

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091349** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.08.20

(51) Int. Cl. *C12N 5/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.29

(54) **СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК**

(31) **17204978.5**

(32) **2017.12.01**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2018/083010**

(87) **WO 2019/106091 2019.06.06**

(71) Заявитель:
ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:

**Шеваллье Валентин, Кочановски
Надин, Мальфетт Летисия, Кол
Венсен Адольф Кароль (BE)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к способам снижения гетерогенности популяции рекомбинантных белков, продуцируемых в клеточной культуре, где указанные способы включают культивирование клеток-хозяев, продуцирующих рекомбинантный белок в среде для культивирования клеток, где среда для культивирования клеток содержит один или более аналогов цистеина/цистина.

A1

202091349

202091349

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562716EA/042

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области получения рекомбинантных белков, а в частности, антител. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способам культивирования клеток для получения рекомбинантных белков с пониженной гетерогенностью при их производстве в промышленных масштабах.

Предпосылки создания изобретения

Для получения рекомбинантных белков в качестве терапевтических белков, таких как терапевтические антитела, требуется продуцирование рекомбинантных белков в промышленном масштабе. Для достижения этой цели могут быть использованы различные экспрессионные системы, как прокариотические, так и эукариотические. Однако, за последние два десятилетия, большинство терапевтических белков, апробированных как терапевтические средства, были получены с использованием клеточных культур млекопитающих, и такие системы являются предпочтительными экспрессионными системами для продуцирования большого количества рекомбинантных белков для их использования человеком.

Однако, клеточные культуры млекопитающих имеют серьезные недостатки. Титр продуцируемого рекомбинантного белка обычно является очень низким по сравнению с другими системами продуцирования эукариотических клеток, такими как системы, полученные на основе клеток дрожжей и насекомых. За последние 30 лет было предпринято множество попыток определить основные параметры клеточной культуры и экспрессии рекомбинантного белка, при этом, большое внимание уделялось исследованиям, направленным на достижение оптимального роста клеток путем изменения состава среды для культивирования клеток (см., например, Hecklau C., et al. *J. Biotech* 218 (2016) 53-63; Zang Li. et al. *Anal. Chem* 83 (2011) 5422-5430) и создания рабочих условий, а также производства крупных биореакторов. Так, например, L-цистеин представляет собой одну из незаменимых аминокислот, которую обычно добавляют в питательные среды и в питательные добавки. Производные цистеина, такие как S-сульфоцистеин и N-ацетилцистеин, были использованы для улучшения специфической продуктивности в клеточных культурах (Hecklau et al., см. выше; Oh et al. (2005) *Biotechnol. Prog.* 21: 1154).

Хотя выход продукта все еще является очень важным аспектом культивирования клеток млекопитающих, однако, в последние годы, центр внимания исследователей сместился в сторону контроля качества продукта и согласованности процедур на всех этапах разработки и промышленного производства. Терапевтические белки, продуцируемые клеточной культурой млекопитающих, имеют различные уровни гетерогенности. Такая гетерогенность включает, но не ограничивается ими, различные паттерны гликозилирования, различия, возникающие в процессе дезамидирования или

окисления, и различия зарядов или размеров. Гетерогенность рекомбинантных белков может также давать различия в окраске продукта, например, между различными партиями одного и того же белка, полученного одним и тем же способом его продуцирования. Такая гетерогенность, а в частности, различия в окраске представляющего интерес рекомбинантного белка становятся более очевидными при получении терапевтических белков в высоких концентрациях. В последние годы наблюдается устойчивая тенденция к подкожной доставке терапевтических белков, что требует продуцирования терапевтических белков в высоких концентрациях. Высокие концентрации также ассоциируются с повышенными уровнями агрегации (Purdie J., et al. *Biotechnology Progress*, 2016). Варианты с более высоким зарядом, такие как повышенные уровни кислотных молекул, могут влиять на стабильность белка (Banks D. D., et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009), тогда как цвет концентрированного терапевтического белка может быть более интенсивным.

Условия культивирования клеток, такие как состав среды (Kshirsagar R., et al. *Biotechnology and Bioengineering*, 109: 10, 2523-2532 (2012); US 2013/0281355; WO 2013/158275) и условия культивирования, включая pH и температуру (патент США 8765413) влияют, как было показано, на качественные характеристики терапевтических белков. Тем не менее, необходимость в разработке дополнительных усовершенствованных способов культивирования клеток для получения терапевтических белков, а в частности, терапевтических антител с минимальной гетерогенностью, остается актуальной.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на решение вышеупомянутой проблемы путем добавления аналогов цистеина/цистина и/или частичной замены цистеина/цистина аналогами цистеина/цистина в среду, используемую для продуцирования рекомбинантных белков в клеточной культуре.

В соответствии с этим, в своем первом аспекте, настоящее изобретение относится к способу снижения гетерогенности популяции рекомбинантных белков, продуцируемых в клеточной культуре, где указанный способ включает культивирование клеток-хозяев, продуцирующих рекомбинантный белок в среде для культивирования клеток, где среда для культивирования клеток содержит один или более аналогов цистеина/цистина.

Во втором своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения препарата рекомбинантного белка, включающему:

(i) инокуляцию указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(a) аналогов цистеина/цистина; и/или

(b) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождение культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(a) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (a) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно, и

где, в случае объединения содержимого базальной среды и всех добавок, молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:18 до 18:1.

В своем третьем аспекте, настоящее изобретение относится к способу А получения препарата рекомбинантного белка, включающему:

(i) инокуляцию указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(a) аналогов цистеина/цистина; и/или

(b) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождение культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(a) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (a) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно, и

где, в случае объединения содержимого базальной среды и всех добавок, молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:18 до 18:1.

В своем дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к препарату рекомбинантного белка, получаемому или полученному способом согласно изобретению.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к среде для культивирования клеток, подходящей для культивирования клеток млекопитающих, и содержащей диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Концентрации жизнеспособных клеток.

Фигура 2: Относительный % изменения титра Mab на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином).

Фигура 3: Относительный % изменения уровня интенсивности окраски (величина b^*) на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином).

Фигура 4: Относительный % изменения уровня кислотных молекул на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином).

Фигура 5: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином).

Фигура 6: Концентрации жизнеспособных клеток.

Фигура 7: Относительный % изменения титра Mab на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином).

Фигура 8: Относительный % изменения уровня кислотных молекул на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином).

Фигура 9: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул на

14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином).

Фигура 10: Профиль роста клеток для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе (концентрации жизнеспособных клеток).

Фигура 11: Относительный % изменения титра Mab по сравнению с контролем для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе.

Фигура 12: Относительный % изменения уровня кислотных молекул по сравнению с контролем для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе.

Фигура 13: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул по сравнению с контролем для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе.

Фигура 14: Относительный % изменения уровня интенсивности окраски (величина b^*) по сравнению с контролем для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе.

Фигура 15: Профиль роста клеток для клеточной линии 2 в 2 л-биореакторе (концентрации жизнеспособных клеток).

Фигура 16: Относительный % изменения титра Mab по сравнению с контролем для клеточной линии 2 в 2 л-биореакторе.

Фигура 17: Относительный % изменения уровня кислотных молекул по сравнению с контролем для клеточной линии 2 в 2 л-биореакторе.

Фигура 18: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул по сравнению с контролем для клеточной линии 2 в 2 л-биореакторе.

Фигура 19: Средний профиль роста клеток, исходя из набора данных 1 и 2, в 2 л-биореакторах (величины ошибок=1SD).

Фигура 20: Относительный % изменения титра Mab по сравнению с контролем. Усредненные величины для набора данных 1 и 2 (величины ошибок=1 SD).

Фигура 21: Относительный % изменения уровня кислотных молекул по сравнению с контролем. Усредненные величины для набора данных 1 и 2 (величины ошибок=1 SD).

Фигура 22: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул по сравнению с контролем. Усредненные величины для набора данных 1 и 2 (величины ошибок=1 SD).

Фигура 23: Относительный % изменения уровня интенсивности окраски (величина b^*) по сравнению с контролем. Усредненные величины для набора данных 1 и 2 (величины ошибок=1 SD).

Фигура 24: Профиль роста клеток для клеточной линии 1 в 15 мл-биореакторе.

Фигура 25: Относительный % изменения уровня кислотных молекул по сравнению с контролем в ответ на различные уровни аналога цистеина/цистина.

Фигура 26: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул по сравнению с контролем в ответ на различные уровни аналога цистеина/цистина.

Подробное описание изобретения

Как описано выше, в своем первом аспекте, настоящее изобретение относится к способу снижения гетерогенности популяции рекомбинантных белков, продуцируемых в клеточной культуре, где указанный способ включает культивирование клеток-хозяев,

продуцирующего рекомбинантный белок в среде для культивирования клеток, где среда для культивирования клеток содержит один или более аналогов цистеина/цистина.

Способ согласно изобретению, в частности, позволяет снижать интенсивность окрашивания рекомбинантных белков. Таким образом, в своем независимом аспекте, настоящее изобретение относится к способу уменьшения интенсивности окрашивания популяции рекомбинантных белков, продуцируемых в культуре клеток, где указанный способ включает культивирование клеток-хозяев, продуцирующих рекомбинантный белок, в среде для культивирования клеток, содержащей один или более аналогов цистеина/цистина.

В другом своем независимом аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения препарата рекомбинантного белка, включающему:

(i) инокуляцию указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(a) аналогов цистеина/цистина; и/или

(b) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождение культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(a) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (a) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно, и

где, в случае объединения содержимого базальной среды и всех добавок, молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:18 до 18:1.

Гетерогенность

Настоящее изобретение основано на обнаружении того факта, что при добавлении аналогов цистеина/цистина в среду для культивирования клеток во время фазы продуцирования в способе получения рекомбинантного белка, гетерогенность продуцируемых рекомбинантных полипептидов снижается без снижения титра рекомбинантных полипептидов по окончании продуцирования.

Гетерогенность, предпочтительно, снижается в отношении:

a. окраски или интенсивности окраски;

b. неоднородности заряда, предпочтительно, за счет уменьшения пиков кислотных групп (APG) и/или пиков основных групп (BPG), при этом, число основных заряженных молекул не уменьшается; и/или

c. окисления аминокислот, предпочтительно, окисления метионина.

Используемый здесь термин «гетерогенность» означает различия между отдельными молекулами, например, рекомбинантными белками, в популяции молекул, полученных одним и тем же способом продуцирования или в одной и той же производственной партии. Гетерогенность может возникать в результате неполных или неоднородных модификаций рекомбинантных полипептидов, например, из-за

посттрансляционных модификаций полипептидов или из-за их ошибочного включения в процессе транскрипции или трансляции. Посттрансляционные модификации могут, например, быть результатом реакций дезаминирования и/или реакций окисления и/или ковалентного присоединения небольших молекул, таких как реакции гликозилирования, и/или реакции изомеризации, и/или реакции фрагментации, и/или других реакций, а также, они могут включать изменение паттернов гликозилирования. Физико-химические признаки такой гетерогенности сообщают полученным препаратам рекомбинантных полипептидов различные свойства, которые включают, но не ограничиваются ими, профиль изменения заряда, окраску или интенсивность окраски и профиль молекулярной массы.

Используемые здесь термины «окрашенный» или «окраска» указывают на то, что жидкий раствор, такой как концентрированный белковый препарат, не является бесцветным. В соответствии с определением, данным в Европейской фармакопее, раствор является бесцветным, если он имеет внешний вид воды R или растворителя, либо он окрашен не более интенсивно, чем эталонный раствор B9 (Европейская фармакопея 2.2.2). Возможный способ измерения уменьшения окраски или интенсивности окраски рекомбинантных белков в клеточной культуре, который может быть применен в соответствии с настоящим изобретением, заключается в измерении относительной мощности спектрального распределения интенсивности окраски по сравнению со стандартом CIE Illuminant A на просвечивающем спектрофотометре, например, с использованием UltrascanPro, и сравнения данных с данными по шкале CIE (Международной Комиссии по науке и технике), например, путем сравнения величин b^* .

Снижение гетерогенности заряда, предпочтительно, определяют путем измерения пиков кислотных групп (APG) в популяции рекомбинантных белков, продуцируемых в клеточной культуре. Возможный способ измерения снижения APG заключается в определении относительного процента кислотных изоформ (APG для пиков кислотных групп) рекомбинантных белков, продуцируемых в среде для культивирования клеток в присутствии или в отсутствии цистеина/аналогов цистеина, с помощью визуализирующего капиллярного электрофореза (например, ProteinSimple iCE3), где рекомбинантный белок, на время измерения, предпочтительно, должен быть очищен. При измерении изоформ рекомбинационных белков, помимо APG, измеряют также основные изоформы (пики основных групп ()) и основные заряженные молекулы, где основные заряженные молекулы представляют собой изоформы рекомбинантного белка, который необходимо получить. Предпочтительно, чтобы при снижении APG, не наблюдалось значительного увеличения BPG. Предпочтительно, чтобы при снижении APG наблюдалось повышение уровней основных заряженных молекул.

Как описано выше, настоящее изобретение относится к получению рекомбинантного белка, где гетерогенность полученных рекомбинантных полипептидов снижается без снижения выхода рекомбинантных полипептидов. При этом, предпочтительно, чтобы титр рекомбинантных полипептидов увеличивался. В

соответствии с настоящим изобретением, «титр» представляет собой концентрацию рекомбинантного полипептида по окончании фазы продуцирования, если это не оговорено особо.

Аналоги цистеина/цистина

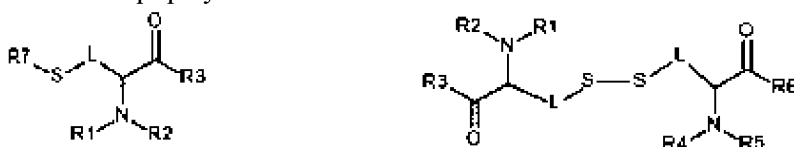
Используемый здесь термин «аналоги цистеина» или «производные цистеина» означает одно или более соединений, которые являются структурными аналогами цистеина, за исключением самого цистеина.

Используемый здесь термин «аналоги цистина» или «производные цистина» означает одно или более соединений, которые являются структурными аналогами цистина, за исключением самого цистина.

Термин «аналоги цистеина/цистина» означает «аналоги цистеина» или «аналоги цистина» или смесь «аналогов цистеина» и «аналогов цистина».

Термин «производные цистеина/цистина» означает «производные цистеина» или «производные цистина» или смесь «производных цистеина» и «производных цистина».

В одном варианте осуществления изобретения, аналоги цистеина/цистина включают, или состоят из них, одно или более соединений, выбранных из соединений, представленных формулами 1 и 2 и их солей:



1 2

где:

R1, R2, R4 и R5 независимо представляют собой водород, аминокарбонил, C₂₋₂₂ацил, C₁₋₂₂алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C₁₋₂₂алкокси; C₁₋₂₂гетероалкил, гидроксисульфонил, C₁₋₂₂алкилсульфонил или C₅₋₂₂арилсульфонил;

R3 и R6 независимо представляют собой гидроксид; NH₂; C₁₋₂₂алкокси, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила могут быть необязательно заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₂₂ алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидроксидом или C₁₋₂₂алкилом; гидроксиамино; C₁₋₂₂алкоксиамино; C₁₋₂₂алкиламино, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₂₂гетероалкиламино; ди(C₁₋₂₂алкил)амино, который необязательно замещен гидроксидом; ди(C₁₋₂₂алкил)амино, где один или более атомов углерода C₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₁₋₂₂гетероалкил)амино;

R7 представляет собой водород, фосфат или сульфат.

L представляет собой необязательно замещенную C₁₋₁₀-алкиленовую цепь; при условии, что соединение не является цистеином или цистином.

Используемый здесь термин «C₁₋₂₂алкил» означает алифатические углеводородные группы, которые могут быть прямыми или разветвленными и могут содержать 1-22

атомов углерода в цепи. Обычно, C_{1-22} алкильные группы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{6-22} алкильные группы, C_{12-22} алкильные группы, C_{1-16} алкильные группы, C_{1-10} алкильные группы и C_{1-6} алкильные группы. Примеры C_{12-22} алкильных групп включают пальмитинил и стеарил.

Используемый здесь термин C_{5-22} арил означает ненасыщенную ароматическую карбоциклическую группу из 5-22 атомов углерода, имеющую одно кольцо или множество конденсированных колец. Обычно, C_{5-22} арильные группы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{5-14} арильные группы, а обычно C_{5-10} арильные группы. Примерами C_{5-22} арильных групп являются фенил и нафтил.

Используемый здесь термин « C_{5-22} гетероарил» означает ароматические карбоциклические группы из 5-22 атомов углерода, имеющие одно кольцо или множество конденсированных колец, где один или более из указанных атомов углерода были заменены одним или более гетероатомами, выбранными из кислорода, серы и азота. Обычно, C_{5-22} гетероарильные группы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{5-14} гетероариларильные группы, а обычно C_{5-10} гетероарильные группы.

Используемый здесь термин « C_{2-22} ацил» означает группу, представленную формулой $-(C=O)R$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше. Обычно, C_{2-22} ацильные группы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{2-6} ацильные группы, C_{6-22} ацильные группы и C_{12-22} ацильные группы. Примерами такого C_{2-6} ацила являются метилкарбонил, этилкарбонил и бутилкарбонил. Примерами C_{12-22} ацильных групп являются пальмитинилкарбонил и стеарилкарбонил.

Используемый здесь термин « C_{1-22} алкокси» означает группу, представленную формулой $-O-R$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше. Обычно, C_{1-22} алкоксигруппы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{1-6} алкоксигруппы, C_{6-22} алкоксигруппы и C_{12-22} алкоксигруппы. Примерами C_{1-6} алкоксигрупп являются метокси и этокси. Примерами C_{12-22} алкоксигрупп являются пальмитинилокси и стеарилокси.

Используемый здесь термин « C_{1-22} гетероалкил» означает C_{1-22} алкил, определенный выше, где один или более атомов углерода заменены одним или более атомами кислорода или азота. Обычно, C_{1-22} гетероалкильные группы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{1-6} гетероалкильные группы, C_{6-22} гетероалкильные группы и C_{12-22} гетероалкильные группы. Примерами C_{1-22} гетероалкила являются олигомеры этиленгликоля.

Используемый здесь термин «гидроксисульфонил» означает группу, представленную формулой $-S(=O)_2-OH$.

Используемый здесь термин « C_{1-22} алкилсульфонил» означает группу, представленную формулой $-S(=O)_2-R$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу,

определенную выше. Обычно, C_{1-22} алкилсульфонильные группы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{1-6} алкилсульфонильные группы, C_{6-22} алкилсульфонильные группы и C_{12-22} алкилсульфонильные группы. Примерами C_{1-22} алкилсульфонила являются метилсульфонил, этилсульфонил и трет-бутилсульфонил.

Используемый здесь термин « C_{5-22} арилсульфонил» означает группу, представленную формулой $-S(=O)_2-R'$, где R' представляет собой C_{5-22} арильную группу, определенную выше. Примерами C_{5-22} арилсульфонила являются фенилсульфонил и толилсульфонил.

Используемый здесь термин « C_{1-22} алкиламино» означает группу, представленную формулой $-NH-R$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше. Обычно, C_{1-22} алкиламиногруппы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{1-6} алкиламиногруппы, C_{6-22} алкиламиногруппы и C_{12-22} алкиламиногруппы. Примерами C_{1-22} алкиламино являются метиламино, этиламино и бутиламино.

Используемый здесь термин C_{1-22} алкоксиамино означает группу, представленную формулой $-NH-OR$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше. Обычно, C_{1-22} алкоксиаминогруппы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{1-6} алкоксиаминогруппы, C_{6-22} алкоксиаминогруппы и C_{12-22} алкоксиаминогруппы. Примерами C_{1-22} алкиламино являются метиламино, этиламино и бутиламино.

Используемый здесь термин «ди(C_{1-22} алкил)амино» означает группу формулы $-NRR'$, где R и R' независимо представляют собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше. Обычно, ди(C_{1-22} алкил)аминогруппы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают ди(C_{1-6} алкил)амино, ди(C_{6-22} алкил)амино и ди(C_{12-22} алкил)амино. Примерами ди(C_{1-22} алкил)амино являются диметиламино, (метил)(этил)амино, диэтиламино, пропиламино и бутиламино.

Используемый здесь термин « C_{1-22} гетероалкиламино» означает группу, представленную формулой $-NH-R$, где R представляет собой C_{1-22} гетероалкильную группу, определенную выше. Обычно C_{1-22} гетероалкиламиногруппы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают C_{1-6} гетероалкиламино, C_{6-22} гетероалкиламино и C_{12-22} гетероалкиламино.

Используемый здесь термин «ди(C_{1-22} гетероалкил)амино» означает группу формулы $-NRR'$, где R и R' независимо представляют собой C_{1-22} гетероалкильную группу, определенную выше. Обычно ди(C_{1-22} гетероалкил)аминогруппы, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в настоящем изобретении, включают ди(C_{1-6} гетероалкил)амино, ди(C_{6-22} гетероалкил)амино и ди(C_{12-22} гетероалкил)амино.

Термин « C_{1-10} алкиленовая цепь» означает двухвалентную прямую или разветвленную алкиленовую цепь, содержащую от 1 до 10 атомов углерода. Типичными примерами « C_{1-10} алкиленовой цепи» являются метилен, этилен, пропилен и бутилен.

Используемый здесь термин «аминокарбонил» означает группу, представленную формулой $-\text{CO}-\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$, где углерод $-\text{CO}$ связан с азотом аналога цистеина/цистина, и где R_a и R_b независимо представляет собой C_{1-22} алкил, определенный выше.

В одном варианте осуществления изобретения, аналоги цистеина/цистина выбраны из аналогов цистеина, представленных формулой 1, где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и L определены выше. В конкретном аспекте этого варианта осуществления изобретения, R_7 представляет собой водород.

В другом варианте осуществления изобретения, аналоги цистеина/цистеина выбраны из аналогов цистина, представленных формулой 2, где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и L определены выше.

Обычно, R_1 , R_2 , R_4 и R_5 независимо представляют собой водород, C_{2-22} ацил, C_{1-22} алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидной и C_{1-22} алкоксидной; или C_{1-22} гетероалкил.

Обычно, R_3 и R_6 независимо представляют собой гидроксидную; NH_2 ; C_{1-22} алкоксидную, где один или более атомов углерода C_{1-22} алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или гетероарилом; C_{1-22} алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидроксидной; или ди(C_{1-22} алкил)амино, который необязательно замещен гидроксидной.

Обычно, R_7 представляет собой водород.

Обычно, L представляет собой C_{1-4} алкиленовую цепь, необязательно замещенную одной или более C_{1-6} алкильными, а предпочтительно, двумя метильными группами.

В соответствии с этим, R_1 представляет собой водород или C_{2-22} ацил. Обычно, R_1 представляет собой водород или C_{2-6} ацил. В качестве примера, R_1 представляет собой водород или ацетил. В конкретном варианте осуществления изобретения, R_1 представляет собой водород.

В соответствии с этим, R_2 представляет собой водород или C_{2-22} ацил. Обычно, R_2 представляет собой водород или C_{2-6} ацил. В качестве примера, R_2 представляет собой водород или ацетил.

В соответствии с этим, R_3 представляет собой гидроксидную или C_{1-22} алкоксидную. Обычно, R_3 представляет собой гидроксидную или C_{1-6} алкоксидную. В качестве примера, R_3 представляет собой гидроксидную или метокси.

В соответствии с этим, R_4 представляет собой водород или C_{2-22} ацил. Обычно, R_4 представляет собой водород или C_{2-6} ацил. В качестве примера, R_4 представляет собой водород или ацетил. В конкретном варианте осуществления изобретения, R_4 представляет собой водород.

В соответствии с этим, R_5 представляет собой водород или C_{2-22} ацил. Обычно, R_5 представляет собой водород или C_{2-6} ацил. В качестве примера, R_5 представляет собой ацетил.

В соответствии с этим, R_6 представляет собой гидроксидную или C_{1-22} алкоксидную. Обычно, R_6 представляет собой гидроксидную или C_{1-6} алкоксидную. В качестве примера, R_6 представляет собой гидроксидную или метокси.

В соответствии с этим, L представляет собой метилен или этилен. В качестве примера, L представляет метилен.

В одном варианте осуществления изобретения, аналоги цистеина/цистина включают одно или более соединений, выбранных из соединений, представленных формулой 1, и их солей, где группы L, R1, R2, R3 и R7 определены выше.

