь под кривой)
1,6 мг/л орнитина	12,5
6,6 мг/л орнитина	9,8
31,6 мг/л орнитина	9,3
36,6 мг/л путресцина	9,0
1,6 мг/л орнитина 0 мг/л цитруллина	12,0
1,6 мг/л орнитина 30 мг/л цитруллина	11,5
31,6 мг/л орнитина 0 мг/л цитруллина	8,8

[000121] Детальный анализ гликанов проводили с использованием хроматографии на основе известных способов ВЭЖХ и флуоресцентных тэгов антраниловой кислоты (AA) (Anumula, and Dhume, Glycobiology (1998) 8(7) pp. 685-694) для каждой партии гликопротеина, чтобы определить, оказывает ли орнитин влияние на профили гликозилирования белков. Как показано в Таблице 3, культивирование клеток в среде, содержащей соевый гидролизат, содержащий меньше чем или равно меньше чем 0,67 мг орнитина на г сои, приводит к более стабильному от партии к партии производству белка. Более конкретно, примерно 90% партий продукта, при культивировании в среде, содержащей отобранный соевый гидролизат, соответствуют критериям FDA по производству. В противоположность этому, только 57% партий продукта, при культивировании в среде, содержащей соевый гидролизат, содержащий больше чем 5 мг/л орнитина, соответствуют критериям FDA по производству (площадь под кривой для конкретного пика N-гликана). Как показано в Таблице 3, партии белкового продукта - ловушки VEGF, полученного с помощью клеток, которые культивировали в среде, содержащей соевый гидролизат с концентрацией орнитина 0,67 мг на г сои или меньше,

показывают улучшенное качество продукта и более стабильное от партии к партии качество.

Таблица 3:

мг орнитина на г сои	Партии с количеством гликана больше чем 10,5% (параметр качества)	Приемлемые партии белкового продукта	Неудачные партии белкового продукта
≤ 0,67	21	19/21	2/21
> 0,67	4	4/7	3/7

[000122] Каждую партию продукта также сравнивали (относительно гликанового профиля) с стандартом, который представляет собой терапевтически приемлемую партию белка иллюстративного белка-ловушки VEGF. Типичный анализ гликанов представлен в Таблице 4 для партий белка, полученных из клеток, которые культивировали в среде, дополненной соевым гидролизатом, обеспечивая конечную концентрацию орнитина между 0,5 мг/л и 2,0 мг/л. По сравнению с стандартом, каждый произведенный белок-ловушка содержит стабильный гликановый профиль, имеющий пики в пределах допустимого диапазона (проанализировано 75% лотов). В противоположность этому, каждая партия, полученная из клеток, культивируемых в среде, дополненной соевым гидролизатом, содержащим боьше чем 5,0 мг/л орнитина, не соответствовала критерию приемлемости FDA. Как показано в Таблице 4, партии белкового продукта, полученные культивированием клеток в среде, содержащей соевый гидролизат с концентрацией орнитина от 0,5 мг/л до 2,0 мг/л или меньше, представляют партии более высокого качества, как продемонстрировано уровнями N-гликана A1, и соответствуют критерию приемлемости продукта, в отличие, когда клетки культивируют в среде, содержащей больше соевого гидролизата, имеющего концентрацию орнитина больше чем 5,0 мг/л.

Таблица 4:

Гликан	A2	A2F	A1	A1F	NGA2F	NA2G1F	NA2	NA2F	орнитин (мг/л)
Критерий приемле-мости партии продукта (% площади под кривой)	4-9	10-23	10-17	11-19	5-17	8-13	4-11	2-8	———
Партия соевого гидролизата	6,4	15,2	12,5	14,1	9,9	9,6	6,7	4,4	1,8

№ 1									
Партия соевого гидролизата № 2	7,0	16,8	13,2	13,9	9,6	9,9	6,7	4,1	0,5
Партия соевого гидролизата № 3	7,0	18,5	11,9	13,5	9,5	10,2	5,9	4	1,5
Партия соевого гидролизата № 4	9,7	18,1	14,7	11,0	8,5	9,5	5,5	3,6	0,6
Партия соевого гидролизата № 5	6,0	16,6	9,8	13,5	11,6	9,9	5,8	4,3	13,6
Партия соевого гидролизата № 6	5,6	15,7	9,2	14,2	12,1	10,5	6,3	4,5	28,6

[000123] Фиг. 4 демонстрирует сильную отрицательную корреляцию между уровнем орнитина в соевом гидролизате и качеством гликопротеина (афлиберцепт), как показано с помощью уровней N-гликана A1.

