

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037568**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.15

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

(21) Номер заявки
201591817

(22) Дата подачи заявки
2014.03.14

(54) НЕ СОДЕРЖАЩАЯ СЫВОРОТКИ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И СПОСОБЫ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/790,136; 14/211,245**

(32) **2013.03.15; 2014.03.14**

(33) **US**

(43) **2016.05.31**

(86) **PCT/US2014/028501**

(87) **WO 2014/144198 2014.09.18**

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

(72) Изобретатель:
**Ошоди Шадиа, Джонсон Эми, Лоуренс
Шаун (US)**

(74) Представитель:
**Карпенко О.Ю., Угрюмов В.М., Лыу
Т.Н., Строчкова О.В. (RU)**

(56) **US-A1-2010285533
WO-A2-2007077217
EP-A1-1321515
US-A1-2011229933
US-A1-2012034674**

HOLT TA E. ET AL.: "Polyamine dependence of Chinese hamster ovary cells in serum-free culture is due to deficient arginase activity", *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH*, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 721, no. 4, 30 December 1982 (1982-12-30), pages 321-327, XP025221778, ISSN: 0167-4889, DOI: 10.1016/0167-4889(82)90085-4 [retrieved on 1982-12-30], page 321-323; table 2

HAWEL L. ET AL.: "Selective putrescine export is regulated by insulin and ornithine in Reuber H35 hepatoma cells", *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH*, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 1222, no. 1, 26 May 1994 (1994-05-26), pages 15-26, XP023788723, ISSN: 0167-4889, DOI: 10.1016/0167-4889(94)90020-5 [retrieved on 1994-05-26], page 15; table 1

IGARASHI K. ET AL.: "Modulation of cellular function by polyamines", *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY*, PERGAMON, GB, vol. 42, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 39-51, XP026909603, ISSN: 1357-2725, DOI: 10.1016/J.BIOCEL.2009.07.009 [retrieved on 2009-07-28], the whole document

(57) В описании описана улучшенная, не содержащая сыворотки и гидролизата белков среда для культивирования клеток животных, содержащая $0,6 \pm 0,09$ мМ орнитина, $0,714 \pm 0,11$ мМ путресцина и смесь аминокислот или их солей, которая может быть использована в способе получения представляющего интерес белка. Использование указанной среды позволяет улучшить плотность жизнеспособных клеток, снизить время удвоения клеток и увеличить продукцию представляющего интерес белка.

B1**037568****037568****B1**

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Изобретение относится к средам для культивирования клеток и для получения рекомбинантных белков. Изобретение конкретно относится к не содержащим сыворотки средам для культивирования рекомбинантных клеток СНО для получения белковых биотерапевтических средств.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Среды для культивирования клеток, содержащие компоненты сыворотки или гидролизата белков (т.е., пептоны и триптоны) имеют длительную историю применения в получении рекомбинантных белков из культивируемых клеток. Эти компоненты содержат факторы роста и широкий спектр других неохарактеризованных элементов, благоприятных для роста и культуры клеток. Однако они также содержат неохарактеризованные элементы, которые уменьшают рост или иным образом отрицательно воздействуют на продукцию рекомбинантного белка. Они также могут являться нежелательным потенциальным источником вариабельности. Несмотря на их недостатки, преимущества использования сывороток и гидролизатов перевешивают определенные недостатки и их широко использовали во многих применениях культур клеток.

Как правило, биологические терапевтические средства (биофармацевтические средства) для человека получают в культурах клеток млекопитающих, в частности в культуре клеток СНО. Присутствие неохарактеризованных или частично охарактеризованных компонентов в этих культурах клеток для получения биофармацевтических средств для применения для человека крайне нежелательно. Использование таких неохарактеризованных или частично охарактеризованных компонентов не только вносит производственные и нормативные несоответствия, но и повышает возможность вирусной или грибковой инфекции продуцирующей культуры.

Другим важным фактором при выборе с культивирования является снижение вариабельности состава и выхода лекарственного продукта от партии к партии. Сыворотки, гидролизаты и другие неопределенные элементы вносят вариабельность в выход, состав и качество партии биофармацевтических препаратов. Качество и чистота элементов среды также может влиять на выход, так как титры лекарственных средств часто частично зависят от поддержания конкретного баланса питательных веществ. Когда относительные количества питательных веществ варьируют от одной партии среды к другой, выход лекарственного средства может варьировать и эта вариабельность может являться неприемлемой или невыгодной.

Использование сред, содержащих сыворотку, или сред на основе гидролизатов вносит трудности в дальнейшую переработку. Концентрация желаемого биофармацевтического средства в культуре, как правило, составляет порядка нескольких грамм на литр. Присутствие сыворотки и гидролизатов в средах может добавлять более 10 г/л неохарактеризованных пептидов и белков, которые необходимо удалить на последующих этапах обработки. Также сыворотка и гидролизаты могут вносить вариабельность в количество металлов и других микроэлементов в средах. Таким образом, удаление сыворотки и гидролизатов из сред для культивирования устраняет эти вариации и потенциальные препятствия для получения и обработки лекарственного вещества.