при условии, что:

(i) если одна из групп R1 или R2 представляет собой C₆₋₂₂ацил, C₆₋₂₂алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидрокси и C₁₋₂₂алкокси; C₆₋₂₂гетероалкил, гидроксисульфонил, C₆₋₂₂алкилсульфонил или C₅₋₂₂арилсульфонил; то

оставшаяся группа R1 или R2 независимо представляет собой водород, аминокарбонил, C₂₋₆ацил, C₁₋₆алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидрокси и C₁₋₆алкокси; C₁₋₆гетероалкил, гидроксисульфонил, C₁₋₆алкилсульфонил или C₅₋₁₀-арилсульфонил; и

R3 представляет собой гидрокси; NH₂; C₁₋₆алкокси, где один или более атомов углерода C₁₋₆алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₆алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидрокси или C₁₋₆алкилом; гидроксиамино; C₁₋₆алкоксиамино; C₁₋₆алкиламино, где один или более атомов углерода C₁₋₆алкила заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₆гетероалкиламино; ди(C₁₋₆алкил)амино, который необязательно замещен гидрокси; ди(C₁₋₆алкил)амино, где один или более атомов углерода C₁₋₆алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₁₋₆гетероалкил)амино; и

(ii) если

R3 представляет собой C₆₋₂₂алкокси, где один или более атомов углерода C₆₋₂₂алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или гетероарилом; C₆₋₂₂алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидрокси или C₁₋₆алкилом; гидроксиамино; C₆₋₂₂алкоксиамино; C₆₋₂₂алкиламино, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; C₆₋₂₂гетероалкиламино; ди(C₆₋₂₂алкил)амино, который необязательно замещен гидрокси; ди(C₆₋₂₂алкил)амино, где один или более атомов углерода от C₆₋₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₆₋₂₂гетероалкил)амино,

то R1 и R2 независимо представляют собой водород, аминокарбонил, C₂₋₆ацил, C₁₋₆алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидрокси и C₁₋₆алкокси; C₁₋₆гетероалкил, гидроксисульфонил, C₁₋₆алкилсульфонил или C₅₋₁₀арилсульфонил.

В одном варианте осуществления изобретения, аналоги цистеина/цистина включают, или состоят из них, соединение, представленное формулой 2 и его соли, где L, R1, R2, R3, R4, R5, R6 и R7 определены выше, при условии, что:

(i) если

одна из групп R1 и R2 представляют собой C₆₋₂₂ацил, C₆₋₂₂алкил, где указанная

группа обязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C₁₋₂₂алкокси; C₆₋₂₂гетероалкил, гидроксисульфониловый, C₆₋₂₂алкилсульфониловый или C₅₋₂₂арилсульфониловый; и если одна из групп R4 и R5 представляет собой C₆₋₂₂ацил, C₆₋₂₂алкил, где указанная группа обязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C₁₋₂₂алкокси; C₆₋₂₂гетероалкил, гидроксисульфониловый, C₆₋₂₂алкилсульфониловый или C₅₋₂₂арилсульфониловый; то

оставшиеся группы R1, R2, R4 или R5 независимо представляют собой водород, аминокарбонил, C₂₋₆ацил, C₁₋₆алкил, где указанная группа обязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C₁₋₆алкокси; C₁₋₆гетероалкил, гидроксисульфониловый, C₁₋₆алкилсульфониловый или C₅₋₁₀-арилсульфониловый; и

R3 и R6 независимо представляют собой гидроксиды; NH₂; C₁₋₆алкокси, где один или более атомов углерода C₁₋₆алкила могут быть, но обязательно, заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₆алкиламином, где указанная группа обязательно замещена гидроксидом или C₁₋₆алкилом; гидроксимином; C₁₋₆алкоксимином; C₁₋₆алкиламином, где один или более атомов углерода C₁₋₆алкила заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₆гетероалкиламином; ди(C₁₋₆алкил)амином, который обязательно замещен гидроксидом; ди(C₁₋₆алкил)амином, где один или более атомов углерода C₁₋₆алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₁₋₆гетероалкил)амином;

(ii) если только одна из групп R1, R2, R4 и R5 независимо представляет собой C₆₋₂₂ацил, C₆₋₂₂алкил, где указанная группа обязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C₁₋₂₂алкокси; C₆₋₂₂гетероалкил, гидроксисульфониловый, C₆₋₂₂алкилсульфониловый или C₅₋₂₂арилсульфониловый; то

один из R3 и R6 может представлять собой C₆₋₂₂алкокси, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила могут быть, но обязательно, заменены арилом или гетероарилом; C₆₋₂₂алкиламином, где указанная группа обязательно замещена гидроксидом или C₁₋₂₂алкилом; C₆₋₂₂алкоксимином; C₆₋₂₂алкиламином, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; C₆₋₂₂гетероалкиламином; ди(C₆₋₂₂алкил)амином, который обязательно замещен гидроксидом; ди(C₆₋₂₂алкил)амином, где один или более атомов углерода C₆₋₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₆₋₂₂гетероалкил)амином;

(iii) если ни одна из групп R1, R2, R4 и R5 не является C₆₋₂₂ ацилом, C₆₋₂₂алкилом, где указанная группа обязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C₁₋₂₂алкокси; C₆₋₂₂гетероалкилом, гидроксисульфониловым, C₆₋₂₂алкилсульфониловым или C₅₋₂₂арилсульфониловым; то

R3 и R6 могут независимо представлять собой C₆₋₂₂алкокси, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила могут быть, но обязательно, заменены арилом или гетероарилом; C₆₋₂₂алкиламином, где указанная группа обязательно замещена гидроксидом или C₁₋₂₂алкилом; C₆₋₂₂алкоксимином; C₆₋₂₂алкиламином, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; C₆₋₂₂гетероалкиламином; ди(C₆₋₂₂алкил)амином, который обязательно замещен гидроксидом; ди(C₆₋₂₂алкил)амином, где один

или более атомов углерода C₆₋₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₆₋₂₂гетероалкил)амино.

В объем настоящего изобретения также входят соли аналогов цистеина/цистина формул 1 и 2.

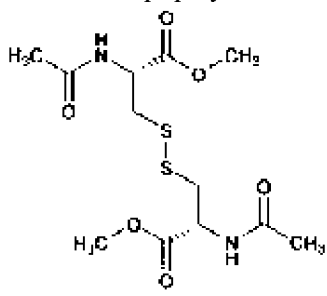
Соли согласно изобретению могут быть получены посредством реакции взаимодействия гидроксигруппы, присутствующей на аналогах цистеина/цистина. Такими солями являются соли щелочных металлов, например, соли натрия, калия или лития; соли щелочноземельных металлов, например, соли магния или кальция; соли аммония, например, соли тетраалкил- или ариламмония; соли сульфония, например, триалкил- или арилсульфония; и соли фосфония, например, соли тетраалкил- или арилфосфония.

Альтернативно, такие соли могут быть получены посредством реакции взаимодействия аминогруппы, присутствующей на аналогах цистеина/цистина. Такие соли обычно образуются в результате реакции взаимодействия аминогруппы с неорганической кислотой или органической кислотой и включают соли моно- или ди-НСl, соли H₂SO₄, соли H₃PO₄, ацетат и фумарат.

В соответствии с этим, аналоги цистеина/цистина, определенные выше, имеют такую же хиральность, как и L-цистеин.

В конкретном варианте осуществления изобретения, аналоги цистеина/цистина выбраны из диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина, N-ацетил-L-цистеина и N, N'-диацетил-L-цистина.

В конкретном аспекте этого варианта осуществления изобретения, аналоги цистеина/цистина состоят из диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина, представленного формулой 2a ((Ac-Cys-OMe)₂).



Аналоги цистеина/цистина согласно изобретению могут быть коммерчески доступными или могут быть синтезированы из L-цистеина или L-цистина методами, известными специалистам в данной области.

Клеточная культура

Как будет видно из описания изобретения, приведенного ниже, в большинстве вариантов способа согласно изобретению, в среду для культивирования клеток добавляют цистеин и/или цистин, то есть, такими добавками могут быть:

- цистеин; или
- цистин; или
- цистеин и цистин.

Цистеин и цистин в среде для культивирования клеток находятся в постоянном равновесии, где две молекулы цистеина окисляются до молекулы цистина и восстанавливаются до двух молекул цистеина.

Термин «клеточная культура» или его грамматические варианты включают, но не ограничиваются ими, множество клеток-хозяев, а предпочтительно, клеток-хозяев млекопитающих, соответствующим образом сконструированных и/или модифицированных для экспрессии (то есть, для продуцирования) одного или более рекомбинантных полипептидов, присутствующих или образующихся в среде для культивирования клеток в течение определенного периода времени, например, во время фазы продуцирования.

Термин «фаза продуцирования» согласно изобретению включает стадию культивирования клеток в процессе получения рекомбинантного белка, если клетки экспрессируют (то есть, продуцируют) рекомбинантный(е) полипептид(ы). Фаза продуцирования начинается с увеличения титра нужного продукта и заканчивается сбором клеток или жидкости или супернатанта клеточной культуры. Обычно, в начале фазы продуцирования, клеточную культуру переносят в сосуд для продуцирования, такой как биореактор. Сбор представляет собой стадию, во время которой жидкую клеточную культуру удаляют, например, из сосуда для продуцирования для выделения рекомбинантного белка, например, рекомбинантного антитела, и их очистки в последующих стадиях.

Предпочтительными клетками-хозяевами являются клетки-хозяева млекопитающих, а наиболее предпочтительно, клетки яичника китайского хомячка (СНО). Клетки млекопитающих, а в частности, клетки СНО, могут культивированы в любой среде, которая будет поддерживать их рост и экспрессию рекомбинантного полипептида, а предпочтительно, в среде, не содержащей продуктов животного происхождения, таких как сыворотка животного и пептон. Специалисту в данной области доступны различные среды для культивирования клеток, причем, каждая среда содержит различные комбинации витаминов, аминокислот, гормонов, факторов роста, ионов, буферов, нуклеозидов, глюкозы или эквивалентного источника энергии, присутствующих в соответствующих концентрациях, подходящих для роста клеток и продуцирования белка. Подходящие среды описаны, например, в WO 98/08934 и US 2006/0148074 (обе заявки включены в настоящее описание в полном объеме). Другими подходящими коммерчески доступными средами, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, или модифицированы для удовлетворения требований, предъявляемых к аналогам цистеина/цистина и/или к цистеину и/или цистину, являются, но не ограничиваются ими, среда AmpliCHO CD, среда Dynamis™, система с периодической подпиткой EX-CELL® Advanced™ CHO, среда CD FortiCHO™, среда CP OptiCHO™, минимальная поддерживающая среда (MEM), среда для культивирования A BalanCD® CHO, среда ActiPro™, DMEM, то есть, модифицированная по способу Дульбекко среда Игла и среда RPMI-1640.

В предпочтительном варианте способа согласно изобретению, указанная среда для культивирования клеток включает:

(a) аналоги цистеина/цистина; и

(b) цистеин и/или цистин,

где молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:18 до 18:1.

Предпочтительно, указанное молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:15 до 15:1, например, от 1:12 до 12:1, например, от 1:10 до 10:1, например, от 1:8 до 8:1, например от 1:6 до 6:1, например от 1:4 до 4:1, например от 1:3 до 3:1, например от 1:2 до 2:1, например от 1,5:1 и 1:1,5, например, молярное соотношение 1:1.

Что касается вышеуказанного предпочтительного варианта осуществления изобретения, то следует отметить, что специалисту в данной области известно, что соотношение (a) и (b) зависит от того, взята ли в качестве контрольной точки димерная форма или мономерная форма. Поскольку цистеин и цистин в среде для культивирования клеток находятся в постоянном равновесии, то указанное отношение рассматривается относительно цистеинового эквивалента, при этом предполагается, что весь цистин присутствует в восстановленной форме. В нижеследующей таблице, в качестве примера, показано как отношения варьируются в зависимости от того, присутствует ли аналог цистеина или аналог цистина.

Молярное отношение аналога цистеина : цистеина	Молярное отношение аналога цистина : цистеина
18:1	9:1
12:1	6:1
1:1	1:2
1:2	1:1
1:6	1:3
1:12	1:6
1:18	1:9

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, способ включает стадии:

(i) инокуляции указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(a) аналогов цистеина/цистина; и/или

(b) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождения культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(a) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (a) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно, и где, в случае объединения содержимого базальной среды и всех добавок, молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:18 до 18:1.

Предпочтительно, в вышеупомянутых вариантах осуществления изобретения, указанное молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:15 до 15:1, например, от 1:12 до 12:1, например, от 1:10 до 10:1 например, от 1:8 до 8:1, например, от 1:6 до 6:1, например, от 1:4 до 4:1, например, от 1:3 до 3:1, например, от 1:2 до 2:1, например, от 1,5:1 до 1:1,5, например, молярное отношение 1:1.

Что касается вышеуказанного предпочтительного варианта осуществления изобретения, то следует отметить, что специалисту в данной области известно, что отношение (a) к (b) зависит от того, взята ли в качестве контрольной точки димерная форма или мономерная форма. Поскольку цистеин и цистин в среде для культивирования клеток находятся в постоянном равновесии, то указанное отношение рассматривается относительно цистеинового эквивалента, при этом предполагается, что весь цистин присутствует в восстановленной форме.

В предпочтительном варианте способа согласно изобретению, указанная среда для культивирования клеток содержит:

- (a) аналоги цистеина/цистина; и
- (b) цистеин и/или цистин,

где молярное количество (a) составляет от 10 до 90 процентов по общему молярному количеству (a) и (b), а в случае использования аналога цистеина, молярное количество (b) вычисляют в расчете на цистеиновые эквиваленты; и

в случае, если используется аналог цистина, то молярное количество (b) вычисляют в расчете на цистиновые эквиваленты.

В вышеупомянутом варианте осуществления изобретения, молярное количество (a) по общему молярному количеству (a) и (b) предпочтительно составляет от 20 до 90 процентов; например, от 30 до 90 процентов, например, от 40 до 90 процентов или, например, от 50 до 90 процентов, например, от 20 до 80 процентов; например, от 30 до 80 процентов, например, от 40 до 80 процентов, или, например, от 50 до 80 процентов, например, от 20 до 70 процентов, от 30 до 70 процентов, например, от 40 до 70 процентов, или, например, от 50 до 70 процентов.

Особенно предпочтительно, если аналогом цистина является диметилловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина или N, N'-диацетил-L-цистин, то молярное количество (a) по общему молярному количеству (a) и (b) составляет от 20 до 90 процентов, более предпочтительно, от 30 до 90 процентов, например, от 20 до 70 процентов, например, от 30 до 70 процентов, или если аналогом цистеина является N-ацетил-L-цистеин, то молярное количество (a) по общему молярному количеству (a) и (b) составляет от 50 до 90 процентов, предпочтительно от 50 до 80 процентов, а более предпочтительно от 50 до 70 процентов.

В другом варианте осуществления изобретения, способ включает стадии:

(i) инокуляции указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(a) аналогов цистеина/цистина; и/или

(b) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождения культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(a) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (a) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно, и

где, при объединении содержимого базальной среды и всех добавок, молярное количество (a) по общему молярному количеству (a) и (b) составляет от 10 до 90 процентов, где в случае использования аналога цистеина, молярное количество (b) вычисляют в расчете на цистеиновый эквивалент; и

где в случае использования аналога цистина, молярное количество (b) вычисляют в расчете на цистиновый эквивалент.

В вышеупомянутом варианте осуществления изобретения, молярное количество (a) по общему молярному количеству (a) и (b) предпочтительно составляет от 20 до 90 процентов; например, от 30 до 90 процентов, например, от 40 до 90 процентов или, например, от 50 до 90 процентов, например, от 20 до 80 процентов; например, от 30 до 80 процентов, например, от 40 до 80 процентов, или, например, от 50 до 80 процентов, например, от 20 до 70 процентов, от 30 до 70 процентов, например, от 40 до 70 процентов, или, например, от 50 до 70 процентов.

Особенно предпочтительно, если аналогом цистина является диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина или N, N'-диацетил-L-цистин, то молярное количество (a) по общему молярному количеству (a) и (b) составляет от 20 до 90 процентов, более предпочтительно, от 30 до 90 процентов, например, от 20 до 70 процентов, например, от 30 до 70 процентов, или если аналогом цистеина является N-ацетил-L-цистеин, то молярное количество (a) по общему молярному количеству (a) и (b) составляет от 50 до 90 процентов, предпочтительно от 50 до 80 процентов, а более предпочтительно от 50 до 70 процентов.

В одном варианте осуществления изобретения, концентрация (b) в указанной базальной среде эквивалентна 0,05-5 ммоль/л, например, 0,1-1 ммоль/л, например, 0,2-0,6 ммоль/л цистеина.

Используемый здесь термин «эквивалент X молям цистеина» означает, что, если используются димерные формы, такие как цистин или аналоги цистина, то их следует рассматривать как две формы для вычисления используемого или добавленного количества. Так, например, 1 ммоль/л цистина эквивалентен 2 ммоль/л цистеина.

В другом варианте осуществления изобретения, во время фазы продуцирования, в среду добавляют (a) аналоги цистеина/цистина и (b) цистеин и/или цистин, где сумма (a) и

(b), добавленных в культуру во время всей фазы продуцирования, эквивалентна 1-75 ммоль/л цистеина, например, 1-50 ммоль/л, например, 1-20 ммоль/л, например, 2-20 ммоль/л, например, 4-10 ммоль/л цистеина.

В другом варианте осуществления изобретения, во время фазы продуцирования, в среду ежедневно добавляют (a) аналоги цистеина/цистина и (b) цистеин и/или цистин, где ежедневное добавление доводит концентрацию (a) + (b) до концентрации, эквивалентной 0,05-5 ммоль/л, например, 0,1-1 ммоль/л цистеина.

Фазу продуцирования, предпочтительно, осуществляют в периодическом режиме с подпиткой, но в качестве альтернативы может быть использован и любой другой режим, такой как периодический режим, режим перфузии или хеостатический режим.

Клеточная культура может находиться в любом подходящем контейнере, таком как шейкерная колба или биореактор, который может работать, а может и не работать в периодическом режиме с подпиткой в зависимости от требуемого масштаба продуцирования. Эти биореакторы могут представлять собой резервуары с мешалкой или воздухоподъемные реакторы. Предпочтительно, фазу продуцирования проводят в биореакторе, более предпочтительно, в объеме, равном или превышающем 50 л, равным или превышающем 100 л, равным или превышающем 500 л, равным или превышающем 1000 л, равным или превышающем 2000 л, равным или превышающем 5000 л, равным или превышающем 10000 л или равным или превышающем 20000 л.

Предпочтительно, рекомбинантный белок получают во время фазы продуцирования, где фазу продуцирования предпочтительно осуществляют в течение по меньшей мере 7 дней, а более предпочтительно, по меньшей мере 14 дней.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, культуру пополняют ежедневно в фазе продуцирования.

В одном варианте способа согласно изобретению, в среду для культивирования клеток добавляют:

- цистеин или цистин до общего количества 10-30 масс.% от ожидаемого общего количества продуцируемого рекомбинантного белка; и/или
- триптофан до общего количества 8-35 масс.% от ожидаемого общего количества продуцируемого рекомбинантного белка.

Общее количество добавляемого цистеина или цистина и/или триптофана может быть выражено здесь как процент от всего количества полученного рекомбинантного полипептида. Используемый здесь термин «масс.%» означает процент по массе. Термин «всего» означает общее количество, определенное по окончании фазы продуцирования, то есть общее количество цистеина или цистина и/или триптофана, добавленных во время фазы продуцирования, и общее количество рекомбинантного белка, полученного во время фазы продуцирования, где общее количество продуцированного рекомбинантного белка измеряют по окончании фазы продуцирования.

Общее количество добавленного цистеина, цистина или триптофана вычисляют в зависимости от скорости подачи подпитки (или объема подпитки) и концентрации

цистеина, цистина или триптофана в такой подпитке, и концентрации цистеина, цистина или триптофана в среде, где подпитку добавляют в зависимости от объема питательного вещества. Количество полученного рекомбинантного полипептида рассчитывают как функцию конечного объема среды для культивирования клеток и конечного титра рекомбинантного полипептида. Отношение этих двух вычисленных параметров представляет собой общее количество цистеина или цистина и/или триптофана, добавленных на количество полученного рекомбинантного полипептида.

Клетки-хозяева могут быть сначала (на стадии а.) выращены в среде для культивирования клеток, которая может уже включать, а может и не включать, аналоги цистеина/цистина, цистеин, цистин и/или триптофан. Если среда для культивирования клеток уже включает исходное количество аналогов цистеина/цистина, цистеина, цистина и/или триптофана, то общее количество будет включать это исходное количество.

В одном варианте способа согласно изобретению, в среду для культивирования клеток добавляют цистеин или цистин до общего количества 12,06 масс.% - 28,03 масс.% от ожидаемого общего количества полученного рекомбинантного полипептида, такого как общее количество от 12 до 28 масс.%, например, от 12 до 25 масс.%, например, от 12 до 20 масс.% от ожидаемого общего количества полученного рекомбинантного полипептида.

В одном варианте способа согласно изобретению, в среду для культивирования клеток добавляют триптофан до общего количества 8,84 масс.% - 32,06 масс.% от ожидаемого общего количества полученного рекомбинантного полипептида, такого как общее количество 8 масс.% - 30 масс.%, например, 8 масс.% - 25 масс.%, например, от 8 масс.% до 20 масс.% от ожидаемого общего количества полученного рекомбинантного полипептида.

В другом варианте способа согласно изобретению

- концентрация цистеина или цистина в клеточной культуре не превышает 0,9 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования, где, предпочтительно, концентрация цистеина или цистина в клеточной культуре не превышает 0,3 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования и/или

- концентрация триптофана в клеточной культуре не превышает 0,6 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования, где, предпочтительно, концентрация триптофана в клеточной культуре не превышает 0,3 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования и/или

В дополнительном варианте способа согласно изобретению

- общее количество цистеина или цистина, полученного во время этого процесса, составляет от 2,9 до 12 г/(10¹² клеток), например, от 2,9 до 7 г/(10¹² клеток), например, от 5,6 до 7 г/(10¹² клеток), где клетки представляют собой общее ожидаемое количество жизнеспособных клеток по окончании фазы продуцирования, и/или

- общее количество триптофана, полученного во время этого процесса, составляет от 2,5 до 7 г/(10¹² клеток), например от 2,5 до 3,5 г/(10¹² клеток/л), где клетки представляют собой общее ожидаемое количество жизнеспособных клеток по окончании

фазы продуцирования.

Следует отметить, что специалисту в данной области должен быть известен способ измерения количества цистеина или цистина и/или триптофана, добавленного в клеточную культуру и/или присутствующего в клеточной культуре на определенной фазе, такой как фаза продуцирования. Аналогичным образом, специалисту в данной области должен быть известен способ измерения общего количества рекомбинантного полипептида, продуцируемого клеточной культурой, и, следовательно, применения принципа настоящего изобретения для достижения желаемого технического эффекта.

Для разработки способа, где количество цистеина или цистина и/или триптофана на общее количество продуцируемого рекомбинантного полипептида находятся в определенных пределах, может потребоваться проведение одного или более предварительных экспериментов для определения приблизительных уровней рекомбинантного полипептида, продуцируемого конкретными клетками-хозяевами в определенных условиях культивирования. Если известны приблизительные общие уровни продуцируемого рекомбинантного полипептида, то может быть разработан способ согласно изобретению, где количества цистеина или цистина и/или триптофана на общее количество продуцируемого рекомбинантного полипептида находятся в определенных пределах.

Для достижения общего количества аналогов цистеина/цистина, цистеина, цистина и/или триптофана в среде для культивирования клеток во время фазы продуцирования могут быть применены различные стратегии. В одном варианте осуществления изобретения, такое общее количество может быть достигнуто путем добавления аналогов цистеина/цистина, цистеина, цистина и/или триптофана сразу в начале фазы продуцирования, например, только один раз, или путем включения в среду для культивирования клеток-продуцентов. В другом варианте осуществления изобретения, общее количество может быть достигнуто путем объединения добавок, например, путем ежедневного добавления или непрерывного добавления во время фазы продуцирования. В еще одном варианте осуществления изобретения, общее количество может быть достигнуто с использованием комбинации исходной концентрации аналогов цистеина/цистина, цистеина, цистина и/или триптофана в жидкости для культивирования клеток в начале фазы продуцирования и путем их суммирования.