Пример 3: Титр продуцируемого гликопротеина

[000124] 16 партий соевого гидролизата были протестированы на их способность влиять на метаболомику производства рилонацепта клетками CHO. Примерно 426 аналитов соевого гидролизата были измерены и сравнены с конечным титром гликопротеина и метаболизмом лактата. Фиг. 5 иллюстрирует лоудинг графики (loading plots) корреляций между аналитами соевого гидролизата и максимальным лактатом и конечным титром гликопротеина. Результаты определения титра лактата и гликопротеина демонстрируют отрицательную корреляцию орнитина в соевом гидролизате.

Пример 4: Маркерное подтверждение с помощью исследования методом добавок

[000125] Фиг. 6A и 6B иллюстрируют клеточные культуры CHO исходя из контрольной среды и условий питания, которые получили добавку либо орнитина, либо путресцина, чтобы продемонстрировать эффект орнитина и путресцина, соответственно, на рост клеток и гликозилирование. Таблица 6B указывает на эффект на пик 11, который

особенно заметен.

[000126] Имея описанные варианты осуществления данного изобретения с ссылкой на прилагаемые графические материалы, следует понимать, что изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, и что различные изменения и модификации могут быть в них внесены специалистами в данной области техники без отхода от объема или духа данного изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ, включающий в себя:

культивирование популяции клеток, экспрессирующих рекомбинантный гетерологичный гликопротеин, в клеточной культуральной среде, содержащей соевый гидролизат, с целью получения рекомбинантного гетерологичного гликопротеина, и при этом соевый гидролизат содержит ≤ 0,067% (мас./мас.) орнитина или путресцина.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную популяцию клеток получают путем клональной экспансии клеток, экспрессирующих рекомбинантный гетерологичный гликопротеин.

3. Способ по любому из пп. 1-2, отличающийся тем, что указанный соевый гидролизат содержит 0,003% - 0,027% (мас./мас.) орнитина или путресцина.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанная культуральная среда содержит ≤ 5 мг/л орнитина или путресцина.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанная культуральная среда содержит 0,6-3 мг/л орнитина или путресцина.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанный гликопротеин представляет собой молекулу-ловушку.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанную молекулу-ловушку выбирают из группы, состоящей из этанерцепта, рилонацепта и афлиберцепта.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный гликопротеин содержит N-гликан A1 и, по меньшей мере, один другой вид N-гликана, при этом относительное количество N-гликана A1 составляет ≥ 10% (мас./мас.) от общего количества видов N-гликана гликопротеина.

9. Способ, включающий в себя:

культивирование клетки, экспрессирующей гликозилированный белок, в среде для культивирования клеток для получения гликопротеина;

очистку гликозилированного белка;

анализ очищенного гликозилированного белка на характерные олигосахариды;

определение относительного количества N-гликана A1 по отношению к общему количеству видов N-гликана гликопротеина; и

выбор соевого гидролизата, который обеспечивает, по меньшей мере, 10% (мас./мас.) N-гликана A1 по отношению к общему количеству видов N-гликана гликопротеина.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что выбранный соевый гидролизат содержит ≤ 0,067% (мас./мас.) орнитина или путресцина.

11. Способ по п. 9 или 10, отличающийся тем, что выбранный соевый гидролизат содержит 0,003% - 0,027% (мас./мас.) орнитина или путресцина.

12. Способ по любому из пп. 9-11, отличающийся тем, что указанная культуральная среда содержит 0,6-3 мг/л орнитина или путресцина.

13. Способ по любому из пп. 9-12, отличающийся тем, что указанный

гликопротеин представляет собой молекулу-ловушку.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанную молекулу-ловушку выбирают из группы, состоящей из этанерцепта, рилонацепта и афлиберцепта.