Наряду с другими преимуществами использования не содержащих сывороток и гидролизатов сред включают снижение стоимости, снижение вариабельности между партиями лекарственных средств и минимизация риска внесения непредусмотренных средств из неопределенных и неочищенных компонентов. Кроме того, когда среды при запуске разных партий являются определенными и одинаковыми, подобным образом можно минимизировать оценочные запуски для тестирования новых партий сред по отношению к используемым средам. Таким образом, в данной области существует необходимость в средах для культивирования клеток млекопитающих, где среды являются химически определенными и не содержат сывороток и гидролизатов, или среды не содержат сывороток и содержат низкие контролируемые уровни гидролизатов, и при этом обеспечивают значительный и активный рост и поддержание клеток и продукцию биофармацевтических лекарственных веществ с высокими титрами.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Авторы изобретения сделали неожиданное открытие, что добавление орнитина с путресцином в среды для культивирования клеток, которые не содержат сыворотки ("OS" среды), увеличивает жизнеспособность и плотность клеток, уменьшает время удвоения клеток и обеспечивает продукцию белка этими клетками с высокими титрами. Авторы изобретения также выявили, что OS среды, которые не содержат белковых гидролизатов, в частности, обеспечивают жизнеспособность и плотность восстановленных клеток, время удвоения клеток и продукцию белка с высоким титром.

В одном из аспектов изобретение относится к среде для культивирования клеток, которая не содержит сыворотки и гидролизата белков, содержащая $0,6 \pm 0,09$ mM орнитина, $0,714 \pm 0,11$ mM путресцина и смесь аминокислот или их солей.

В одном из вариантов осуществления указанная среда содержит не менее 40 ± 6 mM смеси аминокислот или их солей.

В одном из вариантов осуществления указанная смесь аминокислот или их солей состоит из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина,

изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

В одном из вариантов осуществления указанная среда дополнительно содержит одну или несколько жирных кислот.

В одном из вариантов осуществления в указанной среде одна или несколько жирных кислот выбраны из линолевой кислоты, липоевой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, каприловой кислоты, лауриновой кислоты, гексановой кислоты, лигноцериновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты.

В одном из вариантов осуществления указанная среда дополнительно содержит смесь нуклеозидов.

В одном из вариантов осуществления в указанной среде смесь нуклеозидов включает аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

В одном из вариантов осуществления указанная среда дополнительно содержит один или несколько двухвалентных катионов.

В одном из вариантов осуществления в указанной среде один или несколько двухвалентных катионов выбраны из магния и кальция.

В другом аспекте изобретение относится к способу культивирования клеток, включающий этапы:

(а) предоставление среды для культивирования клеток по любому из предшествующих пунктов и

(b) размножение или поддержание клеток в указанной среде с получением культуры клеток.

В одном из вариантов осуществления в указанном способе клетка выбрана из клетки млекопитающего, клетки птицы, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки дрожжей.

В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой клетку СНО.

В одном из вариантов осуществления клетка экспрессирует представляющий интерес белок.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок представляет собой антиген-связывающий белок.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок содержит домен Fc.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок представляет собой слитый белок рецептор-Fc.

В одном из вариантов осуществления слитый белок рецептор-Fc представляет собой белок-ловушку.

В одном из вариантов осуществления белок-ловушка представляет собой антагонист IL-1 или антагонист VEGF.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок представляет собой антитело или фрагмент антитела.

В одном из вариантов осуществления антитело или фрагмент антитела представляют собой рекомбинантное антитело человека или его фрагмент.

В одном из вариантов осуществления среднее время удвоения клеток составляет не более 30 ч.

В одном из вариантов осуществления среднее время удвоения клеток составляет не более 24 ч.

В одном из вариантов осуществления культура клеток способна достигать плотности жизнеспособных клеток, которая по меньшей мере на 15% больше, чем у культуры клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ mM орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ mM путресцина.

В одном из вариантов осуществления культура клеток способна достигать плотности жизнеспособных клеток, которая по меньшей мере в 3 раза больше, чем у культуры клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ mM орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ mM путресцина.

В одном из вариантов осуществления указанный способ дополнительно включает добавление одной или нескольких добавок, которые выбраны из NaHCO_3 , глутамина, инсулина, глюкозы, CuSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , NiSO_4 , Na_4 ЭДТА и цитрата Na_3 .

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения белка, представляющего интерес, включающий этапы:

(а) введение в клетку нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую представляющий интерес белок;

(b) отбор клетки, несущей эту нуклеиновую кислоту;

(c) культивирование отобранной клетки в указанной среде для культивирования клеток и

(d) экспрессия представляющего интерес белка в клетке, причем представляющий интерес белок секретируется в среду.

В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой клетку СНО, клетку НЕК293 или клетку ВНК.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок представляет собой антиген-связывающий белок.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок содержит домен Fc.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок выбран из антитела; слитого

с Fc белка и белка ScFv.

В одном из вариантов осуществления слитый с Fc белок представляет собой слитый белок растворимого TCR-Fc или слитый белок рецептор-Fc (TRAP).

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере на 7% больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере на 14% больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере на 80% больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере в 2 раза больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере в 3 раза больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.

В одном из вариантов осуществления представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантное антитело человека.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Заявители сделали неожиданное открытие, что добавление орнитина или комбинации орнитина и путресцина ("OS среда") улучшает плотность жизнеспособных клеток, время удвоения клеток и продукцию белка клетками в культуре клеток относительно не содержащей сыворотки среды, которая содержит очень мало или не содержит орнитина или очень мало или не содержит комбинации орнитина и путресцина ("не OS среда").