В соответствии с этим, в одном варианте способа согласно изобретению, общее количество аналогов цистеина/цистина, цистеина, цистина и/или триптофана в среде для культивирования клеток достигается путем добавления аналогов цистеина/цистина, цистеина, цистина и/или триптофана в среду для культивирования клеток:

- a. в начале фазы продуцирования,
- b. один или несколько раз в любой момент времени во время фазы продуцирования,
- c. путем непрерывного добавления во время фазы продуцирования или
- d. в любой комбинации a, b и c.

В своем дополнительном независимом аспекте, настоящее изобретение относится к среде для культивирования клеток, подходящей для культивирования клеток млекопитающих и содержащей диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина.

Рекомбинантные полипептиды

Способ согласно изобретению может быть применен для получения рекомбинантного белка или полипептида любого типа, включая, например, пептиды или более крупные полипептиды, имеющие явно выраженную третичную структуру, а также, например, гликопротеины и мультимерные белки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полученный рекомбинантный белок представляет собой белок, который, при его продуцировании в стандартных условиях, может давать окрашенный препарат в высокой концентрации. Такое окрашивание может быть уменьшено или устранено с применением способа согласно изобретению. Таким образом, в предпочтительном варианте способа согласно изобретению, рекомбинантный белок представляет собой белок, который не является бесцветным при концентрации 10 мг/мл или более, такой как 50 мг/мл или более, при его продуцировании клетками-хозяевами, выращенными в среде для культивирования клеток, не содержащей аналогов цистеина/цистина, где окраску определяют, например, как описано в приведенных здесь примерах. Белковые препараты, такие как антитела, которые должны быть введены пациенту подкожно, часто имеют даже более высокие концентрации белков, например, 100 мг/мл или более или даже более, чем 150 мг/мл. При таких концентрациях, нежелательная окраска часто создает проблемы. Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, рекомбинантный белок представляет собой белок, который при его продуцировании клетками-хозяевами, выращенными в среде для культивирования клеток, не содержащей аналогов цистеина/цистина, не является бесцветным при концентрации 100 мг/мл или более, такой как 150 мг/мл или более.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, рекомбинантный белок, полученный в способе согласно изобретению, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Используемый здесь термин «антитело» или «антитела» включает, например, моноклональные и поликлональные антитела, а также моноспецифические и мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела.

«Антитело» или «антитела» включают антитела любого вида, в частности, антитела млекопитающих, обычно имеющих две тяжелые цепи и две легкие цепи; человеческие антитела любого изотипа, включая IgA₁, IgA₂, IgD, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgG₄, IgE и IgM и их модифицированные варианты; антитела приматов, не являющихся человеком, например, шимпанзе, павианов, макак-резусов или собакоподобных обезьян; антитела грызунов, например, мышей, крыс или кроликов; антитела коз или лошадей и их производные, или птичьих антитела, такие как куриные антитела; или антитела различных видов рыб, такие как антитела акул. Термин «антитело» или «антитела» также означает

«химерные» антитела, в которых первая часть по меньшей мере одной последовательности тяжелой и/или легкой цепи антитела происходит от первого вида, а вторая часть последовательности тяжелой и/или легкой цепи антитела происходит от другого вида. Представляющие интерес химерные антитела включают «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменного домена, происходящие от последовательностей примата, не являющегося человеком (например, мартышек, таких как павианы, макак-резусы или собакоподобные обезьяны), и последовательности человеческой константной области. «Гуманизованные» антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат последовательность, происходящую от не-человеческих антител. По большей части, гуманизованные антитела представляют собой человеческие антитела (антитело-реципиент), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области или комплементарность-определяющей области (CDR) не-человеческого антитела (донорного антитела), такого как антитело мышей, крыс, кроликов, кур или приматов, не являющихся человеком, где указанное антитело имеет желаемую специфичность, аффинность и активность. В большинстве случаев, остатки человеческого антитела (реципиента), находящиеся за пределами CDR; то есть, в каркасной области (FR), дополнительно заменены соответствующими не-человеческими остатками. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в антителе-реципиенте или в донорном антителе. Эти модификации были введены для дополнительного улучшения свойств антитела. Гуманизация снижает иммуногенность не-человеческих антител у человека, что, тем самым, облегчает применение антител для лечения заболеваний у человека. Гуманизованные антитела и некоторые различные технологии их получения хорошо известны специалистам. Термин «антитело» или «антитела» также означает человеческие антитела, которые могут быть получены в качестве альтернативы гуманизованным антителам. Так, например, можно получить трансгенных животных (например, мышей), у которых, после иммунизации, будет продуцироваться полный репертуар человеческих антител без продуцирования эндогенных мышинных антител. Так, например, было описано, что гомозиготная делеция гена в области присоединения тяжелой цепи антитела (JH) у химерных и мутантных мышей зародышевой линии приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенного антитела. Перенос массива генов человеческого иммуноглобулина зародышевой линии таким мышам с мутацией зародышевой линии будет приводить к продуцированию человеческих антител со специфичностью к конкретному антигену после иммунизации трансгенного животного, несущего гены иммуноглобулина зародышевой линии человека, указанным антигеном. Технологии получения таких трансгенных животных и технологии выделения и продуцирования человеческих антител от таких трансгенных животных известны специалистам в данной области. В качестве альтернативы, у трансгенных животных, например, у мышей, гены иммуноглобулина, кодирующие переменные области мышинового антитела, заменяют только

соответствующими последовательностями гена варибельной области иммуноглобулина человека. Гены иммуноглобулина мышинной зародышевой линии, кодирующие константные области антитела, остаются неизменными. Таким образом, эффекторные функции антитела в иммунной системе трансгенной мыши и, следовательно, развитие В-клеток практически не изменяются, что может приводить к улучшению гуморального ответа при антигенном заражении *in vivo*. После выделения генов, кодирующих конкретное представляющее интерес антитело, у таких трансгенных животных, гены, кодирующие константные области, могут быть заменены генами константных областей человека с получением полностью человеческого антитела. Используемый здесь термин «антитело» или «антитела» также означает негликозилированное антитело.

Используемый здесь термин «антигенсвязывающий фрагмент антитела» или его грамматические варианты означает фрагмент антитела. Фрагмент антитела содержит по меньшей мере один домен тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, который известен специалистам в данной области, и который связывается с одним или более антигенами. Примерами фрагментов антител согласно изобретению являются фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и scFv, а также диантитела, триантитела, тетраантитела, миниантитела, доменные антитела (dAb), такие как sdAb, VHH или верблюжьи антитела (например, антитела верблюдов или лам, такие как Nanobodies™) и фрагменты VNAR, одноцепочечные антитела, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические или мультиспецифические антитела, образованные фрагментами антител, или антитела, включая, но не ограничиваясь ими, конструкции Fab-Fv или Fab-Fv-Fv. Используемые здесь фрагменты антител также включают молекулы, которые, помимо доменов иммуноглобулина, содержат последовательности, не происходящие от иммуноглобулина, например, в форме гибридных белков. Фрагменты антител, определенные выше, известны специалистам.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученные способами согласно изобретению, представляет собой (Таблица 1):

- 1) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые
 - a. содержат CDR-H1, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 1; CDR-H2, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 2; CDR-H3, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 3; CDR-L1, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 4; CDR-L2, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 5, и CDR-L3, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 6; или
 - b. содержат варибельную область легкой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 7, и варибельную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 8; или
 - c. содержат варибельную область легкой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична

последовательности, определенной в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область тяжелой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 8;

d. содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 7, и тяжелую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 11; или

e. содержат вариабельную область легкой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 7, и тяжелую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 11; или

2) антитело, которое содержит легкую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 10; или

3) антитело, которое содержит легкую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 10.

Комплементарность-определяющие области («CDR») определены здесь в соответствии с определением по Кэбату. Определение по Кэбату является стандартом для нумерации остатков в антителах и обычно используется для идентификации областей CDR (Kabat et al., (1991), 5-е издание, публикация NIH № 91-3242).

CDR-H1 SEQ ID NO:1	GFTFSNYGMV
CDR-H2 SEQ ID NO:2	YIDSDGENTYYRDSVKG
CDR-H3 SEQ ID NO:3	GIVRPFLY
CDR-L1 SEQ ID NO:4	KSSQSLV GASGRTYLY
CDR-L2 SEQ ID NO:5	LVSTLDS
CDR-L3 SEQ ID NO:6	LQGFHFPHT

Вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO:7	DIQMTQSPSS LFQKPKAPK SSLQPEDFAT	LSASVGRVT RLIYLVSTLD YYCLQGTHFP	ITCKSSQSLV SGIPSRFSGS HTFGQGTKLE	GASGKTYLYW GSGTEFTLTI IK
Вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO:8	EVPLVESGGG IDSDGDNYY VRPFLYWGQG	LVQPGGSLRL RDSVKGRFTI TLVTVS	SCAVSGFTFS SRDNAKSSLY LQMNSLRAED	NYGMWVRQA FGKGLEWVA TAVYYCTIG
Легкая цепь SEQ ID NO:9	DIQMTQSPSS LFQKPKAPK SSLQPEDFAT FIFPPSDEQL SGNSQESVTE VCHQGLSSPV	LSASVGRVT RLIYLVSTLD YYCLQGTHFP KSGTASVVCL QDSKDSYSL TKSENRGEC	ITCKSSQSLV SGIPSRFSGS HTFGQGTKLE LNNFYFREAK SSTLTLSKAD	GASGKTYLYW GSGTEFTLTI IKRTVAAPSV VQWKVDNALQ YEKHKVYACE
Тяжелая цепь SEQ ID NO:10	EVPLVESGGG FGKGLEWVAY LQMNSLRAED KGPSVFFLAP GALTSGVHTF NVNHPKSTK PPKPKDTLMI VHNAKTKPRE SNKGLPSSIE SLICLVKGFY FFLYSRLTVD	LVQPGGSLRL IDSDGDNYY TAVYYCTIGI CSRSTSESTA PAVLQSSGLY VDRKVESKYG SRTEVITCVV EQENSTYRVV KTIISKAKGQF PSDIAVEWES	SCAVSGFTFS RDSVKGRFTI VRPFLYWGQG ALGCLVKDYF SISSVTVFPS PPCPCPAPE VDVSQEDPEV SVLTVLHQDW REPQVYTLFP NGQPENNYKT	NYGMWVRQA SRDNAKSSLY TLVTVSSAST PEPVTVSWNS SSIGTKITYC FLGGPSVFLF QFNWYVDGVE LNGKEYKCKV SQEEMTKNQV TPEVLDSDGS
Fab тяжелой цепи SEQ ID NO: 11	EVPLVESGGG IDSDGDNYY VRPFLYWGQG PEPVTVSWNS NVNHPKSTK	LVQPGGSLRL RDSVKGRFTI TLVTVSSAST KGPSVFFLAP VDRKVESKYG	SCAVSGFTFS SRDNAKSSLY LQMNSLRAED SSRSTSGGTA ALGCLVKDY	NYGMWVRQA FGKGLEWVA TAVYYCTIG TAVYYCTIG SSIGTKITYC

Рекомбинантный белок или предпочтительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обычно продуцируются клетками-хозяевами, содержащими вектор, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид или антитело. Антитела или их антигенсвязывающий фрагмент могут содержать только полипептид тяжелой или легкой цепи, и в этом случае, для трансфекции клеток необходимо использовать только последовательность, кодирующую полипептид тяжелой цепи или легкой цепи. Для получения продуктов, содержащих тяжелые и легкие цепи, клетки могут быть трансфицированы двумя векторами: первым вектором, кодирующим полипептид легкой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, может быть использован один вектор, который включает последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Необязательные дополнительные стадии

Способ согласно изобретению дополнительно включает, но необязательно, стадию выделения рекомбинантного белка из среды для культивирования клеток. Затем, если белок представляет собой антитело, то рекомбинантный белок может быть очищен, например, с помощью хроматографии на белке А. Этот способ также включает, но

необязательно, стадию получения очищенного рекомбинантного белка, например, в виде препарата с высокой концентрацией белка, такой как концентрация 10 мг/мл или более, например, 50 мг/мл или более, например, 100 мг/мл или более, например 150 мг/мл или более. В другом варианте осуществления изобретения, белок был лиофилизирован или осушен распылением. Белок может быть введен пациенту в сухой форме, либо, перед введением, он может быть разведен с получением жидкого препарата.

Продукты, полученные или получаемые способом согласно изобретению

В своем дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к препарату рекомбинантного белка, такому как препарат рекомбинантного белка в общей массе, который получен или может быть получен способами согласно изобретению. Полученные таким образом рекомбинантные белки, а предпочтительно, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в указанном препарате, обладают пониженной гетерогенностью по сравнению с теми же рекомбинантными белками, полученными тем же способом, за исключением того, что в этом способе, среда не включала аналоги цистеина/цистина. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, препарат является бесцветным.

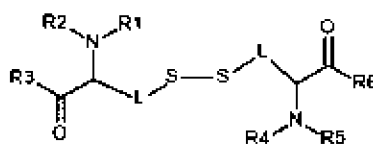
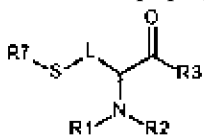
Дополнительные аспекты и варианты осуществления изобретения:

1. Способ снижения гетерогенности популяции рекомбинантных белков, продуцируемых в клеточной культуре, где указанный способ включает культивирование клеток-хозяев, продуцирующих рекомбинантный белок в среде для культивирования клеток, где среда для культивирования клеток содержит один или более аналогов цистеина/цистина, где снижение гетерогенности достигается без значительного уменьшения титра рекомбинантных белков по окончании продуцирования.

2. Способ в соответствии с вариантом 1, где указанное снижение гетерогенности включает снижение:

- a. окраски или интенсивности окраски;
- b. неоднородности заряда, предпочтительно, за счет уменьшения пиков кислотных групп (APG) и/или пиков основных групп (BPG), в результате чего число основных заряженных молекул, по существу, не уменьшается; и/или
- c. степени окисления аминокислот, предпочтительно, окисления метионина.

3. В одном варианте согласно изобретению, аналоги цистеина/цистина включают, или состоят из них, одно или более соединений, выбранных из соединений, представленных формулами 1 и 2 и их солей:



1 2

где:

R1, R2, R4 и R5 независимо представляют собой водород, аминокарбонил, C₂-

22ацил, C_{1-22} алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C_{1-22} алкокси; C_{1-22} гетероалкил, гидроксисульфонил, C_{1-22} алкилсульфонил или C_{5-22} арилсульфонил;

R3 и R6 независимо представляют собой гидроксиды; NH_2 ; C_{1-22} алкокси, где один или более атомов углерода C_{1-22} алкила могут быть необязательно заменены арилом или гетероарилом; C_{1-22} алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидроксидом или C_{1-22} алкилом; гидроксидамино; C_{1-22} алкоксидамино; C_{1-22} алкиламино, где один или более атомов углерода C_{1-22} алкила заменены арилом или гетероарилом; C_{1-22} гетероалкиламино; ди(C_{1-22} алкил)амино, который необязательно замещен гидроксидом; ди(C_{1-22} алкил)амино, где один или более атомов углерода C_{22} алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C_{1-22} гетероалкил)амино;

R7 представляет собой водород, фосфат или сульфат.

L представляет собой необязательно замещенную C_{1-10} алкиленовую цепь; при условии, что соединение не является цистеином или цистином.

4. Способ в соответствии с вариантом 3, где C_{1-22} алкил означает алифатические углеводородные группы, которые могут быть прямыми или разветвленными и могут содержать 1-22 атомов углерода в цепи, такие как C_{6-22} алкильные группы, C_{12-22} алкильные группы, C_{1-16} алкильные группы, C_{1-10} алкильные группы и C_{1-6} алкильные группы.

5. Способ в соответствии с вариантом 3 или 4, где C_{5-22} арил означает ненасыщенную ароматическую карбоциклическую группу из 5-22 атомов углерода, имеющую одно кольцо или множество конденсированных колец, такую как C_{5-14} арильные группы, C_{5-10} арильные группы.

6. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-5, где C_{5-22} гетероарил означает ароматические карбоциклические группы из 5-22 атомов углерода, имеющие одно кольцо или множество конденсированных колец, где один или более из указанных атомов углерода были заменены одним или более гетероатомами, выбранными из кислорода, серы и азота, и где C_{5-22} гетероарил включает C_{5-14} гетероариларильные группы, а обычно C_{5-10} гетероарильные группы.

7. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-5, где C_{2-22} ацил означает группу, представленную формулой $-(C=O)R$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше, и включает C_{2-6} ацильные группы, C_{6-22} ацильные группы и C_{12-22} ацильные группы.

8. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-7, где C_{1-22} алкокси означает группу, представленную формулой $-O-R$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше и включает C_{1-6} алкоксигруппы, C_{6-22} алкоксигруппы и C_{12-22} алкоксигруппы.

9. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-8, где C_{1-22} гетероалкил означает C_{1-22} алкил, определенный выше, где один или более атомов углерода заменены одним или более атомами кислорода или азота и включают C_{1-6} гетероалкильные группы, C_{6-22} гетероалкильные группы и C_{12-22} гетероалкильные группы.

10. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-9, где гидроксисульфонил означает группу, представленную формулой $-S(=O)_2-OH$.

11. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-10, где C_{1-22} алкилсульфонил означает группу, представленную формулой $S(=O)_2-R$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше, и включает C_{1-6} алкилсульфонильные группы, C_{6-22} алкилсульфонильные группы и C_{12-22} алкилсульфонильные группы.

12. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-11, где используемый здесь C_{5-22} арилсульфонил означает группу, представленную формулой $-S(=O)_2-R'$, где R' представляет собой C_{5-22} арильную группу, определенную выше.

13. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-12, где C_{1-22} алкиламино означает группу, представленную формулой $-NH-R$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше, и включает C_{1-6} алкиламиногруппы, C_{6-22} алкиламиногруппы и C_{12-22} алкиламиногруппы.

14. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-13, где C_{1-22} алкоксиамино означает группу, представленную формулой $-NH-OR$, где R представляет собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше и включает C_{1-6} алкоксиаминогруппы, C_{6-22} алкоксиаминогруппы и C_{12-22} алкоксиаминогруппы.

15. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-14, где ди(C_{1-22} алкил)амино означает соединение формулы $-NRR'$, где R и R' независимо представляют собой C_{1-22} алкильную группу, определенную выше, и включают ди(C_{1-6} алкил)амино, ди(C_{6-22} алкил)амино и ди(C_{12-22} алкил)амино.

16. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-15, где C_{1-22} гетероалкиламино означает группу, представленную формулой $-NH-R$, где R представляет собой C_{1-22} гетероалкильную группу, определенную выше, и включает C_{1-6} гетероалкиламино, C_{6-22} гетероалкиламино и C_{12-22} гетероалкиламино.

17. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-16, где ди(C_{1-22} гетероалкил)амино означает соединение формулы $-NRR'$, где R и R' независимо представляют собой C_{1-22} гетероалкильную группу, определенную выше, и включают ди(C_{1-6} гетероалкил)амино, ди(C_{6-22} гетероалкил)амино и ди(C_{12-22} гетероалкил)амино.

18. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-17, где C_{1-10} алкиленовая цепь означает двухвалентную прямую или разветвленную алкиленовую цепь, содержащую от 1 до 10 атомов углерода, и включает метилен, этилен, пропилен и бутилен.

19. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-18, где аминокарбонил означает группу, представленную формулой $-CO-N(R_aR_b)$, где углерод $-CO$ связан с азотом аналога цистеина/цистина, и где R_a и R_b независимо представляет собой C_{1-22} алкил, определенный выше.

20. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-19, где аналоги цистеина/цистина выбраны из аналогов цистеина, представленных формулой 1, где R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 и L определены выше.

21. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-20, где R7 представляет собой

водород.

22. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-21, где аналоги цистеина/цистина выбраны из аналогов цистина, представленных формулой 2, где R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 и L определены выше.

23. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-22, где R1, R2, R4 и R5 независимо представляют собой водород, C₂₋₂₂ацил, C₁₋₂₂алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C₁₋₂₂алкокси; или C₁₋₂₂гетероалкил.

24. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-23, где R3 и R6 независимо представляют собой гидроксиды; NH₂; C₁₋₂₂алкокси, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₂₂алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидроксидом; или ди(C₁₋₂₂алкил)амино, который необязательно замещен гидроксидом.

25. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-24, где L представляет собой C₁₋₄алкиленовую цепь, необязательно замещенную одной или более C₁₋₆алкильными, а предпочтительно, двумя метильными группами.

26. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-25, где R1 представляет собой водород или C₂₋₂₂ацил, такие как водород или C₂₋₆ацил.

27. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-26, где R2 представляет собой водород или C₂₋₂₂ацил, такой как C₂₋₆ацил.

28. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-27, где R3 представляет собой гидроксиды или C₁₋₂₂алкокси, такой как C₁₋₆алкокси.

29. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-28, где R4 представляет собой водород или C₂₋₂₂ацил, такой как C₂₋₆ацил.

30. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-29, где R5 представляет собой водород или C₂₋₂₂ацил, такие как водород или C₂₋₆ацил.

31. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-30, где R6 представляет собой гидроксиды или C₁₋₂₂алкокси, такой как C₁₋₆алкокси.

32. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-31, где L представляет собой метилен или этилен.

33. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-32, где аналоги цистеина/цистина включают одно или более соединений, выбранных из соединений, представленных формулой 1, и их солей, где группы L, R1, R2, R3 и R7 определены выше, при условии, что:

(i) если одна из групп R1 или R2 представляет собой C₆₋₂₂ацил, C₆₋₂₂алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C₁₋₂₂алкокси; C₆₋₂₂гетероалкил, гидроксисульфонил, C₆₋₂₂алкилсульфонил или C₅₋₂₂арилсульфонил; то

оставшаяся группа R1 или R2 независимо представляет собой водород, аминокарбонил, C₂₋₆ацил, C₁₋₆алкил, где указанная группа необязательно замещена одним

или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C_{1-6} -алкокси; C_{1-6} -гетероалкил, гидроксисульфонил, C_{1-6} -алкилсульфонил или C_{5-10} -арилсульфонил; и

R3 представляет собой гидроксид; NH_2 ; C_{1-6} -алкокси, где один или более атомов углерода C_{1-6} -алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или гетероарилом; C_{1-6} -алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидроксидом или C_{1-6} -алкилом; гидроксиамино; C_{1-6} -алкоксиамино; C_{1-6} -алкиламино, где один или более атомов углерода C_{1-6} -алкила заменены арилом или гетероарилом; C_{1-6} -гетероалкиламино; ди(C_{1-6} -алкил)амино, который необязательно замещен гидроксидом; ди(C_{1-6} -алкил)амино, где один или более атомов углерода C_{1-6} -алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C_{1-6} -гетероалкил)амино; и

(ii) если

R3 представляет собой C_{6-22} -алкокси, где один или более атомов углерода C_{6-22} -алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или гетероарилом; C_{6-22} -алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидроксидом или C_{1-6} -алкилом; гидроксиамино; C_{6-22} -алкоксиамино; C_{6-22} -алкиламино, где один или более атомов углерода C_{1-22} -алкила заменены арилом или гетероарилом; C_{6-22} -гетероалкиламино; ди(C_{6-22} -алкил)амино, который необязательно замещен гидроксидом; ди(C_{6-22} -алкил)амино, где один или более атомов углерода C_{6-22} -алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C_{6-22} -гетероалкил)амино,

то R1 и R2 независимо представляют собой водород, аминокарбонил, C_{2-6} -ацил, C_{1-6} -алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C_{1-6} -алкокси; C_{1-6} -гетероалкил, гидроксисульфонил, C_{6-22} -алкилсульфонил или C_{5-10} -арилсульфонил.

34. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-33, где аналоги цистеина/цистина включают, или состоят из него, соединение, представленное формулой 2, и его соли, где L, R1, R2, R3, R4, R5, R6 и R7 определены выше, при условии, что:

(i) если

одна из групп R1 и R2 представляют собой C_{6-22} -ацил, C_{6-22} -алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C_{1-22} -алкокси; C_{6-22} -гетероалкил, гидроксисульфонил, C_{6-22} -алкилсульфонил или C_{5-22} -арилсульфонил; и если одна из групп R4 и R5 представляет собой C_{6-22} -ацил, C_{6-22} -алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C_{1-22} -алкокси; C_{6-22} -гетероалкил, гидроксисульфонил, C_{6-22} -алкилсульфонил или C_{5-22} -арилсульфонил; то

оставшиеся группы R1, R2, R4 или R5 независимо представляют собой водород, аминокарбонил, C_{2-6} -ацил, C_{1-6} -алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксидов и C_{1-6} -алкокси; C_{1-6} -гетероалкил, гидроксисульфонил, C_{1-6} -алкилсульфонил или C_{5-10} -арилсульфонил; и

R3 и R6 независимо представляют собой гидроксид; NH_2 ; C_{1-6} -алкокси, где один или более атомов углерода C_{1-6} -алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или

гетероарилом; C₁₋₆-алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидроксигруппой или C₁₋₆-алкилом; гидроксиамино; C₁₋₆-алкоксиамино; C₁₋₆-алкиламино, где один или более атомов углерода C₁₋₆-алкила заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₆-гетероалкиламино; ди(C₁₋₆-алкил)амино, который необязательно замещен гидроксигруппой; ди(C₁₋₆-алкил)амино, где один или более атомов углерода C₁₋₆-алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₁₋₆-гетероалкил)амино;

(ii) если только одна из групп R1, R2, R4 и R5 независимо представляет собой C₆₋₂₂-ацил, C₆₋₂₂-алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксигруппы и C₁₋₂₂-алкокси; C₆₋₂₂-гетероалкил, гидроксисульфонилом, C₆₋₂₂-алкилсульфонилом или C₅₋₂₂-арилсульфонилом; то

один из R3 и R6 может представлять собой C₆₋₂₂-алкокси, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂-алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или гетероарилом; C₆₋₂₂-алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидроксигруппой или C₁₋₂₂-алкилом; C₆₋₂₂-алкоксиамино; C₆₋₂₂-алкиламино, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂-алкила заменены арилом или гетероарилом; C₆₋₂₂-гетероалкиламино; ди(C₆₋₂₂-алкил)амино, который необязательно замещен гидроксигруппой; ди(C₆₋₂₂-алкил)амино, где один или более атомов углерода C₆₋₂₂-алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₆₋₂₂-гетероалкил)амино;

(iii) если ни одна из групп R1, R2, R4 и R5 не является C₆₋₂₂-ацилом, C₆₋₂₂-алкилом, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидроксигруппы и C₂₂-алкокси; C₆₋₂₂-гетероалкилом, гидроксисульфонилом, C₆₋₂₂-алкилсульфонилом или C₅₋₂₂-арилсульфонилом; то

R3 и R6 могут независимо представлять собой C₆₋₂₂-алкокси, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂-алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или гетероарилом; C₆₋₂₂-алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидроксигруппой или C₁₋₂₂-алкилом; C₆₋₂₂-алкоксиамино; C₆₋₂₂-алкиламино, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂-алкила заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₂₂-гетероалкиламино; ди(C₆₋₂₂-алкил)амино, который необязательно замещен гидроксигруппой; ди(C₆₋₂₂-алкил)амино, где один или более атомов углерода C₆₋₂₂-алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₆₋₂₂-гетероалкил)амино.

35. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-34, где аналоги цистеина/цистина включают или состоят из них, соли формул 1 и 2.

36. Способ в соответствии с вариантом 35, где соли получают посредством реакции взаимодействия гидроксигруппы, присутствующей на аналогах цистеина/цистина.

37. Способ в соответствии с вариантами 35 или 36, где солями являются соли щелочных металлов, например, соли натрия, калия или лития; соли щелочноземельных металлов, например, соли магния или кальция; соли аммония, например, соли тетраалкил- или ариламмония; соли сульфония, например, триалкил- или арилсульфония; и соли фосфония, например, соли тетраалкил- или арилфосфония.

38. Способ в соответствии с любыми из вариантов 35-37, где соли получают

посредством реакции взаимодействия аминокруппы, присутствующей на аналогах цистеина/цистина, такой как реакция взаимодействия аминокруппы с неорганической кислотой или органической кислотой, и включают соли моно- или ди- HCl , соли H_2SO_4 , соли H_3PO_4 , ацетат и фумарат.

39. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-38, где аналоги цистеина/цистина, определенные выше, имеют такую же хиральность, как и L-цистеин.

40. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-39, где аналоги цистеина/цистина выбраны из диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина, N-ацетил-L-цистеина и N, N'-диацетил-L-цистина или S-сульфоцистеина.

41. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-40, где аналоги цистеина/цистина включают или состоят из них, соединения которые, имеющие такую же хиральность, как и L-цистеин.

42. Способ в соответствии с любыми из вариантов 3-41, где аналоги цистеина/цистина состоят из диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина.

43. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где указанная среда для культивирования клеток включает:

(a) аналоги цистеина/цистина; и

(b) цистеин и/или цистин,

где молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:18 до 18:1.

44. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где способ включает стадии:

(i) инокуляции указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(a) аналогов цистеина/цистина; и/или

(b) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождения культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(a) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (a) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно, и

где, в случае объединения содержимого базальной среды и всех добавок, молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:18 до 18:1.

45. Способ в соответствии с вариантами 43 или 44, где указанное молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:15 до 15:1, например, от 1:12 до 12:1, например, от 1:10 до 10:1 например, от 1:8 до 8:1, например, от 1:6 до 6:1, например, от 1:4 до 4:1, например, от 1:3 до 3:1, например, от 1:2 до 2:1, например, от 1,5:1 до 1:1,5, например, молярное отношение 1:1.

46. Способ в соответствии с вариантами 43 или 44, где концентрация (b) в указанной базальной среде эквивалентна 0,05-5 ммоль/л, например, 0,1-1 ммоль/л,

например, 0,2-0,6 ммоль/л цистеина.

47. Способ в соответствии с любыми из вариантов 43-46, где во время фазы продуцирования, в среду добавляют (а) аналоги цистеина/цистина и (б) цистеин и/или цистин, где сумма (а) и (б), добавленных в культуру во время всей фазы продуцирования, эквивалентна 1-75 ммоль/л, например, 1-50 ммоль/л, например, 1-20 ммоль/л, например, 2-20 ммоль/л, например, 4-10 ммоль/л цистеина.

48. Способ в соответствии с любыми из вариантов 43-46, где во время фазы продуцирования, в среду ежедневно добавляют (а) аналоги цистеина/цистина и (б) цистеин и/или цистин, где ежедневное добавление доводит концентрацию (а) + (б) до концентрации, эквивалентной 0,05-5 ммоль/л цистеина, например, 0,1-1 ммоль/л.

49. Способ в соответствии с любыми из вариантов 43-48, где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

- цистеин или цистин до общего количества 10-30 масс.% от ожидаемого общего количества продуцируемого рекомбинантного белка; и/или

- триптофан до общего количества 8-35 масс.% от ожидаемого общего количества продуцируемого рекомбинантного белка.

50. Способ в соответствии с любыми из вариантов 43-49, где

- концентрация цистеина или цистина в клеточной культуре не превышает 0,9 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования, где, предпочтительно, концентрация цистеина или цистина в клеточной культуре не превышает 0,3 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования и/или

- концентрация триптофана в клеточной культуре не превышает 0,6 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования, где, предпочтительно, концентрация триптофана в клеточной культуре не превышает 0,3 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования.

51. Способ в соответствии с любыми из вариантов 43-50, где

- общее количество цистеина или цистина, полученного во время этого процесса, составляет от 2,9 до 12 г/(10¹² клеток), например, от 2,9 до 7 г/(10¹² клеток), где клетки представляют собой общее ожидаемое количество жизнеспособных клеток по окончании фазы продуцирования, и/или

- общее количество триптофана, полученного во время этого процесса, составляет от 2,5 до 7 г/(10¹² клеток), например от 2,5 до 3,5 г/(10¹² клеток/л), где клетки представляют собой общее ожидаемое количество жизнеспособных клеток по окончании фазы продуцирования.

52. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где указанный способ является периодическим способом.

53. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где рекомбинантный белок продуцируется во время фазы продуцирования, предпочтительно, если продолжительность фазы продуцирования составляет по меньшей мере 7 дней, а более предпочтительно, по меньшей мере 14 дней.

54. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где культуру ежедневно пополняют на фазе продуцирования.

55. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где фазу продуцирования осуществляют в биореакторе, предпочтительно в объеме, равном или превышающем 50 л, равным или превышающем 100 л, равном или превышающем 500 л, равном или превышающем 1000 л, равном или превышающем 2000 л, равном или превышающем 5000 л, равном или превышающем 10000 л, или равном или превышающем 20000 л.

56. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих, а предпочтительно клетки CHO.

57. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где рекомбинантный белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

58. Способ в соответствии с вариантом 57, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой:

i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

a. содержат CDR-H1, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 1; CDR-H2, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 2; CDR-H3, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 3; CDR-L1, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 4; CDR-L2, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 5, и CDR-L3, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 6; или

b. содержат переменную область легкой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 7, и переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 8; или

c. содержат переменную область легкой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 7, и переменную область тяжелой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 8;

d. содержат переменную область легкой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 7, и тяжелую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 11; или

e. содержат переменную область легкой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 7, и тяжелую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 11; или

ii) антитело, которое содержит легкую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую последовательность,

определенную в SEQ ID NO: 10; или

iii) антитело, которое содержит легкую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 10.

59. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где рекомбинантный белок представляет собой белок, который не является бесцветным при концентрации 10 мг/мл или более, такой как 50 мг/мл или более, если он продуцируется клетками-хозяевами, выращенными в среде для культивирования клеток, не содержащей аналогов цистеина/цистина, где окраску, определяют, например, как описано в приведенных здесь примерах.

60. Способ в соответствии с любыми из предшествующих вариантов, где указанный способ включает стадию выделения рекомбинантного белка из среды для культивирования клеток и дополнительную стадию очистки рекомбинантного белка.

61. Способ в соответствии с вариантом 60, где очистка включает хроматографию на белке А.

62. Способ в соответствии с вариантами 60 или 61, дополнительно включающий стадию получения очищенного рекомбинантного белка.

63. Способ получения препарата рекомбинантного белка, включающий:

(i) инокуляцию указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(a) аналогов цистеина/цистина; и/или

(b) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождение культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования в среду для культивирования клеток добавляют:

(a) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (a) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно, и где, в случае объединения содержимого базальной среды и всех добавок, молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:18 до 18:1.

64. Способ в соответствии с вариантом 63, где аналоги цистеина/цистина являются такими, как они описаны выше в вариантах 3-41.

65. Способ в соответствии с вариантами 63 или 64, где указанное молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:15 до 15:1, например, от 1:12 до 12:1, например, от 1:10 до 10:1 например, от 1:8 до 8:1, например, от 1:6 до 6:1, например, от 1:4 до 4:1, например, от 1:3 до 3:1, например, от 1:2 до 2:1, например, от 1,5:1 до 1:1,5, например, молярное отношение 1:1.

66. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-65, где концентрация (b) в

указанной базальной среде эквивалентна 0,05-5 ммоль/л цистеина, например, 0,1-1 ммоль/л, например, 0,2-0,6 ммоль/л.

67. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-65, где во время фазы продуцирования, в среду добавляют (а) аналоги цистеина/цистина и (б) цистеин и/или цистин, где сумма (а) и (б), добавленных в культуру во время всей фазы продуцирования, эквивалентна 1-75 ммоль/л, например, 2-20 ммоль/л, например, 4-10 ммоль/л цистеина.

68. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-67, где во время фазы продуцирования, в среду ежедневно добавляют (а) аналоги цистеина/цистина и (б) цистеин и/или цистин, где ежедневное добавление доводит концентрацию (а) + (б) до концентрации, эквивалентной 0,05-5 ммоль/л, например, 0,1-1 ммоль/л цистеина.

69. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-68, где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

- цистеин или цистин до общего количества от 10 до 30 масс.% от ожидаемого общего количества продуцируемого рекомбинантного белка; и/или

- триптофан до общего количества от 8 до 35 масс.% от ожидаемого общего количества продуцируемого рекомбинантного белка.

70. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-69, где

- концентрация цистеина или цистина в клеточной культуре не превышает 0,9 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования, где, предпочтительно, концентрация цистеина или цистина в клеточной культуре не превышает 0,3 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования и/или

- концентрация триптофана в клеточной культуре не превышает 0,6 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования, где, предпочтительно, концентрация триптофана в клеточной культуре не превышает 0,3 г/л в любой момент времени в течение фазы продуцирования.

71. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-70, где

- общее количество цистеина или цистина, полученного во время этого процесса, составляет от 2,9 до 12 г/(10¹² клеток), например, от 2,9 до 7 г/(10¹² клеток), где клетки представляют собой общее ожидаемое количество жизнеспособных клеток по окончании фазы продуцирования, и/или

- общее количество триптофана, полученного во время этого процесса, составляет от 2,5 до 7 г/(10¹² клеток), например от 2,5 до 3,5 г/(10¹² клеток/л), где клетки представляют собой общее ожидаемое количество жизнеспособных клеток по окончании фазы продуцирования.

72. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-71, где указанный способ является периодическим способом.

73. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-72, где рекомбинантный белок продуцируется во время фазы продуцирования, предпочтительно, если продолжительность фазы продуцирования составляет по меньшей мере 7 дней, а более предпочтительно, по меньшей мере 14 дней.

74. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-73, где культуру ежедневно пополняют на фазе продуцирования.

75. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-74, где фазу продуцирования осуществляют в биореакторе, предпочтительно в объеме, равном или превышающем 50 л, равным или превышающем 100 л, равном или превышающем 500 л, равном или превышающем 1000 л, равном или превышающем 2000 L, равном или превышающем 5000 л, равном или превышающем 10000 л или равном или превышающем 20000 л.

76. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-75, где клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих, а предпочтительно клетки CHO.

77. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-76, где рекомбинантный белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

78. Способ в соответствии с вариантом 77, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой:

i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

a. содержат CDR-H1, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 1; CDR-H2, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 2; CDR-H3, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 3; CDR-L1, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 4; CDR-L2, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 5, и CDR-L3, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 6; или

b. содержат переменную область легкой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 7, и переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 8; или

c. содержат переменную область легкой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 7, и переменную область тяжелой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 8;

d. содержат переменную область легкой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 7, и тяжелую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 11; или

e. содержат переменную область легкой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 7, и тяжелую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 11; или

ii) антитело, которое содержит легкую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 10; или

iii) антитело, которое содержит легкую цепь, последовательность которой по

меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 10.

79. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-78, где рекомбинантный белок представляет собой белок, который не является бесцветным при концентрации 10 мг/мл или более, такой как 50 мг/мл или более, если он продуцируется клетками-хозяевами, выращенными в среде для культивирования клеток, не содержащей аналогов цистеина/цистина, где окраску, определяют, например, как описано в приведенных здесь примерах.

80. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-79, где указанный способ включает стадию выделения рекомбинантного белка из среды для культивирования клеток и дополнительную стадию очистки рекомбинантного белка.

81. Способ в соответствии с вариантом 80, где очистка включает хроматографию на белке А.

82. Способ в соответствии с вариантами 80 или 81, дополнительно включающий стадию получения очищенного рекомбинантного белка.

83. Способ в соответствии с любыми из вариантов 63-82, где указанными клетками-хозяевами являются клетки CHO, а указанным аналогом цистеина/цистина является диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина.

84. Препарат рекомбинантного белка, получаемый или полученный способом в соответствии с любым из предшествующих вариантов.

85. Среда для культивирования клеток, подходящая для культивирования клеток млекопитающих и содержащая диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина.

Настоящее изобретение будет более подробно описано в нижеследующих примерах со ссылками на варианты осуществления изобретения, проиллюстрированные в прилагаемых чертежах.

ПРИМЕРЫ

Сокращения

mAb: моноклональное антитело; Cys: цистеин или цистин; APG: группа кислотных пиков; VCC: число жизнеспособных клеток; DO: растворенный кислород; CO₂: диоксид углерода; CHO: клетки яичника китайского хомячка; UPLC: высокоэффективная жидкостная хроматография.

Пример 1

Была оценена способность производных цистеина/цистина ослаблять окраску и кислотные свойства препарата антитела, продуцируемого рекомбинантно клетками-хозяевами, выращенными в клеточной культуре. Для этого эксперимента использовали уменьшенную модель шейкерной колбы. Клетки CHO-DG44, продуцирующие полноразмерное антитело mAb1, инокулировали в 100 мл базальной среды при плотности посева $0,35 \times 10^6$ клеток/мл MAb1, которое содержит легкую цепь, имеющую

последовательность, определенную в SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 10.

Шейкерные колбы представляли собой шейкерные 250 мл-колбы (Corning), находящиеся в инкубаторе с мешалкой (Infors), защищенном от света. Клетки культивировали в течение 14 дней при 36,8°C с влажностью 80%. Клеточные культуры встряхивали при 140 об/мин в начале проведения этой процедуры. Во время этой процедуры скорость перемешивания постепенно увеличивали до 250 об/мин для поддержания DO при 40% в шейкерной колбе, как это осуществлялось в процессе культивирования в 2 л-биореакторе. Во время этой процедуры, клеточную культуру поддерживали при pH $7,0 \pm 0,2$ путем снижения содержания CO₂ в инкубаторе с 5% до 2%. Клетки культивировали в режиме периодической подпитки с ежедневным дополнительным добавлением питательного вещества во время культивирования. Базальная среда содержала 0,04 ммоль/л цистеина+0,38 ммоль/л цистина. Подпитка содержала 153,3 ммоль/л цистина. В течение всей 14-дневной фазы продуцирования, общий объем добавленной подпитки соответствовал 4,47% (об/об) исходного объема культуры.

Цистеин, присутствующий в подпитке, заменяли различными производными цистеина и цистина в различных процентных соотношениях, как показано в Таблице 1. Осмоляльность ежедневно контролировали с помощью осмометра от Advanced Instruments. Затем ежедневно проводили мониторинг pH, растворенного O₂ и растворенного CO₂ в автономном режиме с помощью газового анализатора крови модели BioProfile pHox® (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA). Концентрации метаболитов определяли ежедневно с использованием системы CedexBioHT (Roche). Концентрацию жизнеспособных клеток и жизнеспособность клеток измеряли ежедневно с использованием автоматического счетчика клеток ViCell (Beckman Coulter). Жидкость для культивирования клеток собирали ежедневно путем центрифугирования 1 мл жидкости для культивирования клеток в целях определения титра антител с помощью ВЭЖХ на белке А (Waters). По окончании 14-дневного культивирования, жидкость для культивирования клеток собирали центрифугированием. Затем супернатант очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А (MabSelect Sure, GE). Элюаты белка А использовали для определения молекулярной массы с помощью эксклюзионной UPLC (Waters). Относительный процент главной кислотной (APG для группы кислотных пиков) и основной (BPG для группы основных пиков) изоформ очищенного mAb определяли с помощью визуализирующего капиллярного электрофореза (ProteinSimple iCE3). Другую часть элюатов белка А концентрировали до 40 мг/мл на центрифужных фильтрующих устройствах Amicon Centricon (Millipore).

Интенсивность окраски концентрированной композиции антител измеряли в концентрированных элюатах белка А на просвечивающем спектрофотометре (UltrascanPro) и сравнивали по шкале CIE (Международная Комиссия по науке и технике). Численные результаты были нормализованы по концентрации 40 мг/мл.

На фигуре 1 показан профиль роста клеток с использованием различных производных цистеина и цистина с различным отношением замен цистеина в подпитке. В условиях со 100% производным Cys, рост клеток замедлялся со дня 6 по сравнению с контрольными условиями, за исключением условия со 100% сульфоцистеином, где клетки быстро погибали на 7-й день. Концентрация жизнеспособных клеток была аналогична концентрации в контрольных условиях для подпиток, содержащих 50% производных на 10-й день. Начиная с 10 дня, плотность жизнеспособных клеток была выше, чем в контрольных условиях. Однако, для 50% S-сульфоцистеина, концентрация жизнеспособных клеток достигала максимума 2×10^6 клеток/мл, что было значительно ниже, чем в контрольных условиях. Клетки не росли так же хорошо, как контроль, где 100% Cys был заменен производным Cys, что свидетельствует о том, что производные цистеина не могут полностью заменить цистеин. С другой стороны, в условиях с 50% производными наблюдался лучший рост, чем в контрольных условиях, что позволяет предположить о положительном влиянии производных цистеина/цистина, если цистеин присутствует в минимальном количестве. S-сульфоцистеин, по-видимому, не действует как другие производные, протестированные в отношении обеспечения роста клеток.

Принимая во внимание гибель клеток, наблюдаемую при 100% производных цистеина, другие результаты, относящиеся к свойствам и к качеству продукта, анализировали только для условий с 50% производными цистеина.

Титр продукта был выше в культурах, полученных с использованием 50% производных цистеина, чем в контрольных условиях, за исключением случаев, когда используемым производным был S-сульфоцистеин (фигура 2).

Величина b^* для концентрированного элюата белка А снижалась на 6,5-21,2% по сравнению с контролем, при этом, наилучший результат наблюдался в случае 50% диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина (регистрационный номер CAS 32381-28-5, например, полученного от Bachem AG) (фигура 3). Аналогичным образом, снижение уровня кислотных вариантов также наблюдалось в пределах от 7,6% до 24,8% по сравнению с контрольными условиями, причем, наилучший результат наблюдался в случае 50% диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина (фигура 4). Такое снижение уровня кислотных групп коррелировало с увеличением основных заряженных групп (фигура 5) без значительного увеличения уровня основного варианта, за исключением S-сульфоцистеина (не показано). Эти результаты подтвердили снижение микрөгетерогенности рекомбинантного белка.

Таблица 1: Различные составы тестируемых подпиток

Используемые производные	% цистеина, замененного производными в подпитке (молярная эквивалентность)
N-ацетил-L-цистеин	100
	50
N, N'-диацетил-L-цистин	100

	50
Диметилловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина	100
	50
S-сульфоцистеин	100
	50

Пример 2

Была оценена способность производных цистеина/цистина ослаблять окраску и кислотные свойства препарата рекомбинантного белка в клеточной культуре с использованием другой антитело-продуцирующей клеточной линии, клеточной линии 2. Для этого эксперимента использовали уменьшенную модель шейкерной колбы. Клетки CHO-DG44, продуцирующие производное мультиспецифического антитела, инокулировали в 100 мл базальной среды при плотности посева $0,35 \times 10^6$ клеток/мл. Шейкерные колбы представляли собой шейкерные 250 мл-колбы (Corning), находящиеся в инкубаторе с мешалкой (Infors), защищенном от света. Клетки культивировали в течение 14 дней при $36,8^\circ\text{C}$ с влажностью 80%. В начале проведения этой процедуры, клеточные культуры встряхивали при 140 об/мин. Во время этой процедуры скорость перемешивания постепенно увеличивали до 250 об/мин для поддержания DO при 40% в шейкерной колбе, как это осуществлялось в процессе культивирования в 2 л-биореакторе. Во время этой процедуры, клеточную культуру поддерживали при pH $7,0 \pm 0,2$ путем снижения содержания CO_2 в инкубаторе с 5% до 2%. Клетки культивировали в режиме периодической подпитки с ежедневным дополнительным добавлением питательного вещества во время культивирования. Базальная среда содержала 0,04 ммоль/л цистеина+0,38 ммоль/л цистина. Подпитка содержала 153,3 ммоль/л цистина. В течение всей 14-дневной фазы продуцирования, общий объем добавленной подпитки соответствовал 2,81% (об/об) от исходного объема культуры.

Цистеин, присутствующий в подпитке, был заменен различными производными цистеина и цистина с отношением замен с 50% эквимольностью (Таблица 1). Для того, чтобы проверить, было ли наблюдаемое улучшение обусловлено присутствием производного цистеина или только снижением уровня цистеина, было также добавлено условие только с 50% уровнями контрольного цистеина. Осмоляльность ежедневно контролировали с помощью осмометра от Advanced Instruments. Затем ежедневно проводили мониторинг pH, растворенного O_2 и растворенного CO_2 в автономном режиме с помощью Nova Biomedical Phox (Nova biomedical). Концентрации метаболитов определяли ежедневно с использованием системы CedexBioHT (Roche). Концентрацию жизнеспособных клеток и их жизнеспособность определяли ежедневно с использованием автоматического счетчика клеток ViCell (Beckman Coulter). Жидкость для культивирования клеток собирали ежедневно путем центрифугирования 1 мл жидкости для культивирования клеток в целях определения титра антитела путем измерения на колонке Octet с белком L (Pall). По окончании 14-дневного культивирования, жидкость

для культивирования клеток собирали центрифугированием. Затем супернатант очищали с помощью аффинной хроматографии на белке L (CaptoL, GE). Элюаты белка L использовали для определения молекулярной массы с помощью эксклюзионной UPLC (Waters) и для определения заряженных вариантов с помощью изокапиллярного фокусирования (ProteinSimple iCE3). Рекомбинантный белок, продуцируемый клеточной линией 2, не являлся окрашенной молекулой. Следовательно, в этом случае, измерение окраски не проводилось.