15. Способ по любому из пп. 9-14, отличающийся тем, что указанный гликопротеин содержит 8-12 молей сиаловой кислоты на моль гликопротеина, или 35-65 молей сиаловой кислоты на моль гликопротеина.

16. Способ выбора соевого гидролизата для использования в производстве гликопротеина, причем способ включает в себя:

измерение количества орнитина или путресцина в соевом гидролизате;

выбор соевого гидролизата с ≤ 0,067% (мас./мас.) орнитина или путресцина; и

смешивание выбранного соевого гидролизата с дополнительным ингредиентом для формирования среды для культивирования клеток с ≤ 5 мг/л орнитина или путресцина.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что выбранный соевый гидролизат содержит 0,003% - 0,027% (мас./мас.) орнитина или путресцина.

18. Способ по п. 16 или 17, отличающийся тем, что указанная культуральная среда содержит 0,6-3 мг/л орнитина или путресцина.

19. Способ по любому из пп. 16-18, отличающийся тем, что указанный гликопротеин представляет собой молекулу-ловушку.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанную молекулу-ловушку выбирают из группы, состоящей из этанерцепта, рилонацепта и афлиберцепта.

21. Способ по любому из пп. 16-20, отличающийся тем, что указанный гликопротеин содержит N-гликан A1 и, по меньшей мере, один другой вид N-гликана, при этом относительное количество N-гликана A1 составляет ≥ 10% (мас./мас.) от общего количества видов N-гликана гликопротеина.

22. Гликопротеин, содержащий N-гликан A1 и, по меньшей мере, один другой вид N-гликана, в котором относительное количество N-гликана A1 составляет, по меньшей мере, 10% (мас./мас.) от общего количества N-гликанов указанного гликопротеина.

23. Гликопротеин по п. 22, отличающийся тем, что указанный гликопротеин представляет собой молекулу-ловушку.

24. Гликопротеин по п. 23, отличающийся тем, что указанную молекулу-ловушку выбирают из группы, состоящей из этанерцепта, рилонацепта и афлиберцепта.

25. Гликопротеин по п. 22, отличающийся тем, что указанный гликопротеин дополнительно содержит N-гликан A2, N-гликан A2F, N-гликан A1F, N-гликан NGA2F, N-гликан NA2G1F, N-гликан NA2, и N-гликан NA2F.

26. Гликопротеин по любому из пп. 22-25, отличающийся тем, что относительное количество N-гликана A1 определяют путем сравнения площади под пиком N-гликана A1 с суммой площадей под пиком для всех N-гликанов характерного паттерна олигосахаридов, полученного с помощью капиллярного электрофореза.

27. Гликопротеин по любому из п. 22-26, отличающийся тем, что относительное количество N-гликана A1 составляет 10%-17% (мас./мас.).

28. Гликопротеин по п. 24, отличающийся тем, что указанный гликопротеин представляет собой рилонацепт с 35-65 молями сиаловой кислоты на моль гликопротеина.

29. Гликопротеин по п. 28, отличающийся тем, что рилонацепт содержит N-гликан A1 на любом одном или большем количестве аминокислотных остатков N37, N98, N418, и N511 SEQ ID NO: 1.

30. Гликопротеин по п. 24, отличающийся тем, что указанный гликопротеин представляет собой афлиберцепт с 8-12 молями сиаловой кислоты на моль гликопротеина.

31. Гликопротеин по п. 30, отличающийся тем, что афлиберцепт содержит N-гликан A1 на любом одном или большем количестве аминокислотных остатков N123 и N196 SEQ ID NO: 2.

32. Способ, включающий в себя:

ферментативное расщепление соевого экстракта в свободной от остатков реакционной емкости для производства соевого гидролизата;

измерение количества орнитина или путресцина в соевом гидролизате; и

выбор соевого гидролизата с $\leq$ 0,067% (мас./мас.) орнитина или путресцина для использования в среде для культивирования клеток.