Перед описанием культур клеток и способов по настоящему изобретению следует понять, что это изобретение не ограничено описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, так как такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящей заявке, далее описаны определенные конкретные способы и материалы. Единицы, префиксы и символы могут быть указаны в их принятых в СИ формах. Числовые диапазоны, указываемые в настоящем документе, являются открытыми, что означает, что они включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иначе, формы единственного числа следует понимать, как означающие "по меньшей мере один из". Заглавия разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей, и их не следует рассматривать, как ограничивающие описанный объект изобретения. Способы и указания, описываемые в настоящем документе, как правило, осуществляют общепринятыми известными в данной области способами и как описано в различных общих и более специализированных ссылках, которые цитированы и описаны на всем протяжении настоящего описания, если не указано иначе. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) и Julio E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998) и Dieffenbach and Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995). Все публикации, указанные на всем протяжении этого описания, полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Определения

Как используют в настоящем документе "пептид", "полипептид" и "белок" на всем протяжении описания используют взаимозаменяемо, и они означают молекулу, содержащую два или более аминокислотных остатка, связанные друг с другом пептидной связью. Пептиды, полипептиды и белки также

могут включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксиглирование и АДФ-рибозилирование. Пептиды, полипептиды и белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая основанные на белках лекарственные средства. В частности, пептиды, полипептиды и белки включают антитела и химерные или слитые белки. Пептиды, полипептиды и белки получают посредством рекомбинантных линий клеток животных с использованием способов культивирования клеток.

Как используют в настоящем документе, термин "гетерологичная полинуклеотидная последовательность" относится к полимерам нуклеиновых кислот, кодирующим представляющим интерес белки, такие как химерные белки (такие как молекулы-ловушки), антитела или части антител (например, VH, VL, CDR3), которые получают в качестве биофармацевтического лекарственного вещества. Гетерологичную полинуклеотидную последовательность (например, такую как последовательность, кодирующую химерный белок или последовательность с оптимизированными кодонами, не содержащая интронов последовательность и т.д.) можно получать способами генетической инженерии и вводить в клетку, где она может находиться в качестве эписомы или интегрироваться в геном клетки. Гетерологичная полинуклеотидная последовательность может представлять собой природную последовательность, которую вводят в эктопическую область в геноме продуцирующей клетки. Гетерологичная полипептидная последовательность может представлять собой природную последовательность другого организма, такую как последовательность, кодирующая ортолог человека.

"Антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит варируемую область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит варируемую область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гиперварируемости, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередуемыми с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает указание на гликозилированные и негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает молекулы антител, получаемые, экспрессируемые, производимые или выделяемые рекомбинантными способами, такие как антитела, выделяемые из клеток-хозяев, трансфицированных для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться более чем с одним различными эпитопами. Биспецифические антитела в основном описаны в публикации патентной заявки США № 2010/0331527, которая включена в настоящую заявку в качестве ссылки.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или "фрагмент антитела") относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность к специфическому связыванию антигена. Примеры связывающих фрагментов, включаемых в термин "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) Nature 241: 544-546), который состоит из домена VH, (vi) выделенная CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с формированием одной белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с формированием одновалентных молекул. В термин "антитела" также включены другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела (см. например, Holliger et al. (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть частью более крупной молекулы иммуноадгезии, формируемой посредством ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или части антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование области сердцевины стрептавидина с получением тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки с получением двухвалентной и биотинилированной молекулы scFv (Kipriyanov et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058). Части антител, такие как фрагменты Fab и F(ab')₂, можно получать из целых антител общепринятыми способами, такими как расщепление целых антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии можно получать с использованием стандартных технологий рекомбинантной ДНК, широко известных в данной области (см. Sambrook et al., 1989).

Термин "антитело человека" предназначен для включения антител с варируемыми и константными областями, происходящими из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линией человека (например, мутации, вносимые посред-

ством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматических мутаций *in vivo*), например, в CDR и в частности CDR3. Однако, как используют в настоящем документе, термин "антитело человека" не предназначен для включения антител, в которых на каркасные последовательности человека привиты последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь.

Как используют в настоящем документе, термин "рекомбинантное антитело человека" предназначен для включения всех антител человека, которые получают, экспрессируют, производят или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицируемого в клетки-хозяева, антитела, выделяемые из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных антител человека, антитела, выделяемые у животных (например, мышей), которые являются трансгенными по генам иммуноглобулинов человека (см. например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела получаемые, экспрессируемые, производимые или выделяемые любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такой рекомбинант антитела человека содержит переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда используют животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, последовательности аминокислот областей VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и родственны им, в природе могут не присутствовать в репертуаре зародышевой линии антител человека *in vivo*.

"Слитые с Fc белки" содержат часть или целиком два или более белков, один из которых представляет собой часть Fc молекулы иммуноглобулина, которые иначе в природе вместе не встречаются. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полученных из антител полипептидов (включая домен Fc), описано, например, в Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10, 19, 1 - 10, 19, 11, 1992. "Слитые белки рецептора и Fc" содержат один или несколько внеклеточных доменов рецептора, связанные с молекулой Fc, которая в определенных вариантах осуществления содержит шарнирную область с последующими доменами иммуноглобулина CH2 и CH3. В определенных вариантах осуществления слитый с Fc белок содержит две или более цепей различных рецепторов, которые связываются с одним или несколькими лигандами. Например, слитый с Fc белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит связывающую лиганд IL-1RAcP область, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc hlgG1; см. патент США № 6927004), или ловушка VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hlgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159).

Среды

Настоящее изобретение относится к не содержащей сыворотки среде, которая пригодна для культивирования клеток и продукции биофармацевтического лекарственного вещества. "Не содержащая сыворотки" используют для среды для культивирования клеток, которая не содержит сывороток животных, таких как эмбриональная телячья сыворотка. Не содержащие сыворотки среды могут содержать $\leq 7,5$ г/л гидролизатов, таких как соевый гидролизат. Настоящее изобретение также относится к химическим средам определенного состава, которые не только не содержат сывороток, но также не содержат и гидролизата. "Не содержащие гидролизата" используют для сред для культивирования клеток, которые не содержат экзогенных белковых гидролизатов, таких как гидролизаты животных или растительных белков, например, такие как пептоны, триптоны и т.п.