На рисунке 6 показан профиль роста клеток с использованием различных производных цистеина и цистина с отношением замен 50% цистеина в подпитке. Аналогичные профили роста клеток наблюдались в контрольных условиях и в условиях с использованием производных цистеина и цистина. Таким образом, эти компоненты не влияют на рост клеток для этой клеточной линии (клеточной линии 2). Титр продукта также был аналогичен титру при контрольных условиях для всех производных цистеина и цистина (фигура 7).

Как видно на фигуре 8, снижение уровня кислотных вариантов наблюдалось в пределах от 46,6% до 50,2% по сравнению с контрольным условием с двумя производными цистина, а именно, с N, N'-диацетил-L-цистином и диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина. В случае N-ацетилцистеина наблюдалось снижение уровня кислотных вариантов на 14,5%. Это снижение уровня кислотных вариантов коррелировало с увеличением основных заряженных молекул (фигура 9) без какого-либо значительного увеличения уровня основного варианта (данные не показаны). Эти результаты подтвердили снижение микрогетерогенности рекомбинантного белка под действием производного цистина. С другой стороны, увеличение уровня кислотных молекул в пределах от 5% до 10% наблюдалось в случае S-сульфоцистеина и только при снижении уровня цистеина.

Пример 3

Была оценена способность производных цистеина/цистина ослаблять окраску и кислотные свойства препарата рекомбинантного белка в клеточной культуре в биореакторе для двух клеточных линий. Эта модель является более подходящей для крупномасштабного продуцирования, чем шейкерная колба, что обусловлено геометрией и наличием дополнительного контроля. Клетки CHO-DG44 от клеточных линий 1 и 2 инокулировали в 1300 мл базальной среды при плотности посева $0,35 \times 10^6$ клеток/мл в 2 л-биореакторе с мешалкой (Sartorius). Клетки культивировали в течение 14 дней в периодическом режиме с подпиткой. Культуры клеток перемешивали при 280 об/мин, и DO поддерживали на уровне 40%. Культуру клеток поддерживали при pH $7,0 \pm 0,2$ с автоматической регуляцией барботирования CO₂. Клетки культивировали в режиме периодической подпитки с ежедневным дополнительным добавлением питательного вещества во время культивирования. Базальная среда содержала 0,04 ммоль/л цистеина+0,38 ммоль/л цистина. Подпитка содержала 153,3 ммоль/л цистина. В течение всей 14-дневной фазы продуцирования, общий объем добавленной подпитки

соответствовал 5,7% (масс/масс) исходного объема культуры для клеточной линии 1 и 3,1% (масс/масс) исходного объема культуры для клеточной линии 2.

Цистеин, присутствующий в подпитке, был заменен различными производными цистеина и цистина в различных процентных соотношениях, как показано в Таблице 2. Для того, чтобы проверить, было ли наблюдаемое улучшение обусловлено присутствием производного цистеина или только снижением уровня цистеина, было также добавлено условие только с 50% цистеином. Осмоляльность ежедневно контролировали с помощью осмометра от Advanced Instruments. Затем ежедневно проводили мониторинг pH, растворенного O₂ и растворенного CO₂ в автономном режиме с помощью Nova Biomedical Phox (Nova biomedical). Концентрации метаболитов определяли ежедневно с использованием системы CedexBioHT (Roche). Концентрацию жизнеспособных клеток и их жизнеспособность определяли ежедневно с использованием автоматического счетчика клеток ViCell (Beckman Coulter). Жидкость для культивирования клеток собирали ежедневно путем центрифугирования 1 мл жидкости для культивирования клеток в целях определения титра антитела с помощью ВЭЖХ на белке А (Waters) или путем измерения на колонке Octet с белком L (Pall). По окончании 14-дневного культивирования, жидкость для культивирования клеток собирали центрифугированием. Затем супернатант очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А или L (GE). Элюаты белка А или L использовали для определения молекулярной массы с помощью эксклюзионной UPLC (Waters) и для определения заряженных вариантов с помощью изокапиллярного фокусирования (ProteinSimple iCE3). Другую часть элюатов белка А (только от клеточной линии 1) концентрировали до 40 мг/мл на центрифужных фильтрующих устройствах Amicon Centricon (Millipore). Интенсивность окраски концентрированной композиции антител измеряли в концентрированных элюатах белка А с помощью просвечивающего спектрофотометра (UltrascanPro) и сравнивали по шкале СIE (Международная Комиссия по науке и технике). Численные результаты были нормализованы по концентрации 40 мг/мл.

Таблица 2: Различные составы подпиток, протестированных с использованием клеточных линий 1 и 2 в 2 л-биореакторе

Используемые производные	% цистеина, замененного производными в подпитке (молярная эквивалентность)
N-ацетил-L-цистеин	50
N, N'-диацетил-L-цистин	50
Диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина	50

Клеточная линия 1

Аналогичные тенденции роста клеток наблюдались для всех тестируемых условий (фигура 10).

Значительное снижение титра антител наблюдалось для N, N'- диацетилцистина и

N-ацетилцистеина в пределах от 10% до 17%, а незначительное снижение менее, чем на 5% наблюдалось для диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина (фигура 11). Значительное снижение титра наблюдалось также при добавлении только 50% цистеина, что позволяет предположить, что диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина повышает титр.

Что касается уровня кислотных молекул, то наблюдалось снижение на 5% для N, N'-диацетил-L-цистина, на 10% для N-ацетил-L-цистеина и на 15% для диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина (Фигура 12). Такое снижение коррелировало с увеличением уровня основных молекул (фигура 13). Такое же влияние на заряженный вариант наблюдалось в масштабе 2 л, как и в шейкерных колбах. Это снижение также наблюдалось только при подпитке 50% цистеином. Это позволяет предположить, что снижение уровня кислотных молекул может быть обусловлено снижением уровня цистеина. Наблюдалось также снижение величины b на 2,5% для N, N'-диацетил-L-цистина, на 13% для N-ацетил-L-цистеина и на 25% для диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина. Аналогичное влияние на интенсивность окраски продукта наблюдалось в масштабе 2 л, как и в шейкерных колбах. Какого-либо снижения величины b^* наблюдалось только при подпитке 50% цистеином. Было подтверждено влияние диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина на окраску.

Клеточная линия 2

Подобные тенденции роста клеток наблюдались при всех тестируемых условиях (фигура 15).

Значительное увеличение титра антител от 15% до 23% наблюдалось в случае N, N'-диацетилцистина, N-ацетилцистеина и диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина (фигура 16). Таким образом, этот результат отличается от результатов, полученных в шейкерных колбах.

Что касается уровня кислотных молекул, то наблюдалось снижение на 8% для N, N'-диацетил-L-цистина, на 13% для N-ацетил-L-цистеина и на 13% для диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина (Фигура 17). Это снижение коррелировало с увеличением уровня основных молекул (фигура 18). Аналогичная тенденция наблюдалась для заряженных вариантов в масштабе 2 л по сравнению с шейкерными колбами, за исключением N-ацетилцистеина. Было подтверждено влияние замены цистеина на диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина на заряженные варианты.

Снижение уровня кислотных молекул на 27% наблюдалось при подпитке 50% цистеином. Это указывает на то, что снижение уровня цистеина является основным инициатором снижения уровня кислотных молекул. Увеличение титра на 10% наблюдалось в случае подпитки 50% цистеином в отличии от увеличения титра на 15-23% в случае подпитки производными цистеина/цистина. Замена 50% цистеина на производное цистеина/цистина является хорошим компромиссом между увеличением титра и снижением гетерогенности для этой клеточной линии.

Пример 4

Воспроизводимость результатов оценивали в биореакторе с клеточной линией 1. Эксперименты примера 3 повторяли с дополнительным контролем и в биореакторе с подпиткой 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином. Данные двух экспериментов были проанализированы для подтверждения эффекта, который уже наблюдался для производных цистеина/цистина.

Таблица 3: Данные, использованные для анализа

Подпитка	Число повторностей	
	Серия данных 1	Серия данных 2
Контрольная подпитка 100% цистеином	1	2
Подпитка 50% цистеином	1	1
Подпитка 50% N-ацетил-L-цистеином и 50% цистеином	1	1
Подпитка 50% N, N'-диацетил-L-цистиной и 50% цистеином	1	1
Подпитка 50% диметиловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином	1	1
Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином	0	1

Никаких различий в отношении роста клеток на дни 0-8 не наблюдалось. Со дня 9, в условиях с S-сульфоцистеином, гибель клеток была выше, чем у контроля. При подпитке 50% цистеином, 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином, и 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином, наблюдалось более высокое VCC, чем в контрольных условиях. Условия подпитки 50% диметиловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином были в среднем аналогичны контрольным условиям (фигура 19).

При добавлении диметилового эфира N, N'-диацетилцистина какого-либо значимого снижения титра антител не наблюдалось, то есть, оно составляло в среднем менее, чем на 5% по сравнению с контролем. Однако, при подпитке 50% цистеином наблюдаемое снижение составляло 10%. Таким образом, использование диметилового эфира N, N'-диацетилцистеина на 5% компенсировало потери титра из-за снижения содержания цистеина в подпитке. Кроме того, более высокое VCC, наблюдаемое при подпитке 50% цистеином, указывало на увеличение удельной продуктивности в случае диметилового эфира N, N'-диацетилцистина по сравнению с подпиткой 50% цистеином. Это наблюдение подтверждает, что потеря удельной продуктивности из-за снижения уровня цистеина может быть компенсирована добавлением диметилового эфира N, N'-диацетилцистина. Уменьшение на 10% также наблюдалось в случае N-ацетилцистеина и N, N'-диацетилцистеина. Эти молекулы не влияли на продуктивность этой клеточной линии. С другой стороны, снижение титра на 25% наблюдалось в случае S-сульфоцистеина. Это было обусловлено снижением VCC и снижением продуктивности

из-за снижения уровня цистеина, но не из-за специфического влияния S-сульфоцистеина на удельную продуктивность (Фигура 20).

Что касается уровня кислотных молекул, то наблюдалось снижение в среднем на 10% в случае N, N¹-диацетил-L-цистина и N-ацетил-L-цистеина (фигура 21). Это снижение коррелировало с увеличением уровня основных молекул (фигура 22).

Снижение в среднем на 15% наблюдалось для N, N¹-диацетил-L-цистина. Это снижение также наблюдалось только при подпитке 50% цистеином. Это еще раз говорит о том, что снижение уровня кислотных молекул обусловлено снижением уровня цистеина. Аналогичные уровни кислотных молекул наблюдались в условиях с использованием S-сульфоцистеина и в контрольных условиях. Это позволяет предположить, что S-сульфоцистеин повышает уровень кислотных молекул, который обычно снижается при снижении уровня цистеина.

Что касается величины b , то наблюдалось снижение в среднем на 5% для S-сульфоцистеина, на 14% для N, N¹-диацетил-L-цистина, на 13% для N-ацетил-L-цистеина и на 30% для диметилового эфира N, N¹-диацетил-L-цистина. Какого-либо снижения величины b^* не наблюдалось только при подпитке 50% цистеином. Было подтверждено влияние диметилового эфира N, N¹-диацетил-L-цистина на окраску (фигура 23).

Пример 5

Авторами было протестировано влияние различных концентраций производных цистеина/цистина на повышение уровня APG для препарата рекомбинантного белка, продуцируемого в клеточной культуре, выращенной в мини-биореакторах. Клетки CHO-DG44 от клеточной линии 1 инокулировали в 12 мл базальной среды при плотности посева $0,35 \times 10^6$ клеток/мл в биореакторах Ambr15 (Sartorius). Клетки культивировали в течение 14 дней в периодическом режиме с подпиткой. DO поддерживали на уровне 40% и при pH $7,0 \pm 0,2$ с автоматической регуляцией барботирования CO₂. Концентрацию жизнеспособных клеток и их жизнеспособность измеряли ежедневно с использованием автоматического счетчика клеток ViCell (Beckman Coulter). Клетки культивировали в режиме периодической подпитки с ежедневным дополнительным добавлением подпитки. Базальная среда содержала 0,04 ммоль/л цистеина+0,38 ммоль/л цистина. Подпитка содержала 153,3 ммоль/л цистина. В течение всей 14-дневной фазы продуцирования, общий объем добавленной подпитки соответствовал 4,7% (об/об) исходного объема культуры.

Цистеин, присутствующий в подпитке с различными процентными содержаниями, был заменен различными аналогами цистеина и цистина. В Таблице 4 представлен обзор различных протестированных процентов и их эквивалентности в молярном отношении к цистеину или цистину. Так, например, для N-ацетил-L-цистеина, 10% означает, что 10% молярное количество цистеинового эквивалента было заменено на 10% молярное количество N-ацетил-L-цистеина; для N, N¹-диацетил-L-цистина, 10% означает, что 10% молярное количество цистинового эквивалента было заменено 10-процентным молярным количеством N, N¹-диацетил-L-цистина. По окончании 14-дневного культивирования,

жидкость для культивирования клеток собирали центрифугированием. Затем супернатант очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А (GE). Элюаты белка А использовали для определения заряженных вариантов путем изокапиллярного фокусирования (ProteinSimple iCE3).

Таблица 4: Различные составы тестируемых подпиток для клеточной линии 1 в биореакторе Ambr15

Используемые аналоги	% цистеина/цистин а, замененного аналогами в подпитке (молярная эквивалентность)*	Молярное отношение к цистеину (аналогу/цистеину)	Молярная концентрация аналога в подпитке (моль/л)	Молярная концентрация цистеинового эквивалента в подпитке (моль/л)	Молярная концентрация цистинового эквивалента в подпитке (ммоль/л)
N-ацетил-L-цистеин (NAC)	10	9,00:1,00	0.03065	0.27584	0,13792
	20	4,00 : 1,00	0.06130	0.24519	0.12259
	30	2,33 : 1,00	0,09195	0,21454	0.10727
	50	1,00 : 1,00	0.15324	0,15324	0,07662
	70	1,00 : 2,33	0.21454	0,09195	0.04597
	80	1,00 : 4,00	0,24519	0.06130	0,03065
	90	1,00 : 9,00	0.27584	0,03065	0,01532
N, N'-диацетил-L-цистин (DINAC)	10	18,00 : 1,00	0,01532	0,27584	0,13792
	20	8,00 : 1,00	0.03065	0,24519	0,12259
	30	4,67 : 1,00	0.04597	0,21454	0.10727
	50	2,00 : 1,00	0.07662	0,15324	0,07662
	70	1,00 : 1,17	0.10727	0,09195	0.04597
	80	1,00:2,00	0,12259	0,06130	0,03065
	90	1,00 : 4,50	0,13792	0,03065	0.01532
Диметилвый эфир N, N'-диацетил-L-цистина (DACDM)	10	18,00 : 1,00	0,01532	0.27584	0,13792
	20	8,00 : 1,00	0,03065	0,24519	0,12259
	30	4,67 : 1,00	0,04597	0.21454	0.10727
	50	2,00 : 1,00	0,07662	0.15324	0,07662
	70	1,00 : 1,18	0.10727	0,09195	0.04597
	80	4,00 : 2,02	0,12259	0,06130	0.03065

	90	1,00 : 4,54	0.13792	0.03065	0.01532
--	----	-------------	---------	---------	---------

* для N-ацетил-L-цистеина, процент замен в расчете на цистеиновый эквивалент

На фигуре 24 показаны профили роста клеток. Аналогичный профиль концентрации жизнеспособных клеток наблюдался в контрольных условиях (без добавления аналога) и в большинстве тестируемых условий. Ингибирование роста наблюдалось при 90% N, N'-диацетил-L-цистина и 90% диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина.

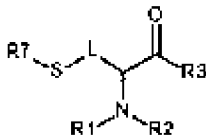
На фигурах 25 и 26 показан ответ на различные уровни замен цистеина/цистина на N, N'-диацетил-L-цистин, диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина или N-ацетилцистин в отношении уровней кислотных молекул и основных заряженных молекул. Для N, N'-диацетил-L-цистина, уровень кислотных молекул снижался по мере увеличения процента замен и достигал максимального снижения до 27,5%. Такое снижение микрогетерогенности подтверждалось положительными различиями в отношении контроля, наблюдаемого на уровне основных заряженных молекул. Оптимальный уровень основных заряженных молекул в случае диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина был получен путем замены 50% и 70% цистеина/цистина. Однако, диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина оказывал позитивное влияние на уровень основных заряженных молекул в пределах от 15% до 90% как показано на эмпирической кривой. Этот результат подтверждается снижением уровня кислотных молекул, также наблюдаемым в случае диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина как показано на фигуре 25. Более низкое воздействие наблюдалось в случае N-ацетилцистеина, причем, оптимальная величина достигалась приблизительно в случае 70%-ной замены с уменьшением уровня кислотных молекул на 12,5%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

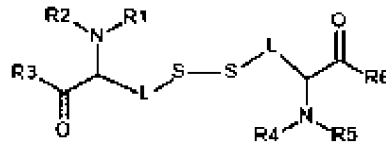
1. Способ снижения гетерогенности популяции рекомбинантных белков, продуцируемых в клеточной культуре, где указанный способ включает культивирование клеток-хозяев, продуцирующих рекомбинантный белок в среде для культивирования клеток, где среда для культивирования клеток содержит один или более аналогов цистеина/цистина, где снижение гетерогенности достигается без значительного уменьшения титра рекомбинантных белков по окончании продуцирования, и где указанное снижение гетерогенности включает снижение:

- a. окраски или интенсивности окраски;
- b. неоднородности заряда, предпочтительно, за счет уменьшения пиков кислотных групп (APG) и/или пиков основных групп (BPG), и при этом, число основных заряженных молекул не уменьшается; и/или
- c. степени окисления аминокислот, предпочтительно, окисления метионина.

2. Способ по п. 1, где аналоги цистеина/цистина включают или состоят из них, одно или более соединений, выбранных из соединений, представленных формулами 1 и 2, и их солей:



1



2

где:

R1, R2, R4 и R5 независимо представляют собой водород, аминокарбонил, C₂₋₂₂ацил, C₁₋₂₂алкил, где указанная группа необязательно замещена одним или двумя заместителями, выбранными из гидрокси и C₁₋₂₂алкокси; C₁₋₂₂гетероалкил, гидроксисульфонил, C₁₋₂₂алкилсульфонил или C₅₋₂₂арилсульфонил;

R3 и R6 независимо представляют собой гидрокси, NH₂; C₁₋₂₂алкокси, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила могут быть, но необязательно, заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₂₂ алкиламино, где указанная группа необязательно замещена гидрокси или C₁₋₂₂алкилом; гидроксиямино; C₁₋₂₂алкоксиамино; C₁₋₂₂алкиламино, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; C₁₋₂₂гетероалкиламино; ди(C₁₋₂₂алкил)амино, который необязательно замещен гидрокси; ди(C₁₋₂₂алкил)амино, где один или более атомов углерода C₁₋₂₂алкила заменены арилом или гетероарилом; или ди(C₁₋₂₂гетероалкил)амино;

R7 представляет собой водород, фосфат или сульфат.

L представляет собой необязательно замещенную C₁₋₁₀алкиленовую цепь; при условии, что соединение не является цистеином или цистином.

3. Способ по любому из п.п. 1-2, где аналоги цистеина/цистина выбраны из группы, состоящей из диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина, N-ацетил-L-цистеина и N, N'-диацетил-L-цистина или S-сульфоцистеина.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где аналоги цистеина/цистина выбраны из группы, состоящей из диметилового эфира N, N'-диацетил-L-цистина, N-ацетил-L-цистеина и N, N'-диацетил-L-цистина.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная среда для культивирования клеток содержит:

(а) аналоги цистеина/цистина; и

(б) цистеин и/или цистин,

где молярное отношение (а) к (б) составляет от 1:18 до 18:1.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где способ включает стадии:

(i) инокуляции указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(а) аналогов цистеина/цистина; и/или

(б) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождения культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(а) аналоги цистеина/цистина; и/или

(б) цистеин и/или цистин,

где (а) и (б) могут быть добавлены одновременно или последовательно, и

где, в случае объединения содержимого базальной среды и всех добавок, молярное отношение (а) к (б) составляет от 1:18 до 18:1.

7. Способ по п. 5 или 6, где указанное молярное отношение (а) к (б) составляет от 1:15 до 15:1, например, от 1:12 до 12:1, например, от 1:10 до 10:1, например, от 1:8 до 8:1, например, от 1:6 до 6:1, например, от 1:4 до 4:1, например, от 1:3 до 3:1, например, от 1:2 до 2:1, например, от 1,5:1 до 1:1,5.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная среда для культивирования клеток содержит:

(а) аналоги цистеина/цистина; и

(б) цистеин и/или цистин,

где молярное количество (а) составляет от 10 до 90 процентов от общего молярного количества (а) и (б), где, в случае использования аналога цистеина, молярное количество (б) вычисляют в расчете на цистеиновые эквиваленты; и

где в случае использования аналога цистина, молярное количество (б) вычисляют в расчете на цистиновые эквиваленты.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, где способ включает стадии:

(i) инокуляции указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(а) аналогов цистеина/цистина; и/или

(б) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождения культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок

продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(а) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (а) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно,

где, в случае объединения содержимого базальной среды и общего количества добавок, молярное количество (а) в расчете на общее молярное количество (а) и (b) составляет от 10 до 90 процентов, где, в случае использования аналога цистеина, молярное количество (b) вычисляют в расчете на цистеиновый эквивалент; и

где в случае использования аналога цистина, молярное количество (b) вычисляют в расчете на цистиновый эквивалент.

10. Способ по любому из п.п. 6-9, где концентрация (b) в указанной базальной среде эквивалентна 0,05-5 ммоль/л цистеина, например 0,1-1 ммоль/л, например 0,2-0,6 ммоль/л.

11. Способ по любому из п.п. 6-10, где во время фазы продуцирования, в среду добавляют (а) аналоги цистеина/цистина и (b) цистеин и/или цистин, где сумма (а) и (b), добавленных в культуру во время всей фазы продуцирования, эквивалентна 1-75 ммоль/л цистеина, такой как 2-20 ммоль/л.

12. Способ по любому из п.п. 6-10, где во время фазы продуцирования, в среду добавляют (а) аналоги цистеина/цистина и (b) цистеин и/или цистин, где ежедневное добавление доводит концентрацию (а) + (b) до концентрации, эквивалентной 0,05-5 ммоль/л цистеина, такой как 0,1-1 ммоль/л.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих, а предпочтительно клетки CHO.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, где рекомбинантный белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой:

i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

а. содержат CDR-H1, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 1; CDR-H2, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 2; CDR-H3, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 3; CDR-L1, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 4; CDR-L2, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 5, и CDR-L3, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 6; или

б. содержат переменную область легкой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 7, и переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 8; или

с. содержат переменную область легкой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична

последовательности, определенной в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область тяжелой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 8;

d. содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 7, и тяжелую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 11; или

e. содержат вариабельную область легкой цепи, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 7, и тяжелую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 11; или

ii) антитело, которое содержит легкую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую последовательность, определенную в SEQ ID NO: 10; или

iii) антитело, которое содержит легкую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, последовательность которой по меньшей мере на 80%, а предпочтительно, на 90% идентична или аналогична последовательности, определенной в SEQ ID NO: 10.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, где рекомбинантный белок представляет собой белок, который не является бесцветным при концентрации 10 мг/мл или более, такой как 50 мг/мл или более, если он продуцируется клетками-хозяевами, выращенными в среде для культивирования клеток, не содержащей аналогов цистеина/цистина.

17. Способ получения препарата рекомбинантного белка, включающий:

(i) инокуляцию указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(a) аналогов цистеина/цистина по любому из п.п. 2-4; и/или

(b) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождение культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(a) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (a) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно, и

где, в случае объединения содержимого базальной среды и всех добавок, молярное отношение (a) к (b) составляет от 1:18 до 18:1.