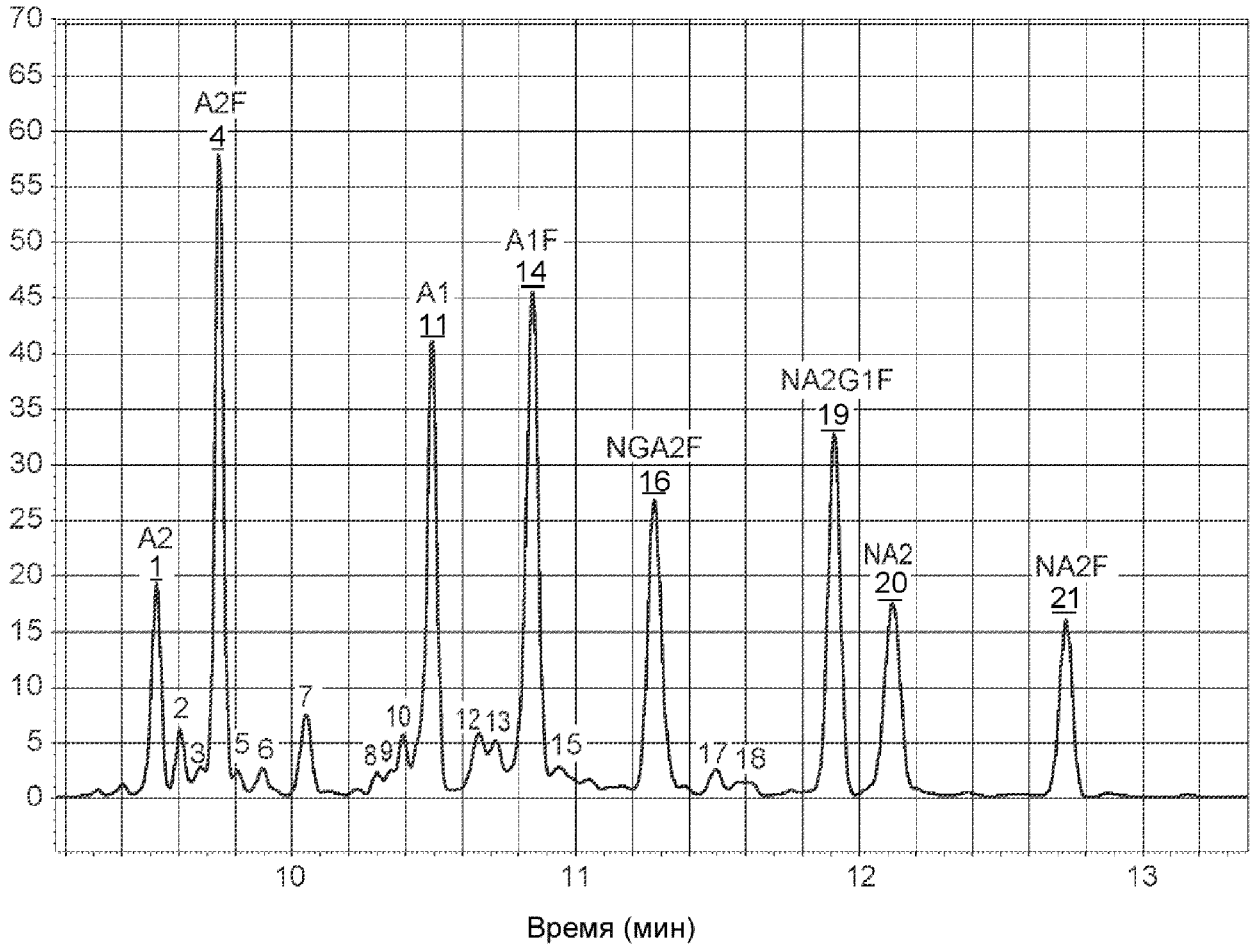
По доверенности

Фиг. 1

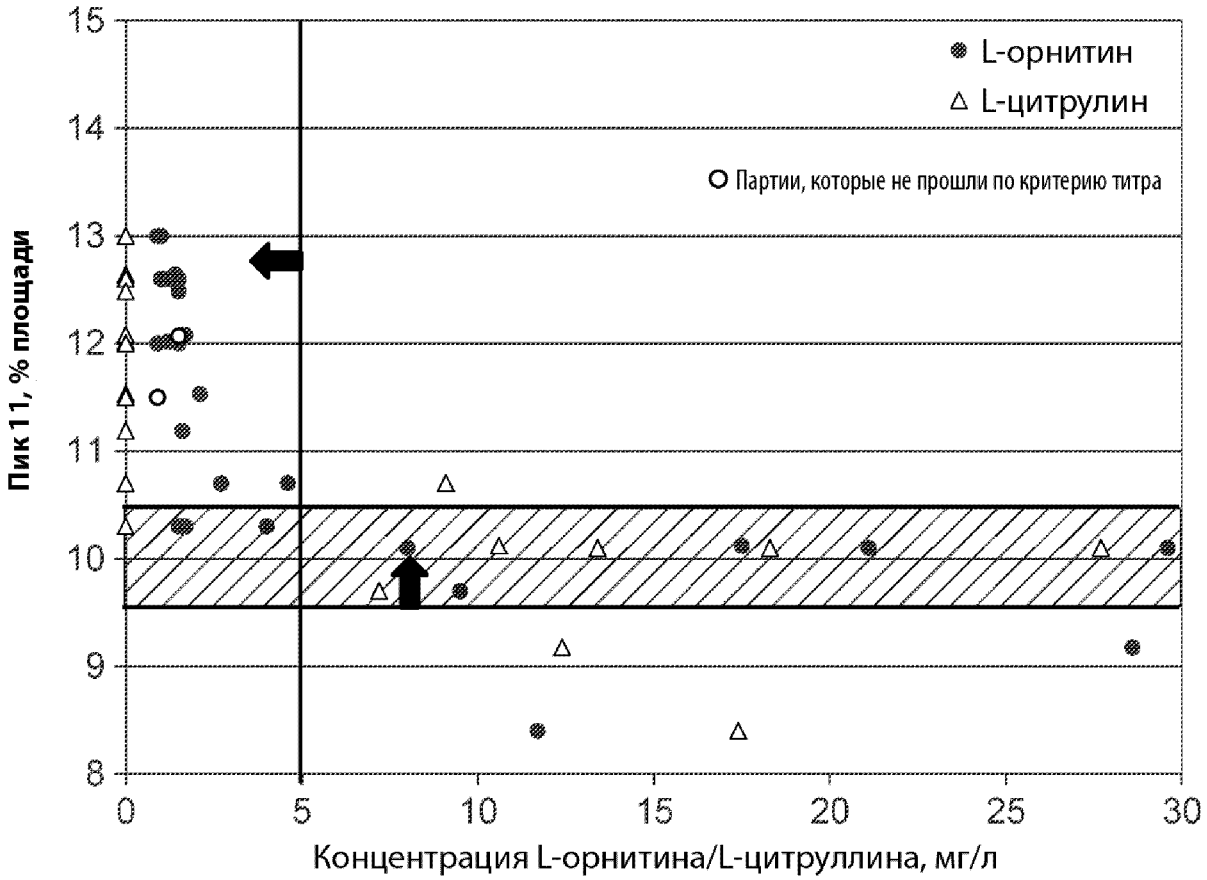
Панель А