Удаление сыворотки и уменьшение количества или удаление гидролизатов из среды для культивирования клеток при снижении вариативности от партии к партии и улучшении последующих этапов обработки к сожалению ослабляет рост, жизнеспособность клеток и экспрессию ими белка. Таким образом, химически определенные не содержащие сыворотки и содержащие мало или не содержащие гидролизатов среды для улучшения роста клеток и продукции белка нуждаются в дополнительных ингредиентах. Среды для культивирования клеток по изобретению можно обогащать дополнительными ингредиентами, такими как полиамины, или увеличенными концентрациями таких компонентов, как аминокислоты, соли, сахара, витамины, гормоны, факторы роста, буферы, антибиотики, липиды, микроэлементы и т.п., в зависимости от требований культивируемых клеток или желаемых параметров культуры клеток. Например, среда для культивирования клеток по настоящему документу для улучшения роста клеток, жизнеспособности клеток и продукции рекомбинантного белка обогащена орнитином, путресцином или обоими ("OS среды").

В определенных вариантах осуществления OS среда содержит орнитин в концентрации (выражаемой в микромолях на литр) по меньшей мере приблизительно 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 568, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580,

581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 700, 750, 800, 850 или 900 мкМ.

В определенных вариантах осуществления среда содержит орнитин в концентрации приблизительно 85, 90, 95, 100, 105, 110, 113 или 115 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит $100 \text{ мкМ} \pm 15 \text{ мкМ}$ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $15 \text{ мг/л} \pm 2,25 \text{ мг/л}$ орнитина·HCl.

В определенных вариантах осуществления среды содержит орнитин в концентрации приблизительно 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340 или 345 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит $300 \text{ мкМ} \pm 45 \text{ мкМ}$ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $50 \text{ мг/л} \pm 7,5 \text{ мг/л}$ орнитина·HCl.

В определенных вариантах осуществления среды содержит орнитин в концентрации приблизительно 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685 или 690 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит $600 \text{ мкМ} \pm 90 \text{ мкМ}$ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $100 \text{ мг/л} \pm 15 \text{ мг/л}$ орнитина·HCl.

В определенных вариантах осуществления среды содержит орнитин в концентрации 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, 1000, 1005, 1010, 1015, 1020, 1025, 1030 или 1035 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит $900 \text{ мкМ} \pm 135 \text{ мкМ}$ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $150 \text{ мг/л} \pm 22,5 \text{ мг/л}$ орнитина·HCl.

В обогащенные орнитином среды необязательно можно добавлять путресцин. Путресцин в очень низких концентрациях включали в качестве компонента в определенные составы сред для культивирования клеток; см. например, WO 2005/028626, в котором описаны 0,02-0,08 мг/л путресцина; патент США № 5426699 (0,08 мг/л); патент США № RE 30985 (0,16 мг/л); патент США № 5811299 (0,27 мг/л); патент США № 5122469 (0,5635 мг/л); патент США № 5063157 (1 мг/л); WO 2008/154014 ($\approx 100 \text{ мкМ}$ - $\approx 1000 \text{ мкМ}$); патентную заявку США № 2007/0212770 (0,5 - 30 мг/л полиамина; 2 мг/л путресцина; 2 мг/л путресцина + 2 мг/л орнитина; 2 мг/л путресцина + 10 мг/л орнитина).

В определенных вариантах осуществления среды содержат комбинацию орнитина и путресцина, где путресцин может находиться в комбинации по меньшей мере приблизительно 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405 или 410 мкМ.

В определенных вариантах осуществления среды содержат путресцин в концентрации приблизительно 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225 или 230 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит $200 \text{ мкМ} \pm 30 \text{ мкМ}$ путресцина в дополнение к $\geq 90 \text{ мкМ} \pm 14 \text{ мкМ}$ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $30 \text{ мг/л} \pm 4,5 \text{ мг/л}$ путресцина·2HCl в дополнение к $\geq 15 \text{ мг/л} \pm 2,25 \text{ мг/л}$ орнитина·HCl.

В определенных вариантах осуществления среды содержат путресцин в концентрации приблизительно 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400 или 405 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит $350 \text{ мкМ} \pm 52,5 \text{ мкМ}$ путресцина в дополнение к $\geq 90 \text{ мкМ} \pm 14 \text{ мкМ}$ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $57 \text{ мг/л} \pm 8,55 \text{ мг/л}$ путресцина·2HCl в дополнение к $\geq 15 \text{ мг/л} \pm 2,25 \text{ мг/л}$ орнитина·HCl.

В определенных вариантах осуществления среды содержат путресцин в концентрации приблизительно 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800 или 805 мкМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит $714 \text{ мкМ} \pm 105 \text{ мкМ}$ путресцина в дополнение к $\geq 90 \text{ мкМ} \pm 14 \text{ мкМ}$ орнитина. В одном из вариантов осуществления среда содержит $115 \text{ мг/л} \pm 17,25 \text{ мг/л}$ путресцина·2HCl в дополнение к $\geq 15 \text{ мг/л} \pm 2,25 \text{ мг/л}$ орнитина·HCl.