18. Способ получения препарата рекомбинантного белка, включающий:

(i) инокуляцию указанных клеток-хозяев в базальной среде, где базальная среда содержит, но необязательно, исходное количество:

(a) аналогов цистеина/цистина по любому из п.п. 2-4; и/или

(b) цистеина и/или цистина,

(ii) прохождение культуры через фазу продуцирования, где рекомбинантный белок продуцируется клетками, и где во время указанной фазы продуцирования, в среду для культивирования клеток добавляют:

(a) аналоги цистеина/цистина; и/или

(b) цистеин и/или цистин,

где (a) и (b) могут быть добавлены одновременно или последовательно,

где, в случае объединения содержимого базальной среды и всех добавок, молярное количество (a) в расчете на общее молярное количество (a) и (b) составляет от 10 до 90 процентов, где, в случае использования аналога цистеина, молярное количество (b) вычисляют в расчете на цистеиновый эквивалент; и

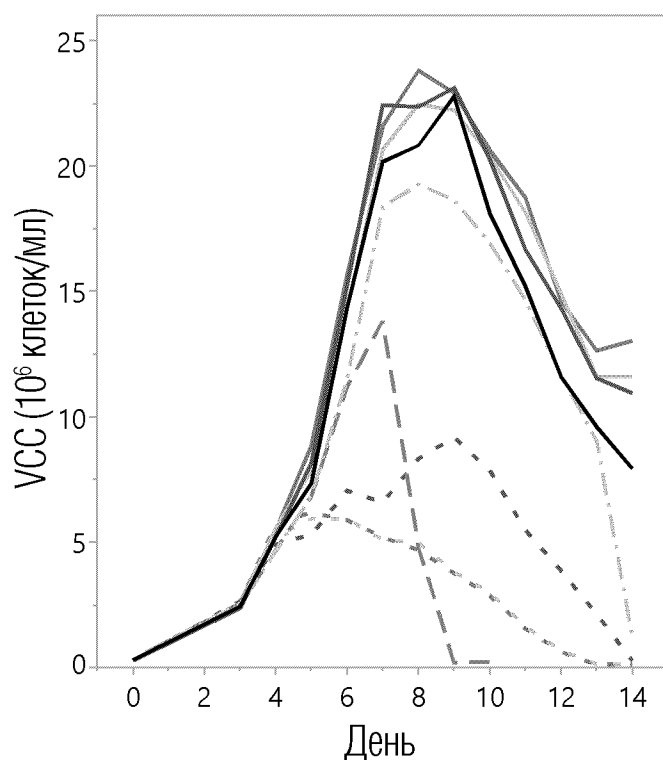
где в случае использования аналога цистина, молярное количество (b) вычисляют в расчете на цистиновый эквивалент.

19. Препарат рекомбинантного белка, получаемый или полученный способом по любому из предшествующих пунктов.

20. Среда для культивирования клеток, подходящая для культивирования клеток млекопитающих и содержащая диметиловый эфир N, N'-диацетил-L-цистина.

По доверенности

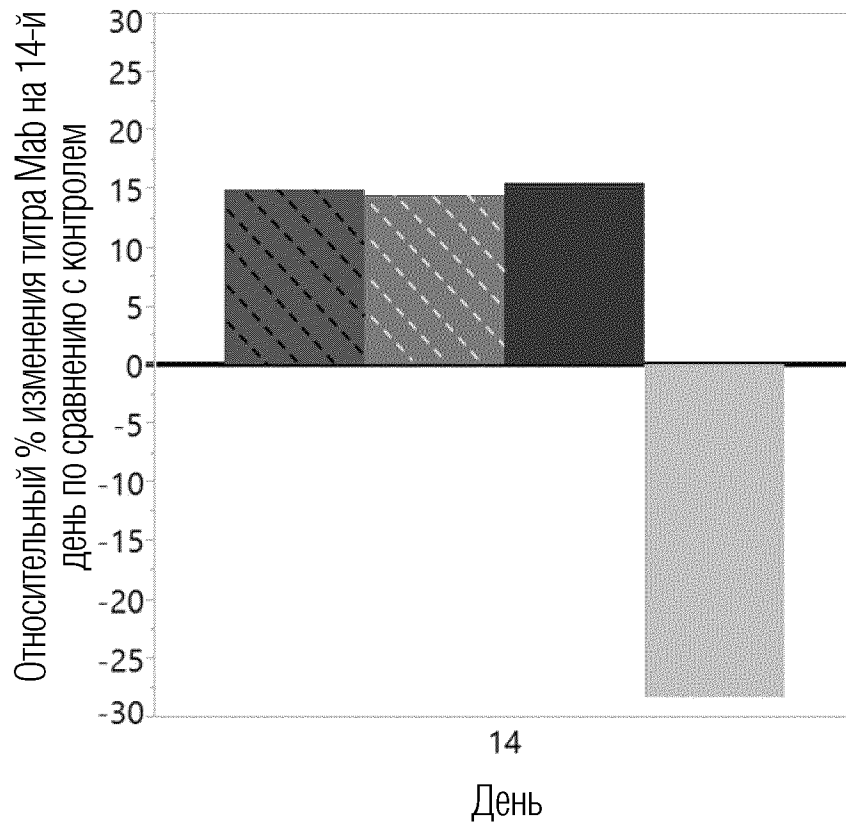
Фигура 1: Концентрация жизнеспособных клеток



Пояснение к графику:

- Подпитка 100% цистеином в качестве контроля
- Подпитка 100% N-ацетилцистеином
- Подпитка 100% N, N'-диацетилцистеином
- Подпитка 100% диметилэфиром N, N'-диацетил-L-цистина
- Подпитка 100% S-сульфоцистеином
- Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином
- Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- Подпитка 50% диметилэфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- Подпитка 100% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

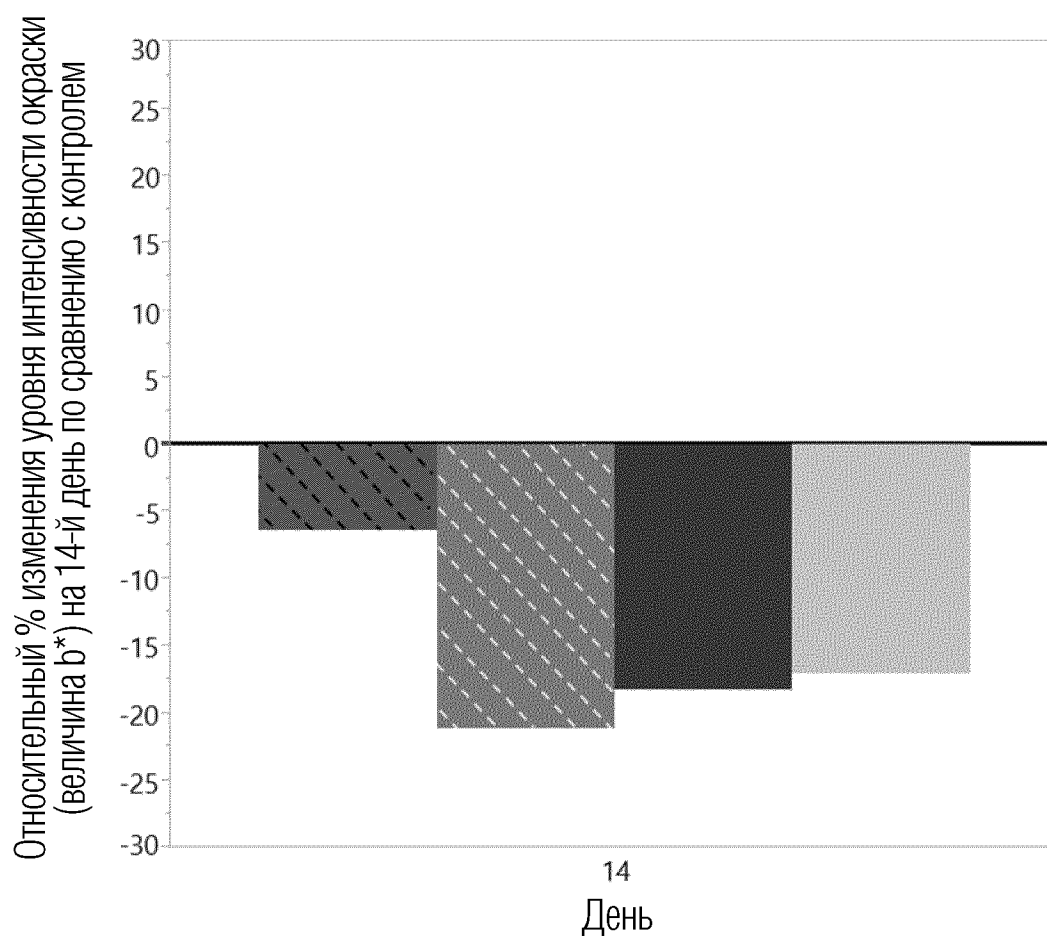
Фигура 2: Относительный % изменения титра Mab на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином)



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- ▩ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- ▧ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

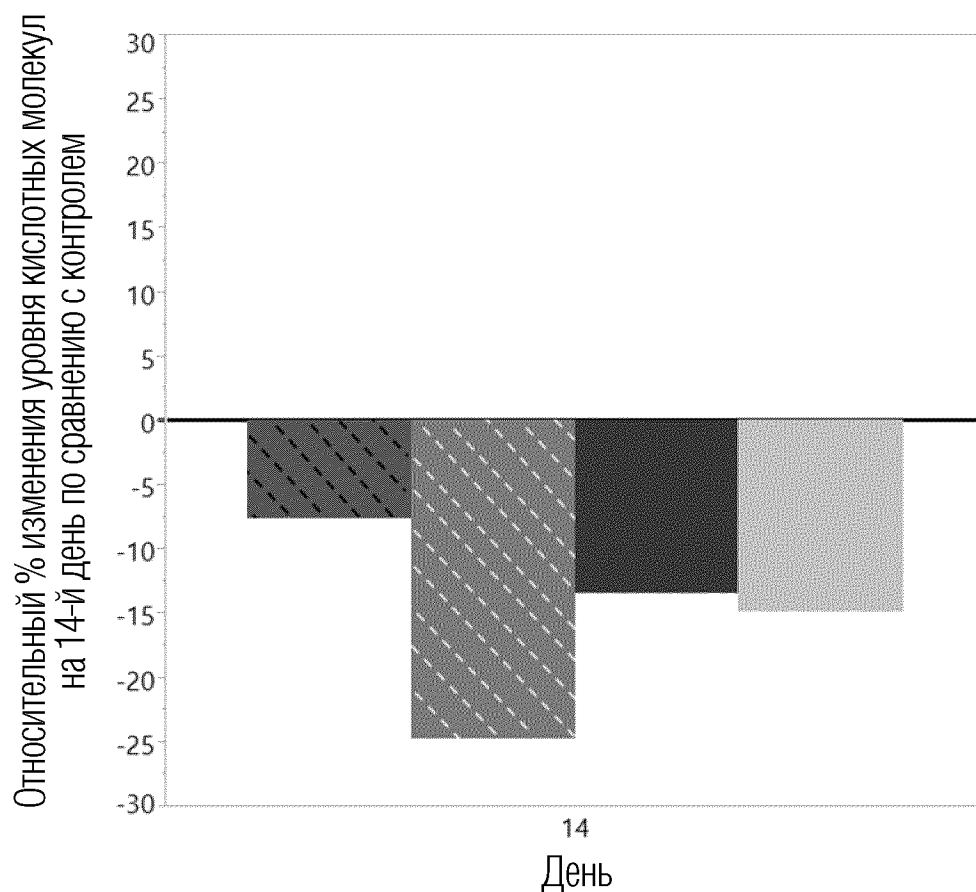
Фигура 3: Относительный % изменения уровня интенсивности окраски (величина b^*) на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином)



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- ▩ Подпитка 50% диметиловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- ▒ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

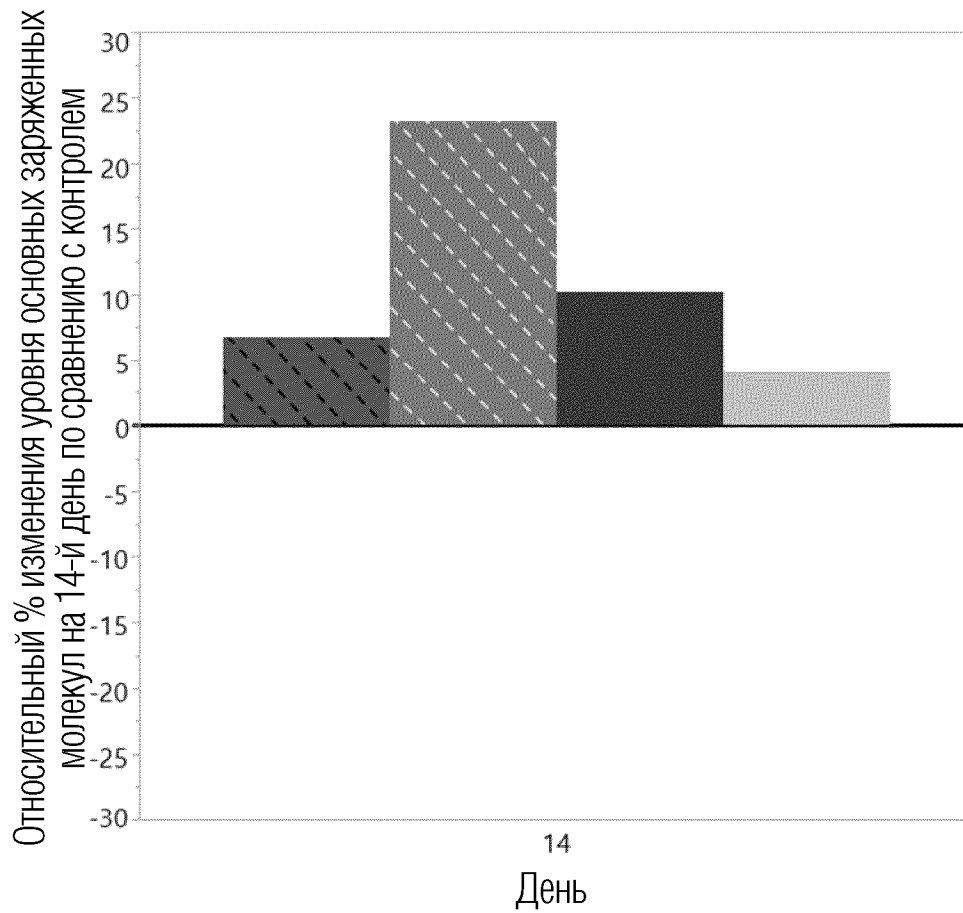
Фигура 4: Относительный % изменения уровня кислотных молекул на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином)



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- ▩ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- ▒ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

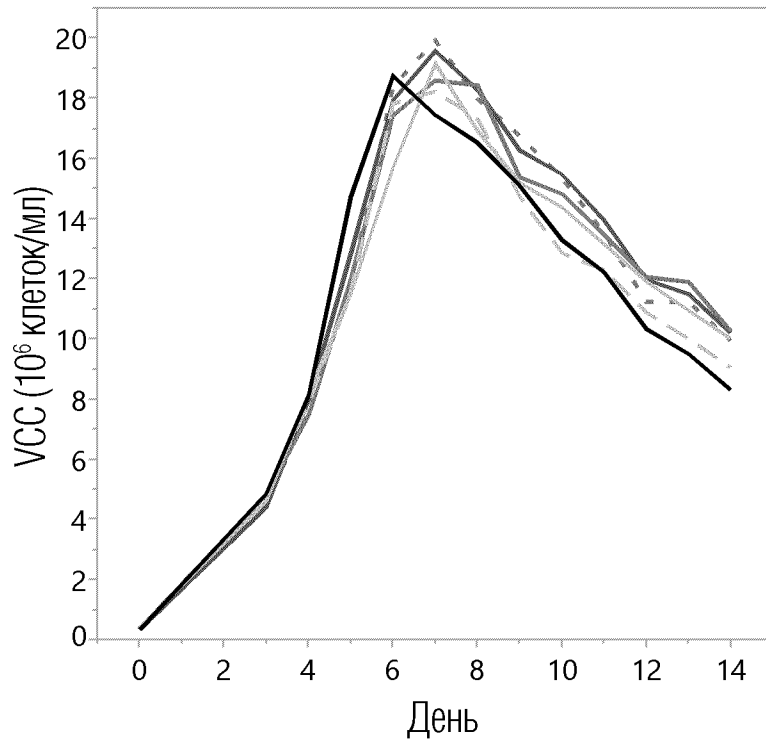
Фигура 5: Уровень основных заряженных молекул на 14-й день



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- ▩ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- ░ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

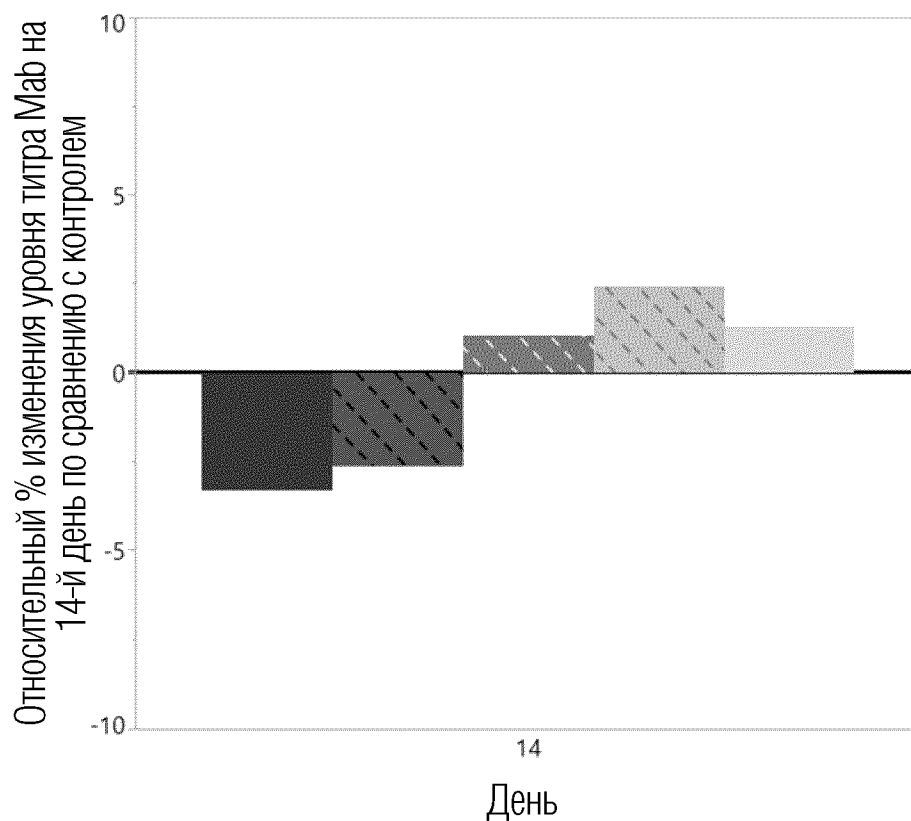
Фигура 6: Концентрации жизнеспособных клеток



Пояснение к графику:

- Подпитка 100% цистеином в качестве контроля, n=2
- Подпитка 50% цистеином
- Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином
- Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

Фигура 7: Относительный % изменения уровня титра Mab на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином)



Пояснение к графику:

■ Подпитка 50% цистеином

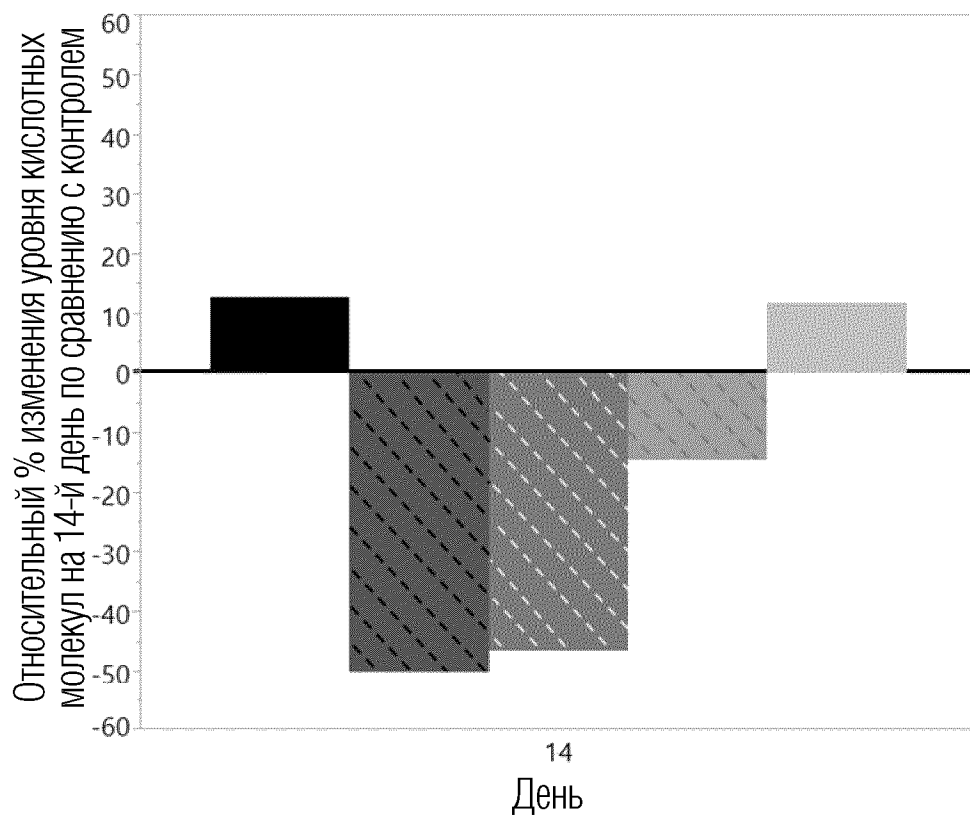
▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистином и 50% цистеином

▩ Подпитка 50% диметиловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином

▧ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином

▦ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

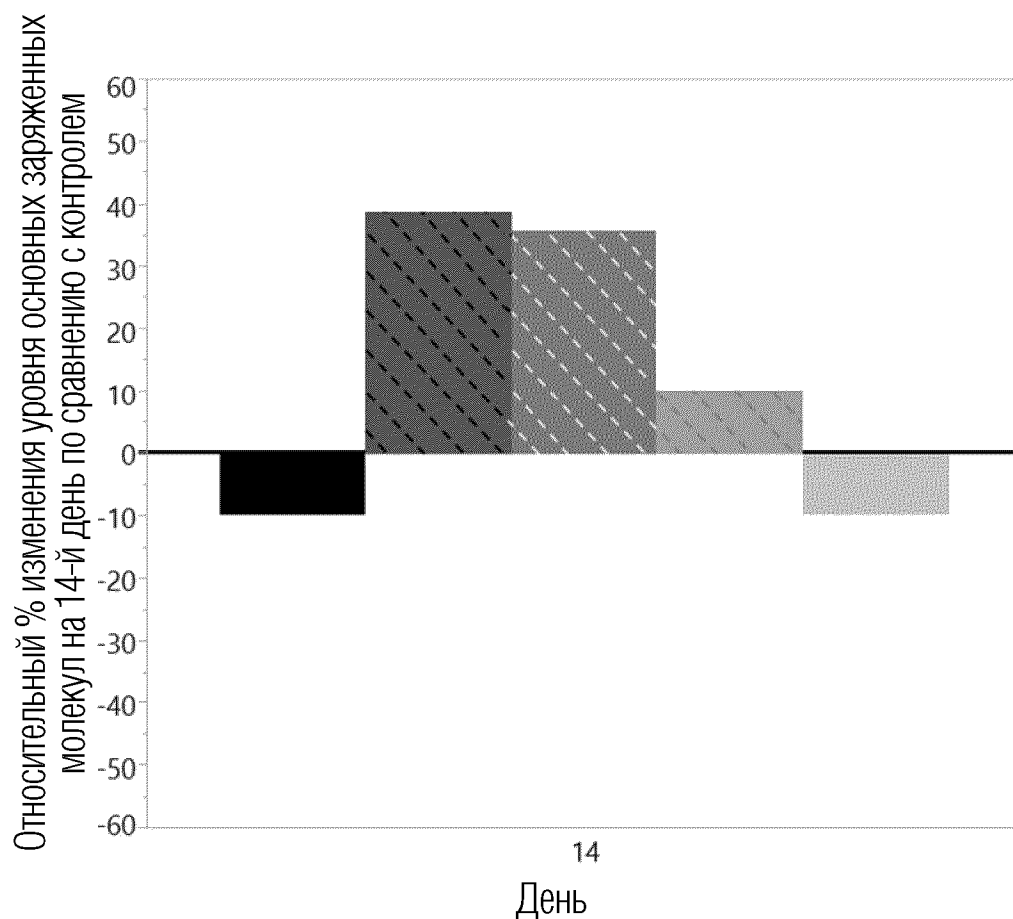
Фигура 8: Относительный % изменения уровня кислотных молекул на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином)



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% цистеином
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистином и 50% цистеином
- ▩ Подпитка 50% диметилowym эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- ▧ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином
- ▦ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

Фигура 9: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул на 14-й день по сравнению с контролем (подпитка 100% цистеином)