Панель Б

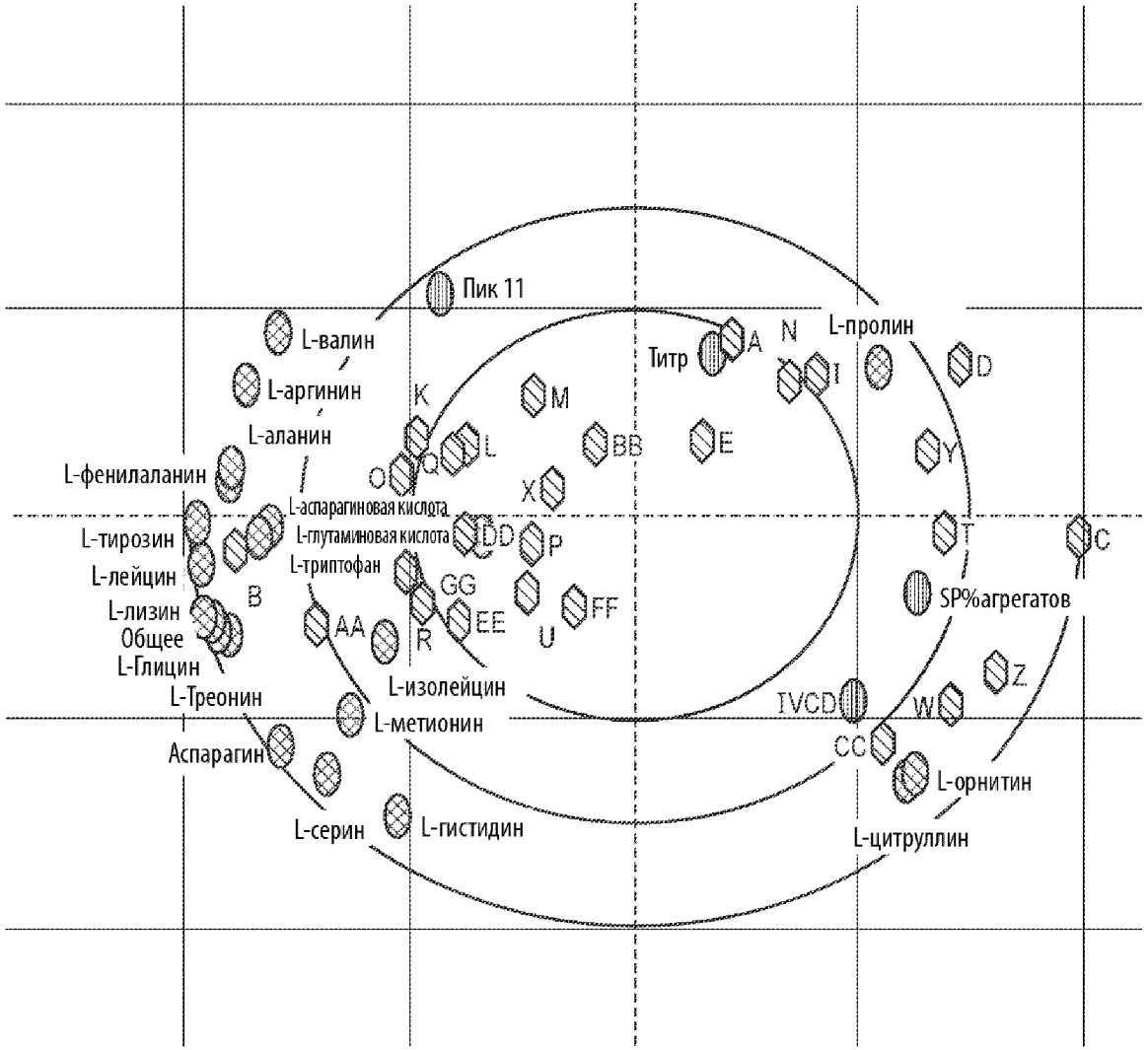
Фиг. 2


70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
A2F
4
A1F
14
A1
11
NA2G1F
19
NGA2F
16
A2
1
NA2
20
NA2F
21
2
3
5
6
7
8
9
10
12
13
15
17
18
10
11
12
13
Время (мин)