В определенных вариантах осуществления среды содержат попарную комбинацию любых концентраций путресцина и орнитина, перечисленных выше. В определенных вариантах осуществления среды содержат любую попарную комбинацию приблизительно 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800 или 805 мкМ путресцина и приблизительно 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685 или 690 мкМ орнитина. Например, в одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 700 мкМ путресцина и любую одну из 510, 511, 512 мкМ и последующие орнитина; или 701 мкМ путресцина и любую одну из 510, 511, 512 мкМ и последующие орнитин и т.д. Также, например, среда в одном из вариантов осуществления содержит прибли-

зительно 600 мкМ орнитина и любую одну из 700, 701, 702 мкМ и последующие путресцина; или 601 мкМ орнитина и любую одну из 700, 701, 702 мкМ и последующие путресцина и т.д. В определенных вариантах осуществления среды содержат 702 мкМ $\pm$ 106 мкМ путресцина + 593 мкМ $\pm$ 89 мкМ орнитина. В одном конкретном варианте осуществления среды содержат приблизительно 714 мкМ путресцина и 593 мкМ орнитина. В одном из вариантов осуществления среды содержат 115 мг/л $\pm$ 17 мг/л путресцина $\cdot$ 2HCl и 100 мг/л $\pm$ 15 мг/л орнитина $\cdot$ HCl. В одном конкретном варианте осуществления среды содержат 115 мг/л путресцина $\cdot$ 2HCl и 100 мг/л орнитина $\cdot$ HCl.

В одном из вариантов осуществления и в дополнение к добавлению орнитина или путресцина среды содержат смесь нуклеозидов в суммарной концентрации по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ, по меньшей мере 70 мкМ, по меньшей мере 80 мкМ, по меньшей мере 90 мкМ, по меньшей мере 100 мкМ, по меньшей мере 110 мкМ, по меньшей мере 115 мкМ, по меньшей мере 120 мкМ, по меньшей мере 125 мкМ, по меньшей мере 130 мкМ, по меньшей мере 135 мкМ, по меньшей мере 140 мкМ, по меньшей мере 145 мкМ, по меньшей мере 150 мкМ, по меньшей мере 155 мкМ, по меньшей мере 160 мкМ, по меньшей мере 165 мкМ или по меньшей мере 170 мкМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 174 мкМ $\pm$ 26 мкМ нуклеозидов. В одном из вариантов осуществления среды содержат пуриновые производные в суммарной концентрации по меньшей мере 40 мкМ, по меньшей мере 45 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 55 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ, по меньшей мере 65 мкМ, по меньшей мере 70 мкМ, по меньшей мере 75 мкМ, по меньшей мере 80 мкМ, по меньшей мере 85 мкМ, по меньшей мере 90 мкМ, по меньшей мере 95 мкМ, по меньшей мере 100 мкМ или по меньшей мере 105 мкМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 106 мкМ $\pm$ 5 мкМ пуриновых производных. Пуриновые производные включают нуклеозиды гипоксантин и аденозин и гуанозин. В одном из вариантов осуществления среды содержат пиримидиновые производные в суммарной концентрации по меньшей мере 30 мкМ, по меньшей мере 35 мкМ, по меньшей мере 40 мкМ, по меньшей мере 45 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 55 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ или по меньшей мере 65 мкМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 68 мкМ $\pm$ 5 мкМ пиримидиновых производных. Пиримидиновые производные включают нуклеозиды тимидин, уридин и цитидин. В одном конкретном варианте осуществления среды содержат аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

В дополнение к добавлению орнитина или путресцина в одном из вариантов осуществления среды также содержат аминокислоты в суммарной концентрации по меньшей мере 40 мМ, где в расчет общ сумма не включено количество глутамин. В одном из вариантов осуществления глутамин в среды не добавлен, но его можно добавить в среды в качестве "добавки в момент использования" при культивировании клеток, например при продукции белка. Таким образом, в определенных вариантах осуществления, таких как в способе культивирования клеток или способе получения представляющего интерес белка, среды можно обогащать глутамином в качестве добавки в момент использования. В одном из таких вариантов осуществления глутамин добавляют в количестве менее чем приблизительно 40 мМ, менее чем приблизительно 35 мМ, менее чем приблизительно 30 мМ, менее чем приблизительно 25 мМ, менее чем приблизительно 20 мМ, менее чем приблизительно 15 мМ, менее чем приблизительно 10 мМ, менее чем приблизительно 8 мМ, менее чем приблизительно 7 мМ, менее чем приблизительно 6 мМ, менее чем приблизительно 5 мМ, менее чем приблизительно 4 мМ, менее чем приблизительно 3 мМ или менее чем приблизительно 2,5 мМ. В одном из вариантов осуществления количество глутамин в средах, которые обогащали глутамином, составляет приблизительно 2 мМ $\pm$ 0,5 мМ.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат аминокислоты с неполярными боковыми группами в концентрации по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 24 мМ, по меньшей мере 25 мМ, по меньшей мере 26 мМ, по меньшей мере 27 мМ, по меньшей мере 28 мМ, по меньшей мере 29 мМ или по меньшей мере 30 мМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 30 мМ аминокислот с неполярными боковыми группами. В одном из вариантов осуществления на моль общего количества аминокислот, содержащегося в средах, по меньшей мере 32%, по меньшей мере 33%, по меньшей мере 34%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 36%, по меньшей мере 37%, по меньшей мере 38%, по меньшей мере 39%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 41% представляют собой аминокислоты с неполярными боковыми группами. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 42% $\pm$ 1% представляют собой аминокислоты с неполярными боковыми группами. Аминокислоты с неполярными боковыми группами включают аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат аминокислоты с незаряженными полярными боковыми группами в концентрации приблизительно от 10 до 34 мМ, приблизительно от 11 до 33 мМ, приблизительно от 12 до 32 мМ, приблизительно от 13 до 31 мМ, приблизительно от 14 до 30 мМ, приблизительно от 15 до 29 мМ, приблизительно от 16 до 28 мМ, приблизительно от 17 до 27 мМ, приблизительно от 18 до 26 мМ, приблизительно от 19 до 25 мМ, приблизительно от 20 до 24 мМ, приблизительно от 21 до 23 мМ