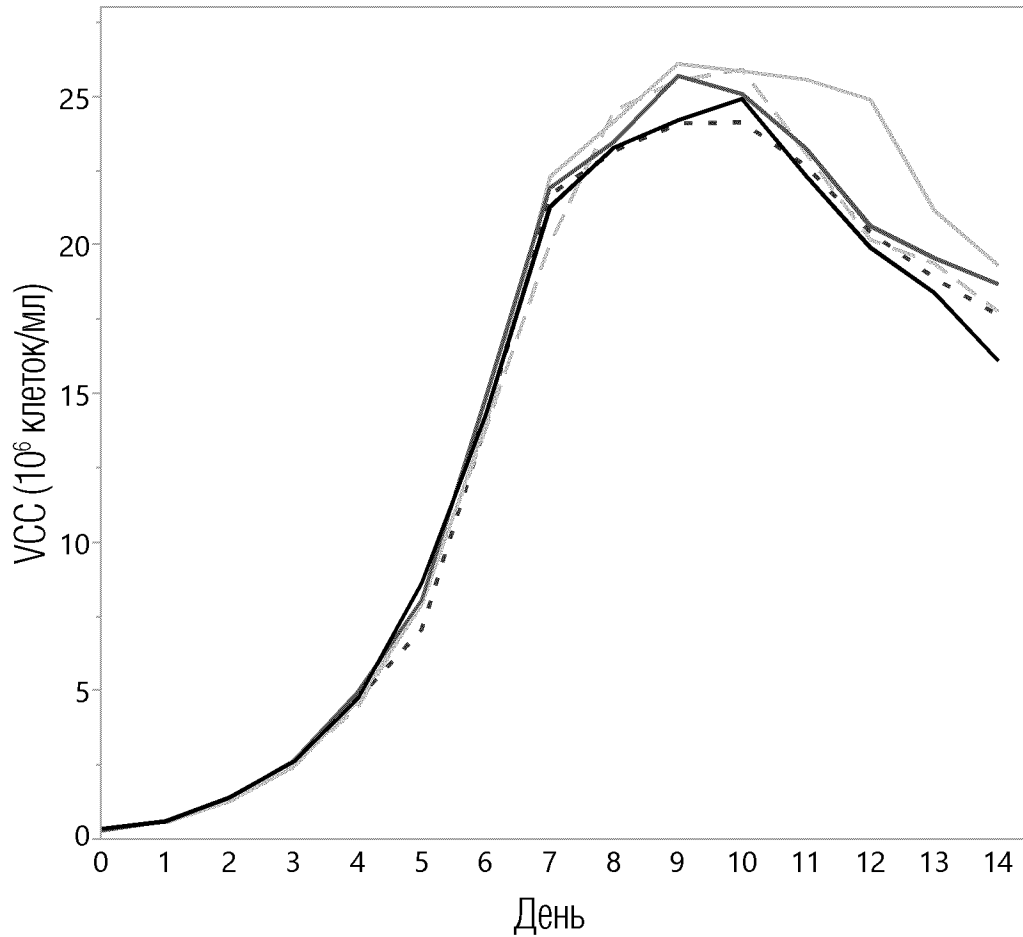


Пояснение к графику:

- Подпитка 50% цистеином
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- ▩ Подпитка 50% диметиловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- ▧ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином
- ▦ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

10/26

Фигура 10: Профиль роста клеток для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе

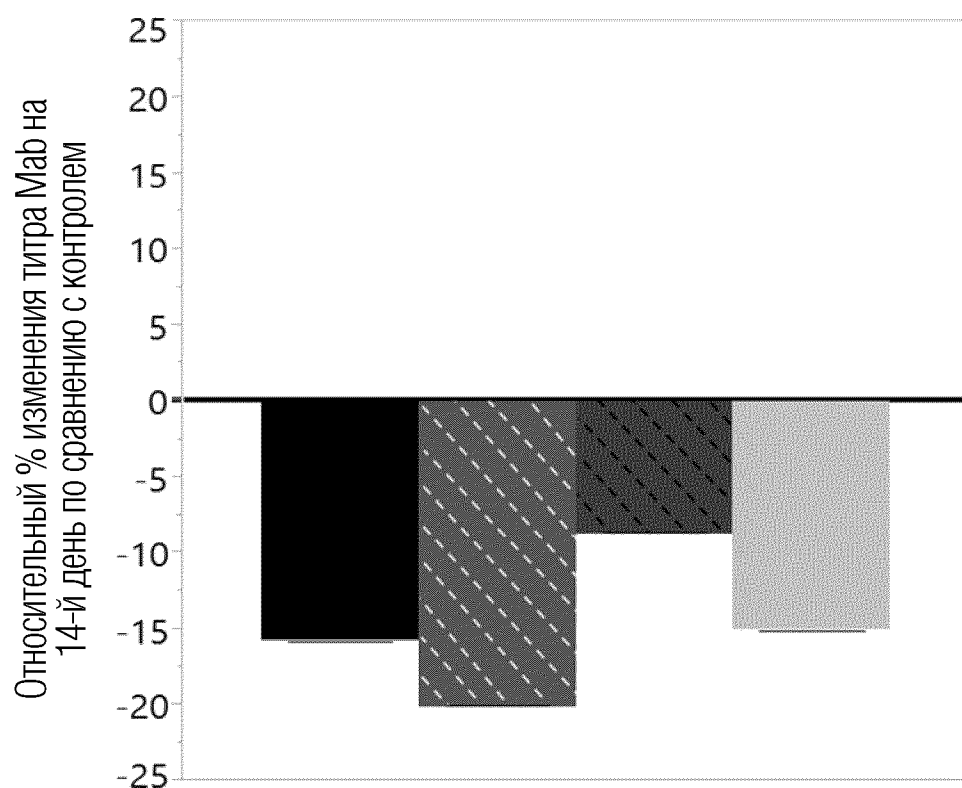


Пояснение к графику:

- Подпитка 100% цистеином в качестве контроля
- Подпитка 50% цистеином
- Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином
- Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином

11/26

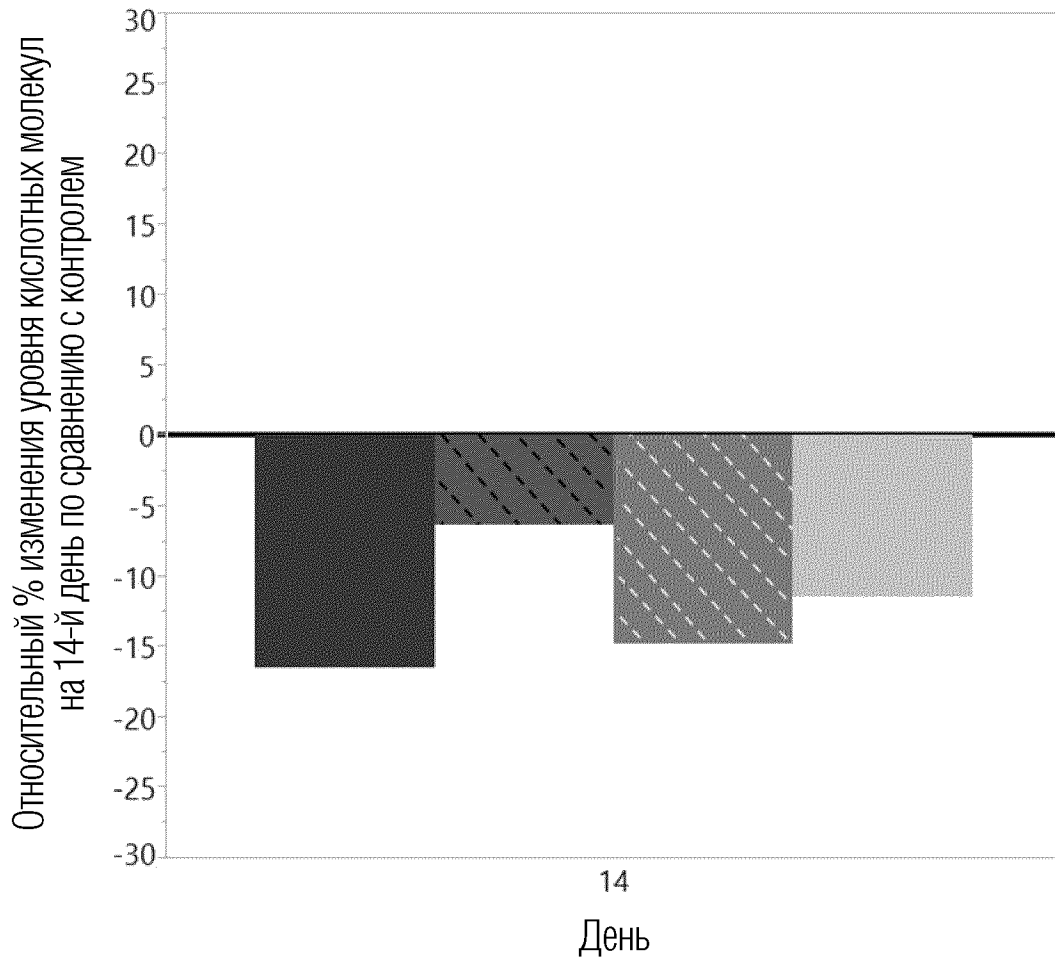
Фигура 11: Относительный % изменения титра Mab по сравнению с контролем для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% цистеином
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- ▩ Подпитка 50% диметилowym эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- ▒ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином

Фигура 12: Относительный % изменения уровня кислотных молекул по сравнению с контролем для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе



Пояснение к графику:

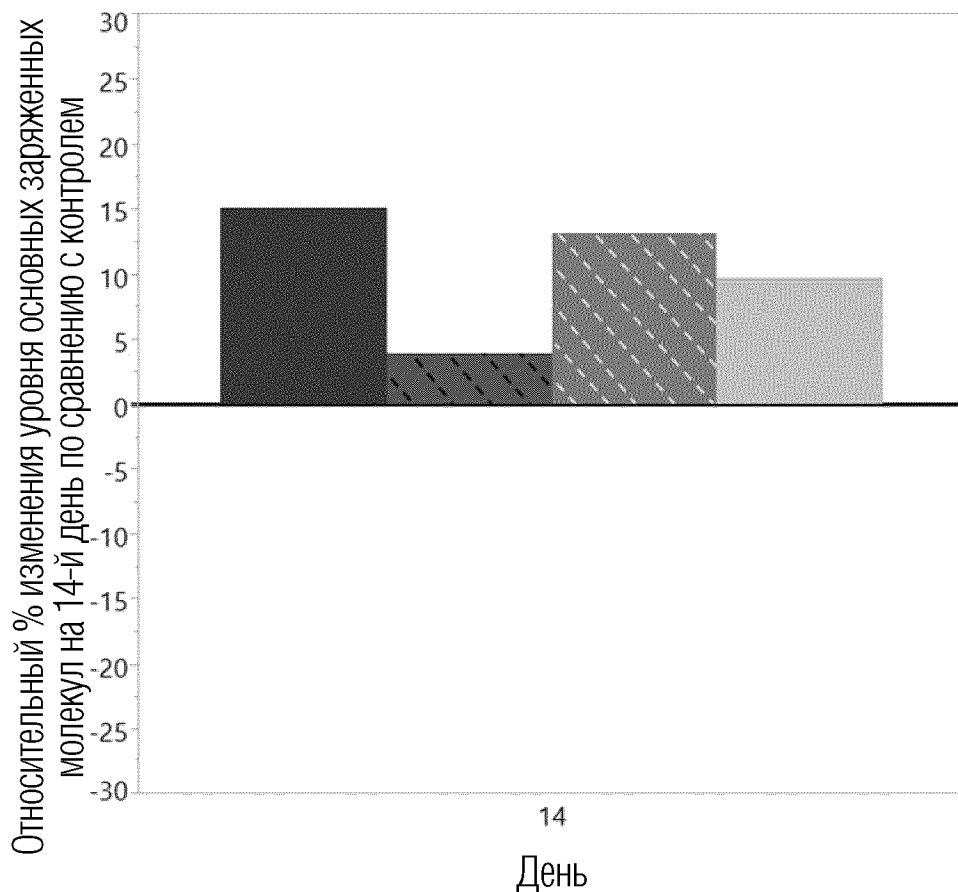
■ Подпитка 50% цистеином

▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином

▩ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином

░ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином

Фигура 13: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул по сравнению с контролем для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе



Пояснение к графику:

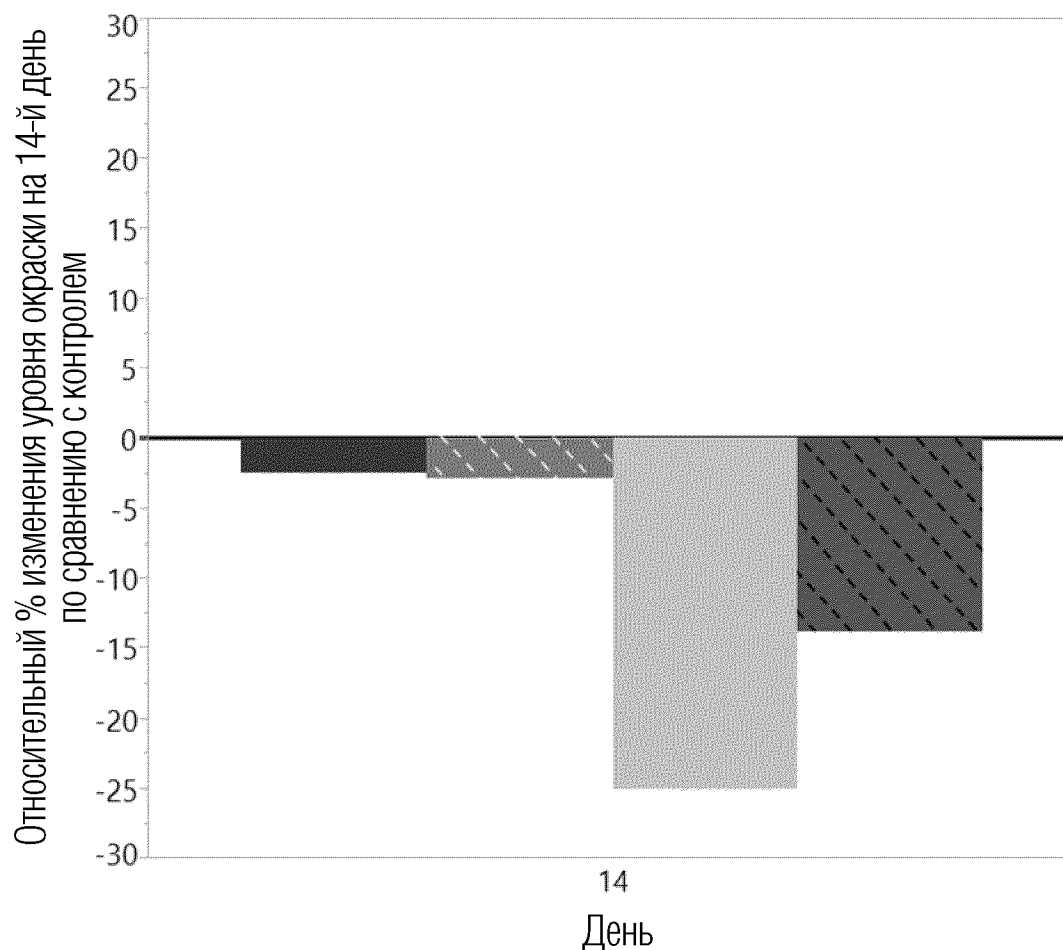
■ Подпитка 50% цистеином

▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином

▩ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином

░ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином

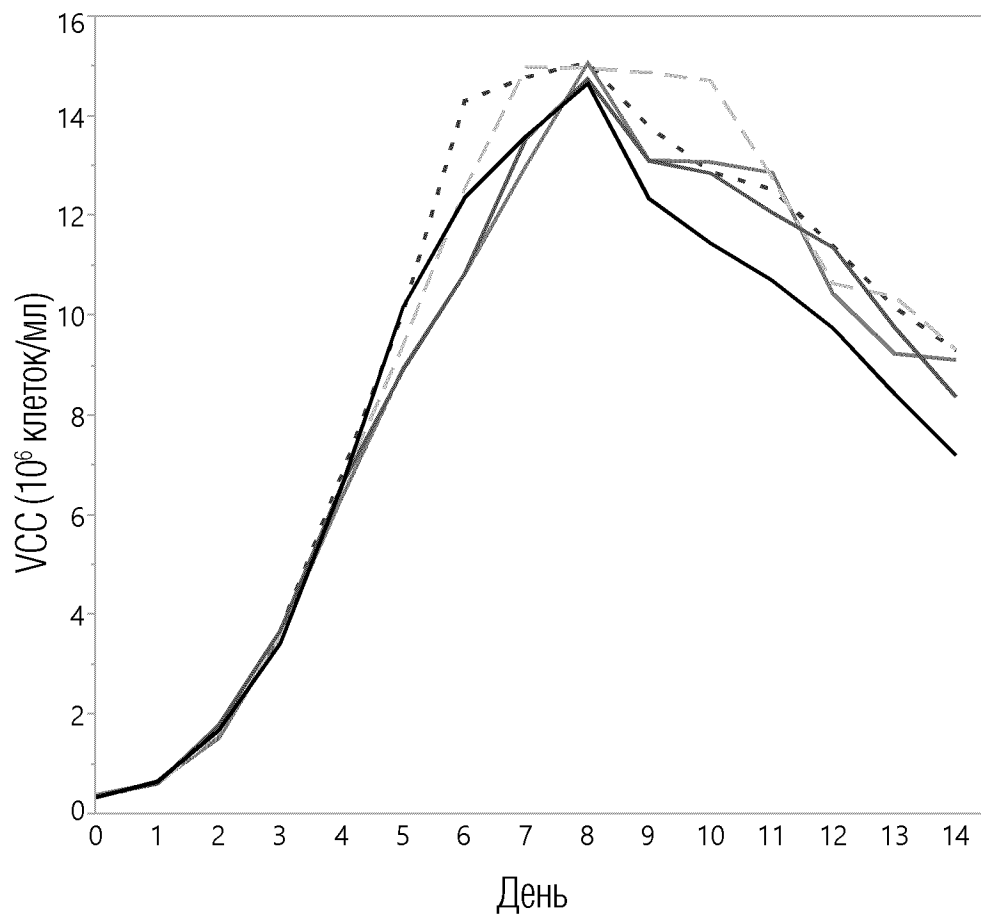
Фигура 14: Относительный % изменения уровня интенсивности окраски (величина b^*) по сравнению с контролем для клеточной линии 1 в 2 л-биореакторе



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% цистеином
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином
- ▩ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином
- ▤ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином

Фигура 15: Профиль роста клеток для клеточной линии 2 в 2 л-биореакторе



Пояснение к графику:

— Подпитка 100% цистеином в качестве контроля

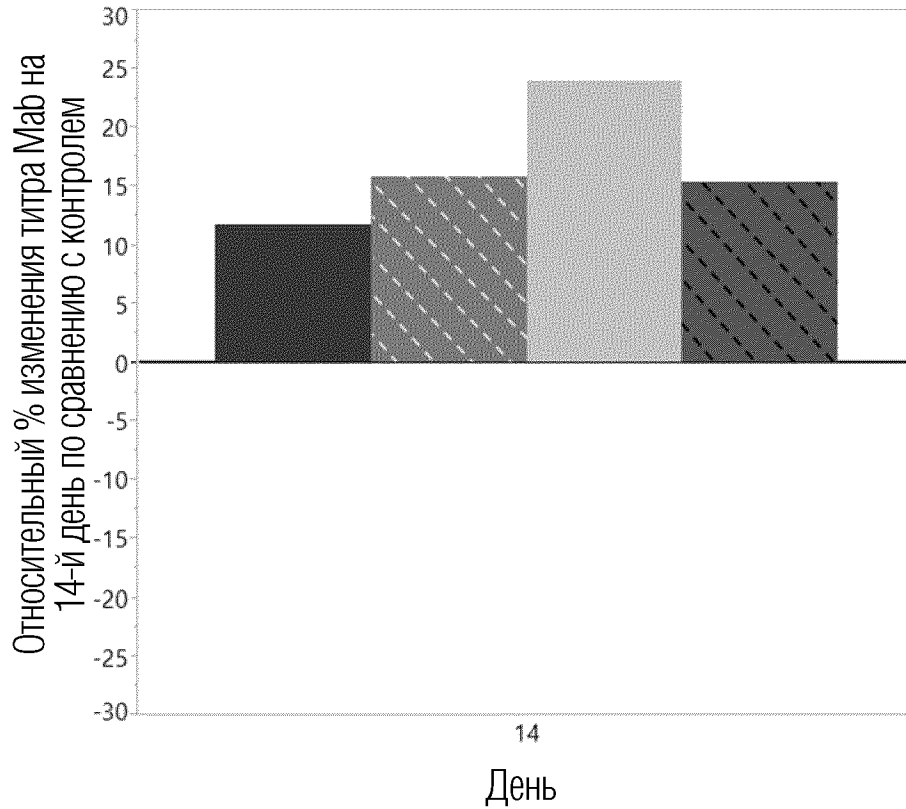
..... Подпитка 50% цистеином

— Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином

--- Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином

— Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином

Фигура 16: Относительный % изменения титра Mab по сравнению с контролем для клеточной линии 2 в 2 л-биореакторе



Пояснение к графику:

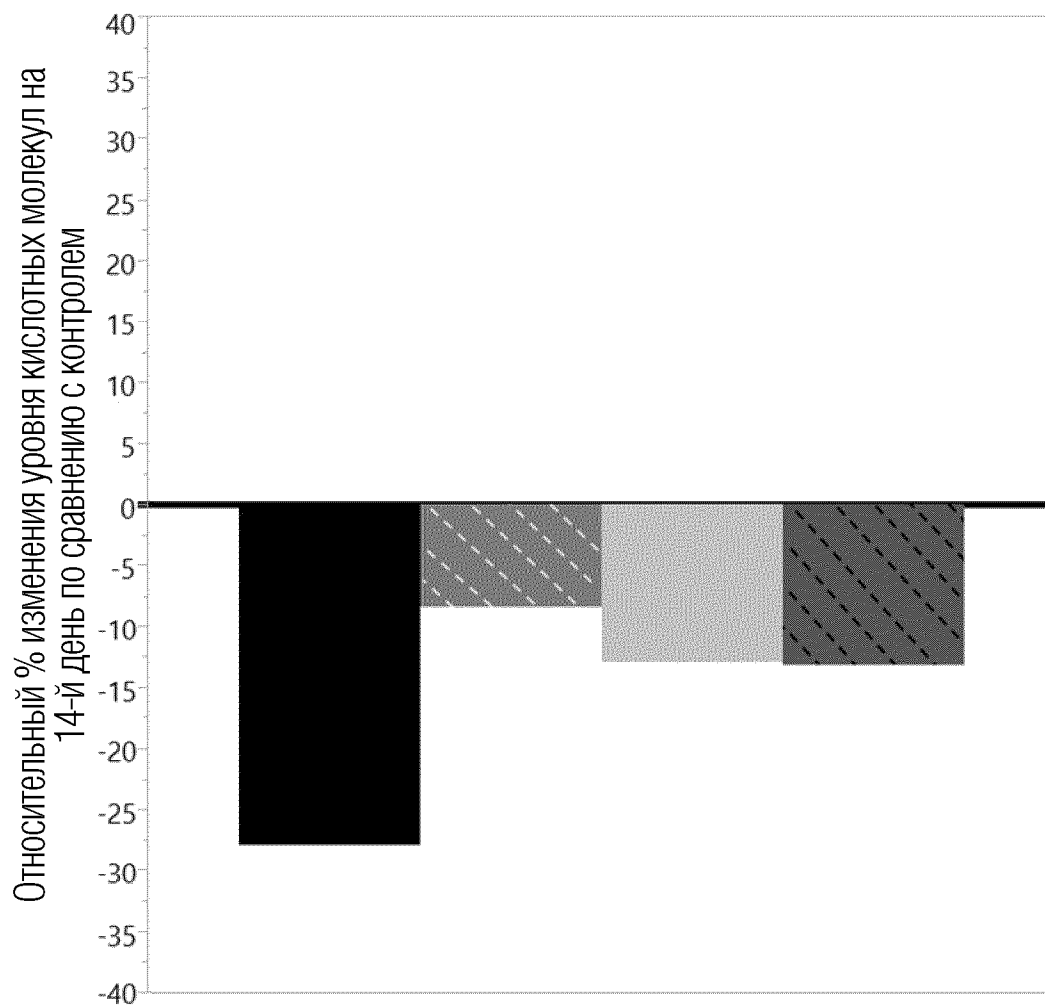
■ Подпитка 50% цистеином

▨ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином

▩ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином

▫ Подпитка 50% диметиловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином

Фигура 17: Относительный % изменения уровня кислотных молекул по сравнению с контролем для клеточной линии 2 в 2 л-биореакторе



Пояснение к графику:

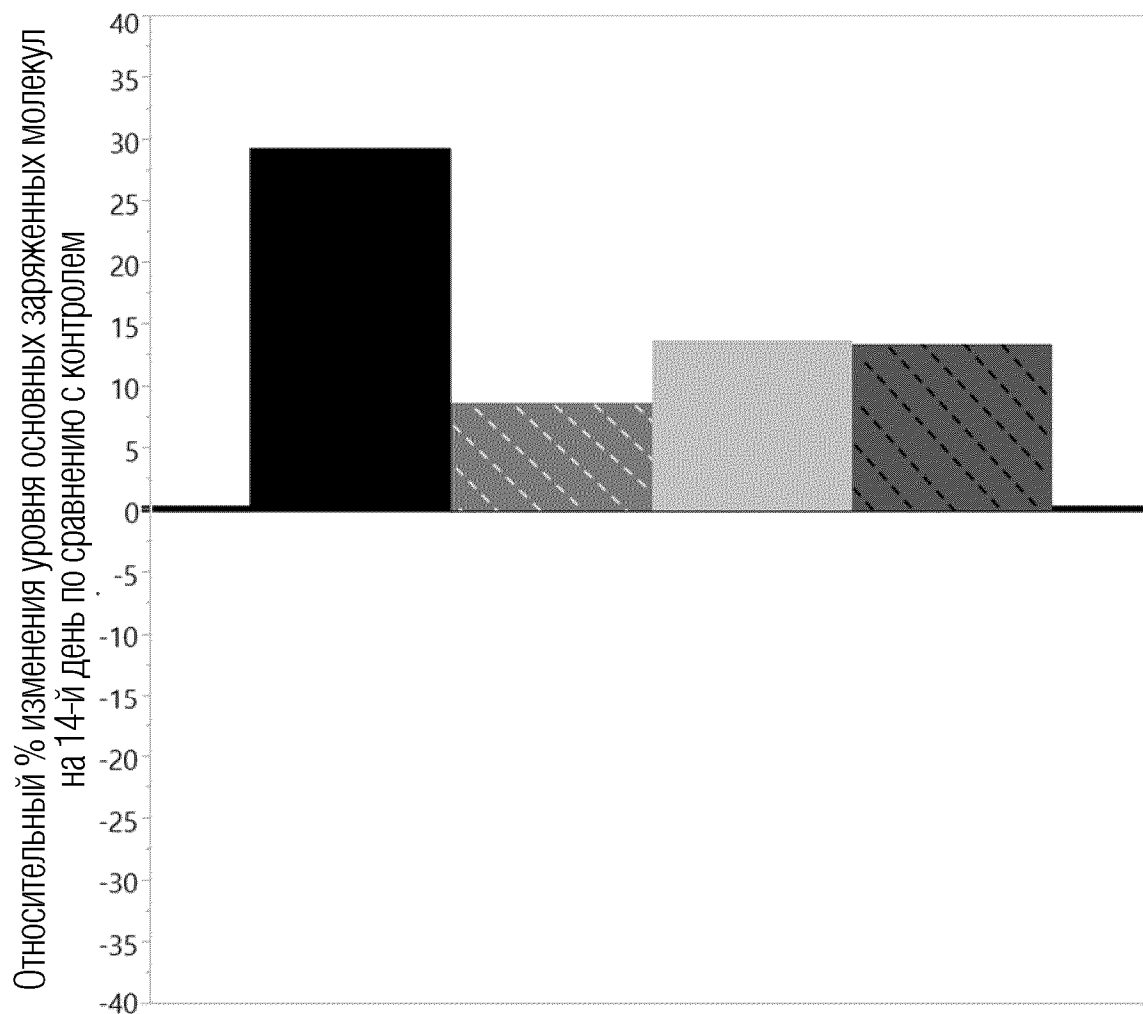
■ Подпитка 50% цистеином

▨ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином

▩ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистином и 50% цистеином

▧ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином

Фигура 18: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул по сравнению с контролем для клеточной линии 2 в 2 л-биореакторе



Пояснение к графику:

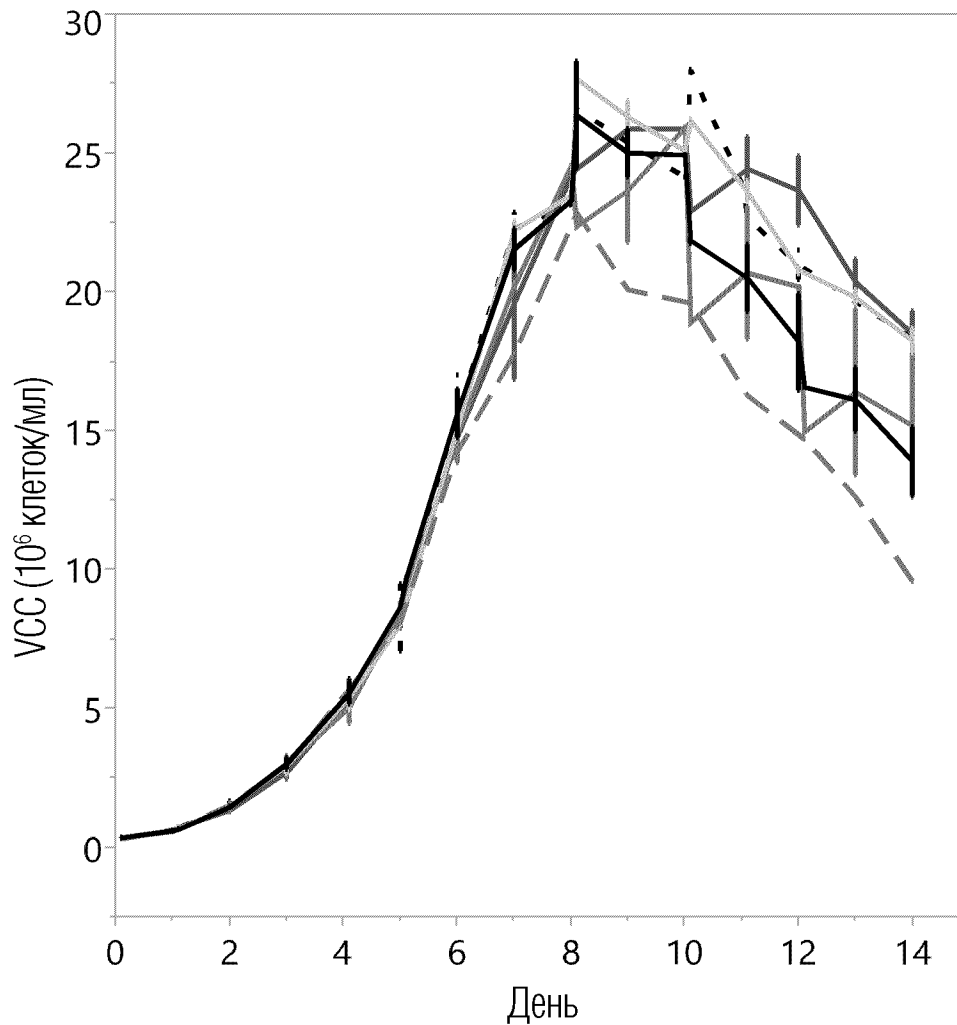
■ Подпитка 50% цистеином

▨ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином

▩ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином

▨ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином

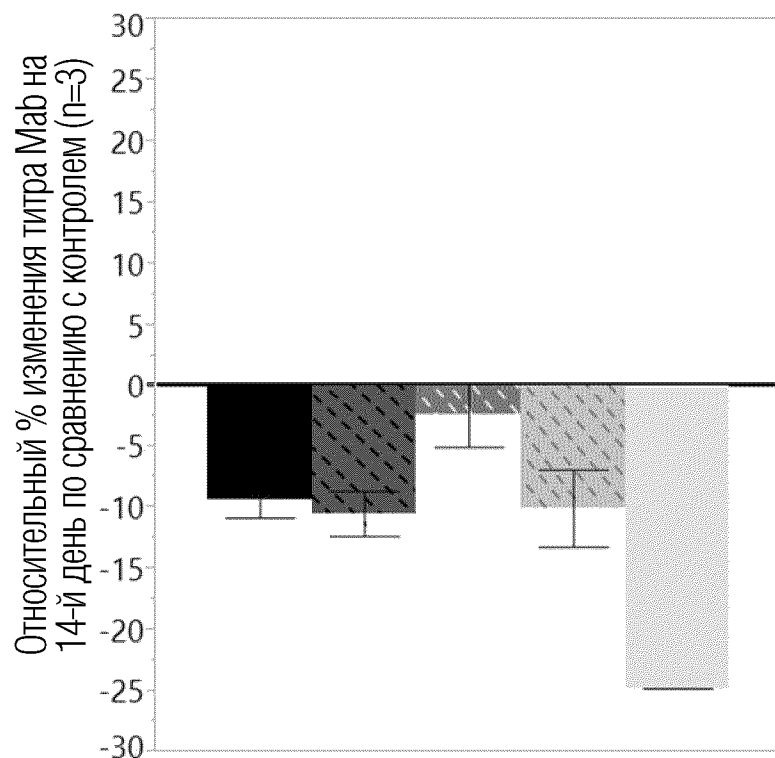
Фигура 19: Усредненный профиль роста клеток, исходя из набора данных 1 и 2, в 2 л-биореакторах (величины ошибок=1SD)



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% цистеином, n=2
- Подпитка 50% N, N'-диацетилцистином и 50% цистеином, n=2
- Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином, n=2
- Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином, n=2
- Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином, n=2
- Контроль: Подпитка 100% цистеином

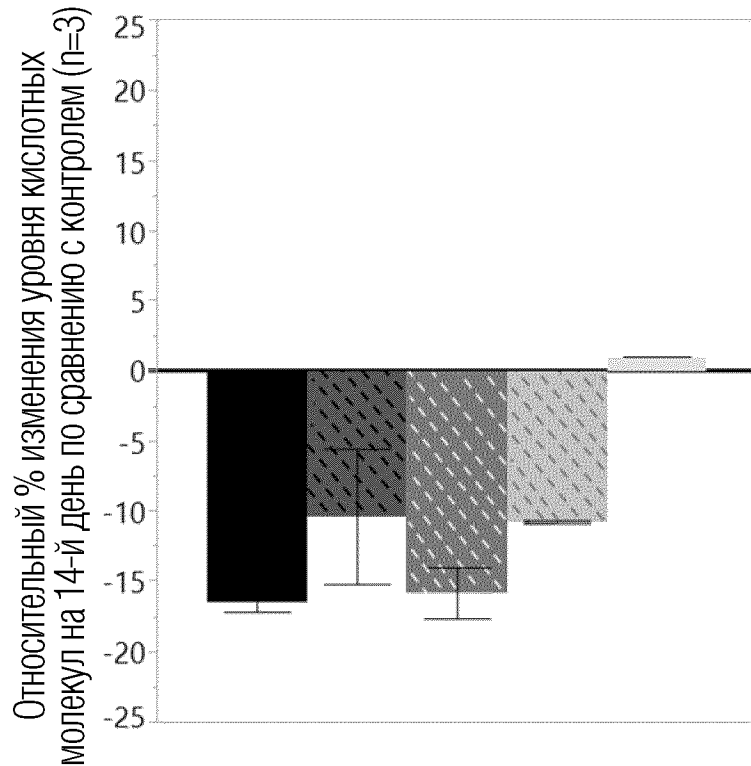
Фигура 20: Относительный % изменения титра Mab по сравнению с контролем. Усредненные величины для набора данных 1 и 2 (величины ошибок=1 SD)



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% цистеином, n=2
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином, n=2
- ▩ Подпитка 50% диметилowym эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином, n=2
- ▤ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином, n=2
- ▥ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

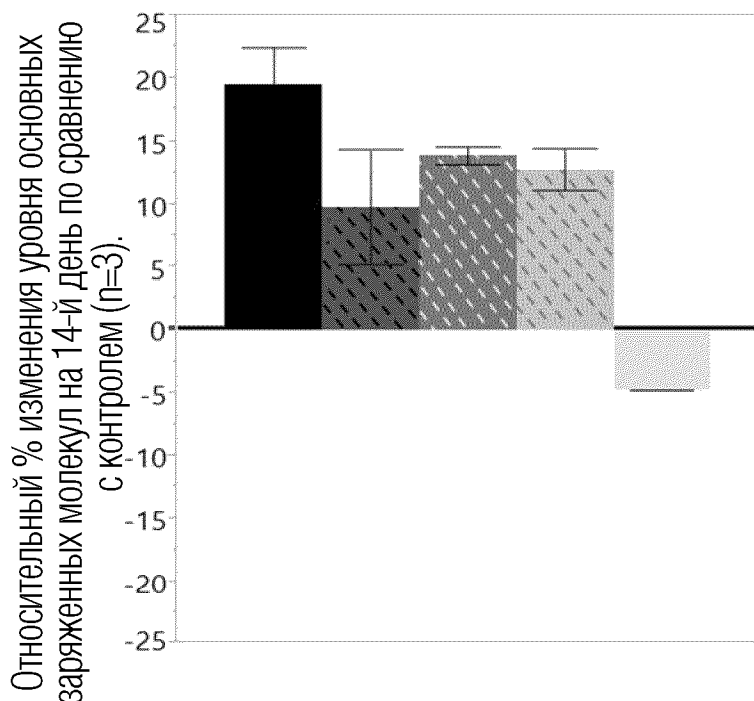
Фигура 21: Относительный % изменения уровня кислотных молекул по сравнению с контролем. Усредненные величины для набора данных 1 и 2 (величины ошибок=1 SD).



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% цистеином, n=2
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином, n=2
- ▩ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином, n=2
- ▧ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином, n=2
- ▦ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

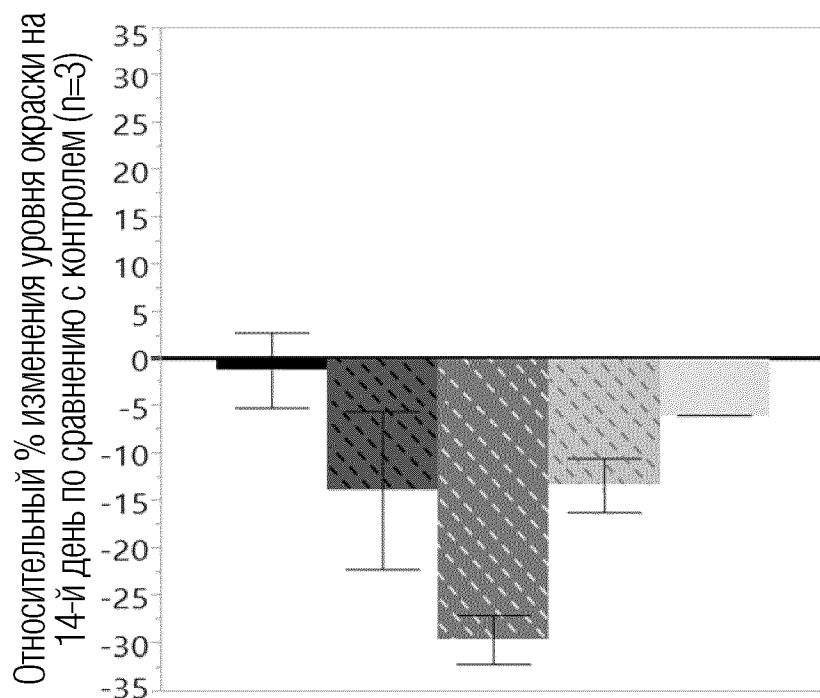
Фигура 22: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул по сравнению с контролем. Усредненные величины для набора данных 1 и 2 (величины ошибок=1 SD)



Пояснение к графику:

- Подпитка 50% цистеином, n=2
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином, n=2
- ▩ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином, n=2
- ▧ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином, n=2
- ▦ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

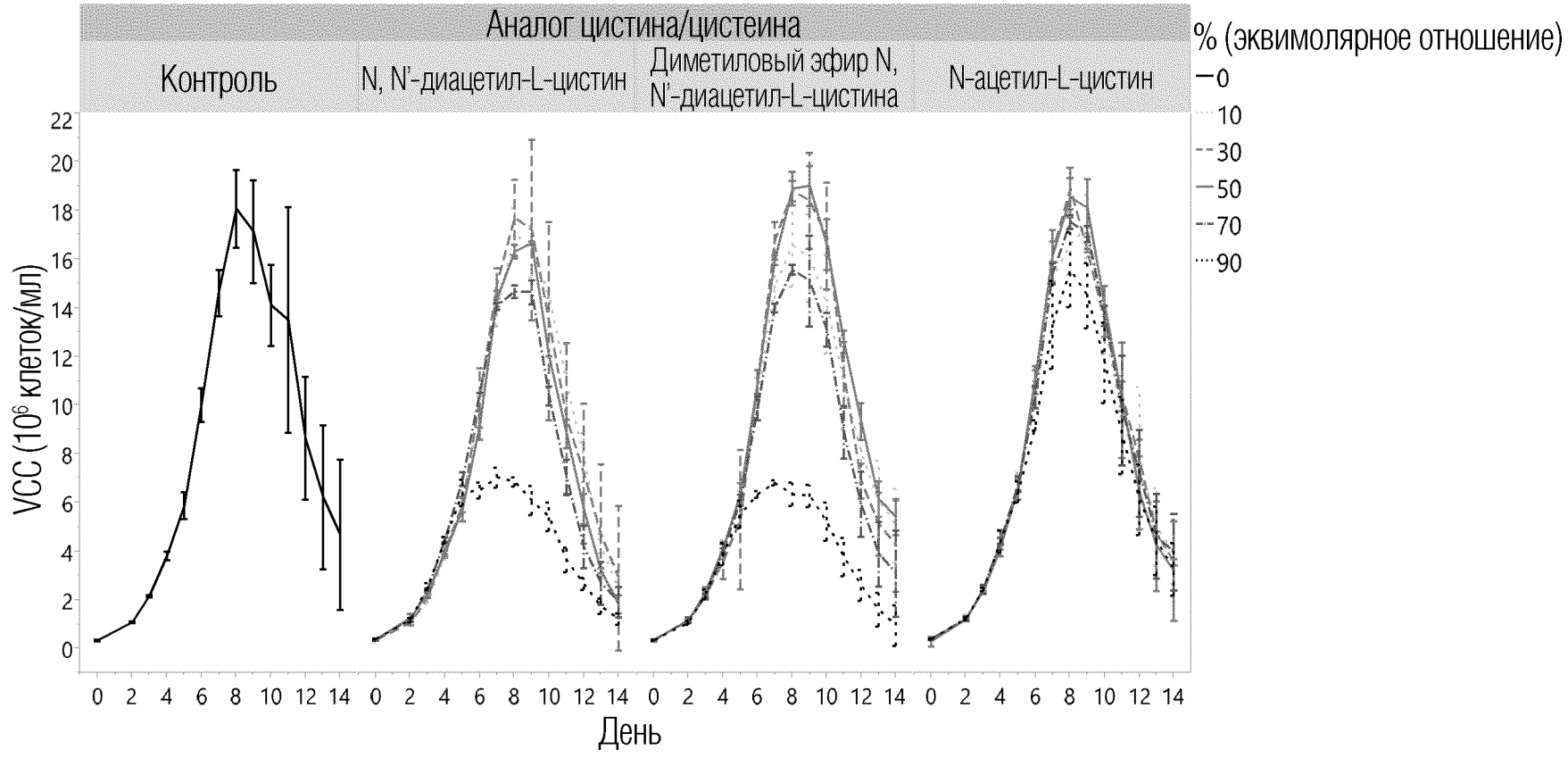
Фигура 23: Относительный % изменения уровня интенсивности окраски (величина b^*) по сравнению с контролем. Усредненные величины для набора данных 1 и 2 (величины ошибок=1 SD)



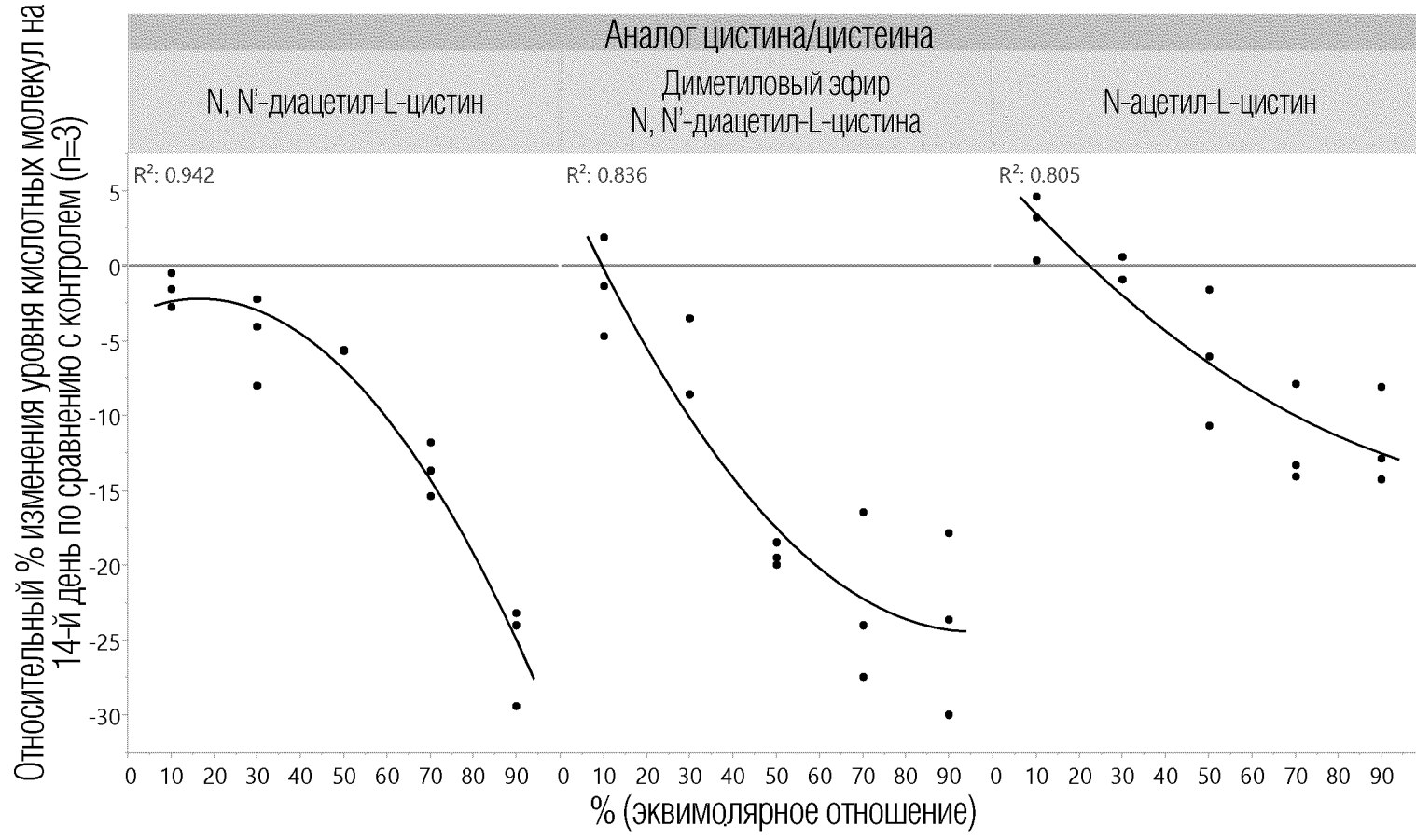
Пояснение к графику:

- Подпитка 50% цистеином, n=2
- ▨ Подпитка 50% N, N'-диацетилцистеином и 50% цистеином, n=2
- ▩ Подпитка 50% диметилловым эфиром N, N'-диацетил-L-цистина и 50% цистеином, n=2
- ▧ Подпитка 50% N-ацетилцистеином и 50% цистеином, n=2
- ▦ Подпитка 50% S-сульфоцистеином и 50% цистеином

Фигура 24: Профиль роста клеток для клеточной линии 1 в 15 мл-биореакторе



Фигура 25: Относительный % изменения уровня кислотных молекул по сравнению с контролем в ответ на различные уровни аналога цистеина/цистина



Фигура 26: Относительный % изменения уровня основных заряженных молекул по сравнению с контролем в ответ на различные уровни аналога цистеина/цистина