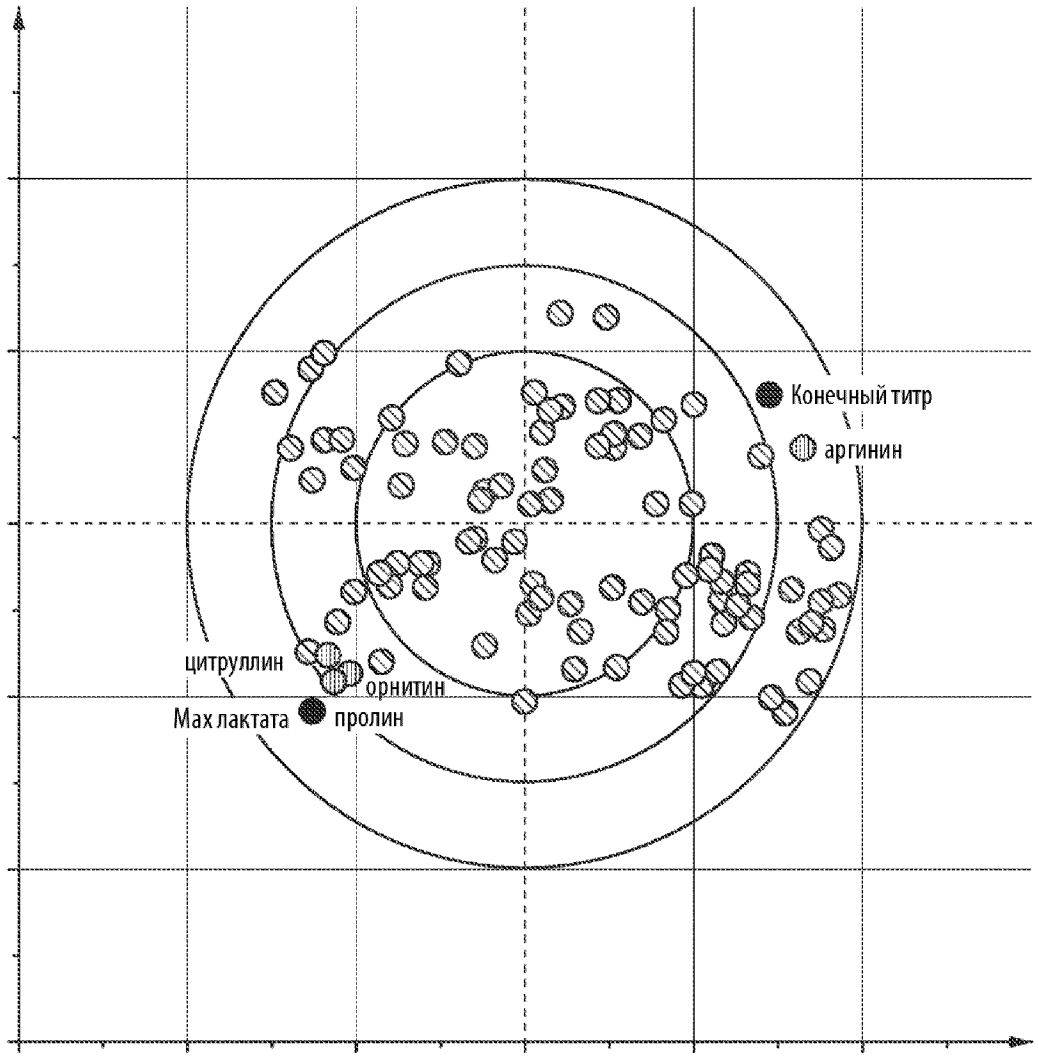
Фиг. 3


L-орнитин
L-цитрулин
Партии, которые не прошли по критерию титра
Пик 11, % площади
Концентрация L-орнитина/L-цитруллина, мг/л
15
14
13
12
11
10
9
8
0
5
10
15
20
25
30