или приблизительно 22 мМ. В одном из вариантов осуществления среда содержит приблизительно 22 мМ аминокислот с незаряженными полярными боковыми группами. В другом варианте осуществления среда содержит приблизительно 12 мМ аминокислот с незаряженными полярными боковыми группами. В одном из вариантов осуществления на моль общего количества аминокислот, содержащегося в средах приблизительно от 14 до 46%, приблизительно от 15 до 45%, приблизительно от 16 до 44%, приблизительно от 17 до 43%, приблизительно от 18 до 42%, приблизительно от 19 до 41%, приблизительно от 20 до 40%, приблизительно от 21 до 39%, приблизительно от 22 до 38%, приблизительно от 23 до 37%, приблизительно от 24 до 36%, приблизительно от 25 до 35%, приблизительно от 26 до 34%, приблизительно от 27 до 33%, приблизительно от 28 до 32%, приблизительно от 29 до 31% или приблизительно 30% представляют собой аминокислоты с незаряженными полярными боковыми группами. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 30%±3% представляют собой аминокислоты с незаряженными полярными боковыми группами. Аминокислоты с незаряженными полярными боковыми группами включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат аминокислоты с отрицательным зарядом при pH 6 (например, кислые аминокислоты) в концентрации приблизительно от 4 до 14 мМ, приблизительно от 5 до 13 мМ, приблизительно от 6 до 12 мМ, приблизительно от 7 до 11 мМ, приблизительно от 8 до 10 мМ, приблизительно 9 или приблизительно 4 мМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 9 мМ кислых аминокислот. В одном из вариантов осуществления среды содержат 9 мМ±1 мМ кислых аминокислот. В одном из вариантов осуществления на моль общего количества аминокислот, содержащихся в средах приблизительно от 8 до 18%, приблизительно от 9 до 17%, приблизительно от 10 до 16%, приблизительно от 11 до 15%, приблизительно от 12 до 14% или приблизительно 13% представляют собой кислые аминокислоты. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 12,6%±1% представляют собой кислые аминокислоты. Кислые аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат аминокислоты с положительным зарядом при pH 6 (например, основные аминокислоты) в концентрации по меньшей мере 3,5 мМ, по меньшей мере 4 мМ, по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 7 мМ, по меньшей мере 8 мМ, по меньшей мере 9 мМ, по меньшей мере 10 мМ или по меньшей мере 11 мМ. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 11 мМ основных аминокислот. В одном из вариантов осуществления среды содержат приблизительно 11,42 мМ±1 мМ основных аминокислот. В одном из вариантов осуществления на моль общего количества аминокислот, содержащихся в средах по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14% или по меньшей мере 15% представляют собой основные аминокислоты. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 16% представляют собой основные аминокислоты. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 15,8%±2,4% представляют собой основные аминокислоты. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 21%±3,2% представляют собой основные аминокислоты. Основные аминокислоты включают лизин, аргинин и гистидин.

В одном из вариантов осуществления в дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина среды также содержат приблизительно 30 мМ неполярных аминокислот, приблизительно 22 мМ незаряженных полярных аминокислот, приблизительно 9 мМ кислых аминокислот и приблизительно 11 мМ основных аминокислот. В одном из вариантов осуществления на моль аминокислот в средах приблизительно 42% представляют собой неполярные аминокислоты, приблизительно 30% представляют собой незаряженные полярные аминокислоты, приблизительно 13% представляют собой кислые аминокислоты и приблизительно 16% представляют собой основные аминокислоты.

В дополнение к добавлению орнитина или комбинации орнитина и путресцина в одном из вариантов осуществления среды содержат микромолярные количества жирных кислот (или производных жирных кислот) и токоферол. В одном из вариантов осуществления жирные кислоты включают любую одну или несколько из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, липоевой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, каприловой кислоты, лауриновой кислоты, гексановой кислоты, лигноцериновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты. В одном из вариантов осуществления среды содержат токоферол, линолевую кислоту и липоевую кислоту.

В одном из вариантов осуществления среды также содержат смесь витаминов, которая включает другие питательные вещества и незаменимые питательные вещества, в суммарной концентрации по меньшей мере приблизительно 700 мкМ или по меньшей мере приблизительно 2 мМ. В одном из вариантов осуществления смесь витаминов содержит один или несколько из D-биотина, хлорида холина, фолиевой кислоты, миоинозитола, амида никотиновой кислоты, пиридоксина HCl, D-пантотеновой кислоты

(hemiCa), рибофлавина, тиамина HCl, витамина B12 и т.п. В одном из вариантов осуществления смесь витаминов включает все из D-биотина, хлорида холина, фолиевой кислоты, миоинозитола, амида никотиновой кислоты, пиридоксина HCl, D-пантотеновой кислоты (hemiCa), рибофлавина, тиамина HCl и витамина B12.