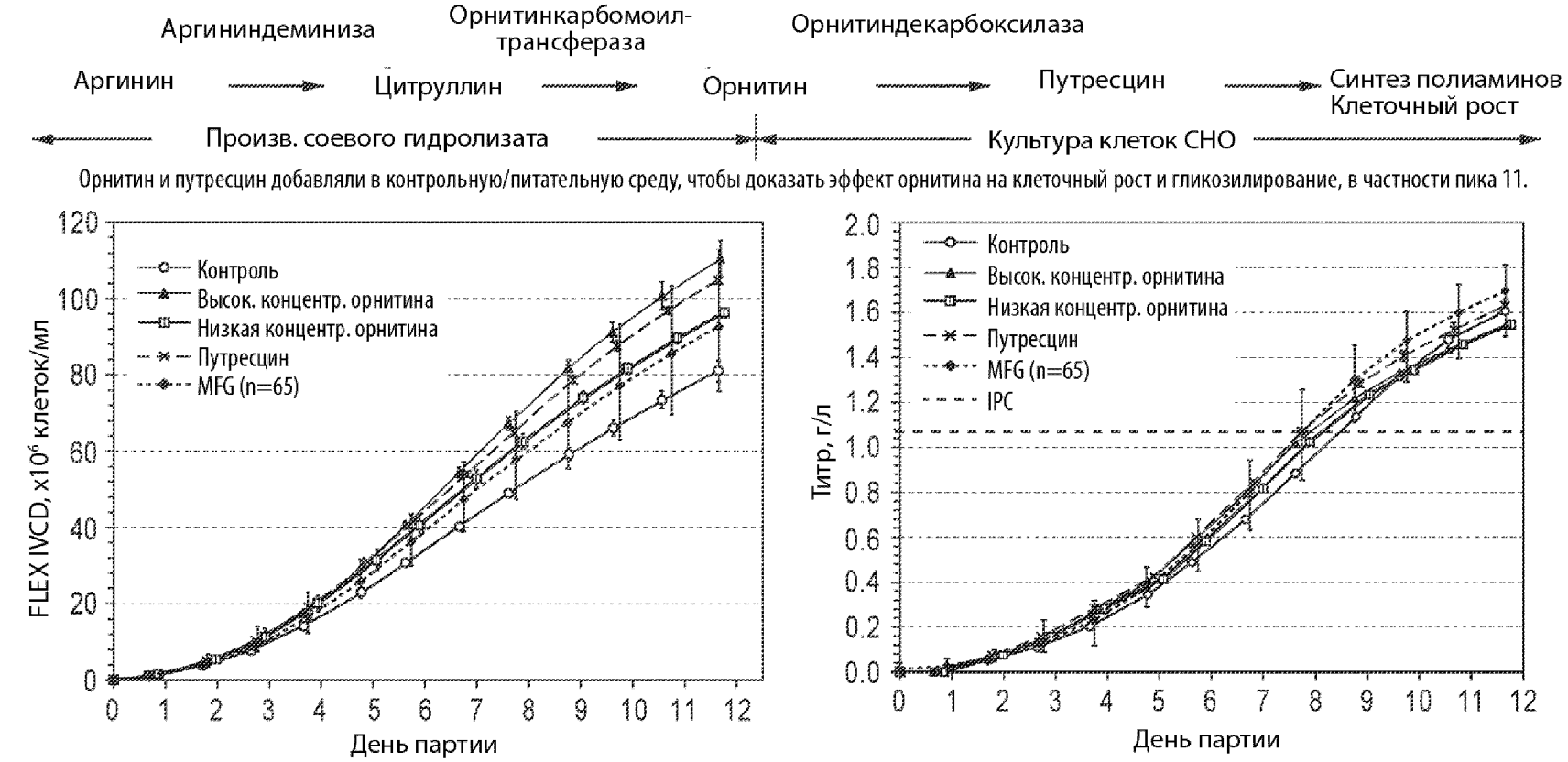
Фиг. 4


Пик 11
L-валин
L-аргинин
L-аланин
L-фенилаланин
L-тирозин
L-лейцин
L-лизин
Общее
L-Глицин
L-Треонин
Аспарагин
L-серин
L-гистидин
L-метионин
L-изолейцин
L-аспарагиновая кислота
L-глутаминовая кислота
L-триптофан
Титр
L-пролин
SP%агрегатов
L-орнитин
L-цитруллин
A
N
I
D
K
M
L
Q
O
BB
E
Y
X
DD
P
T
C
GG
EE
FF
U
R
AA
B
IVCD
W
Z
CC

Фиг. 5


Конечный титр
аргинин
цитруллин
орнитин
Max лактата
пролин

Фиг. 6A


Аргининдеминиза
Орнитинкарбомоил-трансфераза
Орнитиндекарбоксилаза
Аргинин
Цитруллин
Орнитин
Путресцин
Синтез полиаминов
Клеточный рост
Произв. соевого гидролизата
Культура клеток CHO
Орнитин и путресцин добавляли в контрольную/питательную среду, чтобы доказать эффект орнитина на клеточный рост и гликозилирование, в частности пика 11.
FLEX IVCD, x10⁶ клеток/мл
Контроль
Высок. концентр. орнитина
Низкая концентр. орнитина
Путресцин
MFG (n=65)
День партии
Титр, г/л
IPC

Фиг. 6B

Условия	Условия	Высок. пик орнитина	Низкий пик орнитина	Пик путресцина
Конц., мг/л	1.6	6.6	31.6	36.6
Титр, г/л	1.61	1.55	1.55	1.63
IVCD, x10^6 клеток-день/мл	80.9	110.4	96.2	104.8
Пик 11, %	12.5	9.8	9.3	9.0