Различные варианты осуществления сред по изобретению включают любую из комбинаций описанных выше вариантов осуществления, включая химически определенные, не содержащие гидролизатов, не содержащие сывороток среды, содержащие орнитин или путресцин в указанных количествах и, в числе прочего, (a) аминокислоты; (b) необязательно нуклеозиды; (c) соли двухвалентных катионов; (d) жирные кислоты и токоферол и (e) витамины. В определенных вариантах осуществления во все OS среды можно добавлять небольшие количества гидролизатов.

Заявители полагают, что в практическом осуществлении настоящего изобретения можно использовать любые одну или несколько из множества основных сред или их сочетаний, в которые добавляют орнитин или комбинацию орнитина и путресцина. Основные среды общеизвестны в данной области и в числе прочего включают MEME (минимальную поддерживающую среду) Игла (Eagle, Science, 1955, 112(3168):501-504), F12 Хэма (Ham, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1965, 53:288-293), среду F-12 K, среду Дульбекко, модифицированную Дульбекко среду Игла (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1952 August; 38(8): 747-752), среды DMEM/Хэма F12 1:1, T8 Тройэла, среды A2 Холмса и Вольфа, Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 10:389-401), среды Вэймота (Davidson and Waymouth, Biochem. J., 1945, 39(2): 188-199), среды Е Вильямса (William's et al., Exp. Cell Res., 1971, 69:105 et seq.), RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc., 1967, 199:519-524), среды MCDB 104/110 (Bettger et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1981, 78(9):5588-5592), среды Вентре HL-1, среды с альбумином-глобулином (Ott et al., Appl. Microbiol., 1973, 25(1):49-54), среду RPMI-1640, среду RPMI-1641, модифицированную Исков среду Дульбекко, среду Маккоя 5 А, среду Лейбовица L-15 и не содержащие сыворотки среды, такие как EX-CELL™ 300 Series (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), среды с протамином-цинком-инсулином (Weiss et al., 1974, US 4072565), среды с биотином-фолатом (Cartaya, 1978, US Re30,985), среды с трансферрином-жирными кислотами (Baker, 1982, US 4560655), среды с трансферрином-EGF (Hasegawa, 1982, US 4615977; Chesseebeuf, 1984, US 4786599) и другие комбинации сред (см. Inlow, US 6048728; Drapeau, US 7294484; Mather, US 5122469; Furukawa, US 5976833; Chen, US 6180401; Chen, US 5856179; Etcheverry, US 5705364; Etcheverry, US 7666416; Ryll, US 6528286; Singh, US 6924124; Luan, US 7429491 и т.п.).

В конкретном варианте осуществления среда является химически определенной и в дополнение к орнитину или комбинации орнитина и путресцина содержит: CaCl₂ 2H₂O; буфер HEPES, KCl; MgSO₄; NaCl; Na₂HPO₄ или другие фосфатные соли; пируват; L-аланин; L-аргинин HCl; L-аспарагин H₂O; L-аспарагиновую кислоту; L-цистеин HCl H₂O; L-глутаминовую кислоту; глицин; L-гистидин HCl H₂O; L-изолейцин; L-лейцин; L-лизин HCl; L-метионин; L-орнитин HCl; L-фенилаланин; L-пролин; L-серин; L-треонин; L-триптофан; L-тирозин 2Na 2H₂O; L-валин; D-биотин; хлорид холина; фолиевую кислоту; миоинозитол; амид никотиновой кислоты; пиридоксин HCl; D-пантотеновую кислоту; рибофлавин; тиамин HCl; витамин B12; p-аминобензойную кислоту; этаноламин HCl; плюроник F68; DL-α-токоферола фосфат; линолевую кислоту; Na₂SeO₃; липоевую кислоту и глюкозу и необязательно аденозин; гуанозин; цитидин; уридин; тимидин и гипоксантин 2Na.

В одном из вариантов осуществления исходная осмолярность сред по изобретению составляет 200-500, 250-400, 275-350 или приблизительно 300 мОсм. В течение роста клеток в средах по изобретению и, в частности, после любой подачи питательных веществ по протоколу периодической подпитки, осмолярность культуры может увеличиваться приблизительно до 350, 400, 450 или до 500 мОсм.

В определенных вариантах осуществления, где осмолярность среды определенного состава составляет менее чем приблизительно 300, осмолярность доводят приблизительно до 300, добавляя одну или несколько солей свыше указанного количества. В одном из вариантов осуществления осмолярность увеличивают до желаемого уровня, добавляя один или несколько осмолитов, выбранных из хлорида натрия, хлорида калия, соли магния, соли кальция, кислой соли амина, соли жирной кислоты, бикарбоната натрия, карбоната натрия, карбоната калия, хелатора, который представляет собой соль, сахар (например, галактозу, глюкозу, сахарозу, фруктозу, фукозу и т.д.) и их сочетания. В одном из вариантов осуществления осмолит добавляют в дополнение к его концентрации в компоненте, уже присутствующем в среде определенного состава (например, сахар добавляют в дополнение к концентрации, указанной для компонента).

Любой и каждый из вариантов осуществления сред, описанных выше, а также любых других не содержащих сыворотки сред, содержащих по меньшей мере приблизительно 90 мкМ орнитина (или содержащих комбинацию по меньшей мере приблизительно 100 мкМ орнитина и по меньшей мере приблизительно 200 мкМ путресцина) далее в настоящем изобретении обозначают как обогащенные орнитином ("OS") среды. И наоборот, среды, не содержащие орнитина (или не содержащие комбинации орнитина/путресцина), или среды, содержащие менее 100 мкМ орнитина (или среды, содержащие менее 100 мкМ орнитина и менее 200 мкМ путресцина), далее в настоящем документе обозначают как не обогащенные орнитином ("не OS") среды.

Культура клеток

Настоящее изобретение относится к культуре клеток, содержащей линию клеток, экспрессирующую представляющий интерес белок в OS среде, как описано выше. В одном из вариантов осуществления культура клеток содержит инсулин, который можно добавлять в среды в качестве ингредиента в момент использования или можно включать в составы сред. В одном из вариантов осуществления линия клеток содержит клетки, способные к продукции биотерапевтического белка. Примеры линий клеток, которые как правило используют для продукции белковых биотерапевтических средств, включают в числе прочего первичные клетки, клетки BSC, клетки HeLa, клетки HepG2, клетки LLC-MK, клетки CV-1, клетки COS, клетки VERO, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки CRFK, клетки RAF, клетки RK, клетки TCMK-1, клетки LLCPK, клетки PK15, клетки LLC-RK, клетки MDOK, клетки BHK, клетки BHK-21, клетки CHO, клетки CHO-K1, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки BHK, клетки 3T3, клетки 293, клетки RK, клетки Peg.C6 и клетки куриных эмбрионов. В одном из вариантов осуществления линия клеток представляет собой линию клеток CHO или одну или несколько из нескольких конкретных вариантов клеток CHO, оптимизированных для продукции белка в большом масштабе, например, CHO-K1.

"Культура клеток" или "культура" означает рост и размножение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования для клеток млекопитающих известны в данной области. См. например. *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих можно культивировать в суспензии или прикрепленными к твердому субстрату. Для культур клеток млекопитающих доступны биореакторы с псевдооживленным слоем, биореакторы с пористыми волокнами, биореакторы с роллерными флаконами, встряхиваемыми колбами или смесительными баками с микроносителями или без и функционирующие в периодическом режиме, в периодическом режиме с подпиткой, непрерывном, полунепрерывном режиме или режиме с орошением. В течение культивирования в культуру непрерывно или с интервалами можно добавлять среды для культивирования клеток или концентрированные питательные среды. Например, культуру можно подпитывать раз в сутки, через сутки, каждые трое суток или можно подпитывать, когда концентрация конкретного компонента среды, который подвергают контролю, падает ниже желаемого диапазона.

Животные клетки, такие как клетки CHO, можно культивировать в культурах малого масштаба, например, в 125 мл контейнерах, содержащих приблизительно 25 мл среды, 250 мл контейнерах, содержащих приблизительно от 50 до 100 мл среды, 500 мл контейнерах, содержащих приблизительно от 100 до 200 мл среды. Альтернативно, культуры могут быть крупномасштабными, такими как, например, 1000 мл контейнеры, содержащие приблизительно от 300 до 1000 мл среды, 3000 мл контейнеры, содержащие приблизительно от 500 до 3000 мл среды, 8000 мл контейнеры, содержащие приблизительно от 2000 до 8000 мл среды и 15000 мл контейнеры, содержащие от 4000 до 15000 мл среды. Культуры для производства могут содержать 10000 л среды или более. Крупномасштабные культуры клеток, такие как для клинического производства белковых терапевтических средств, как правило, поддерживают в течение нескольких суток или даже недель, при этом клетки продуцируют желаемый белок(ки). В течение этого времени культуру можно обогащать концентрированной питательной средой, содержащей такие компоненты, как питательные вещества и аминокислоты, которые расходуются в течение культивирования. Концентрированная питательная среда может быть основана на любых составах сред для культивирования клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать большинство компонентов среды для культивирования клеток, например, приблизительно в количестве 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 12×, 14×, 16×, 20×, 30×, 50×, 100×, 200×, 400×, 600×, 800× или даже приблизительно 1000× от их нормального пригодного количества. Концентрированные питательные среды часто используют в процессах культивирования с периодической подпиткой.

В определенных вариантах осуществления среды для культивирования клеток в течение роста клеток или продукции белка обогащают "добавками в момент использования", также известными как добавки, ингредиенты, добавляемые в момент использования, или химические вещества, добавляемые в момент использования. Добавки в момент использования включают один или несколько из факторов роста или других белков, буферов, источников энергии, солей, аминокислот, металлов и хелаторов. Другие белки включают трансферрин и альбумин. Факторы роста, которые включают цитокины и хемокины, в основном известны в данной области и известно, что они стимулируют рост клеток или, в некоторых случаях, дифференцировку клеток. Как правило, фактор роста представляет собой белок (например, инсулин), небольшой пептид или стероидный гормон, такой как эстроген, ДНЕА, тестостерон и т.п. В некоторых случаях фактор роста может представлять собой искусственное химическое вещество, которое стимулирует клеточную пролиферацию или продукцию белка, такое как, например, тетрагидрофолат (THF), метотрексат и т.п. Неограничивающие примеры белковых и пептидных факторов роста включают ангиопоэтины, морфогенетические белки кости (BMP), выделенный из головного мозга нейротрофический фактор (BDNF), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), выделенный из линий глиальных клеток нейротрофический фактор (GDNF), гранулоцитар-

ный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), ростовой фактор дифференцировки 9 (GDF9), фактор роста гепатоцитов (HGF), выделенный из гепатомы фактор роста (FIDGF), инсулин, инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор стимуляции миграции, миостатин (GDF-8), фактор роста нервов (NGF) и другие нейротрофины, выделенный из тромбоцитов фактор роста (PDGF), тромбопоэтин (TPO), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), агонисты путь передачи сигнала wnt, плацентарный фактор роста (PlGF), эмбриональный телячий соматотрофин (FBS), интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 и т.п. В одном из вариантов осуществления среду для культивирования клеток обогащают добавляемым в момент использования фактором роста инсулином. В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина в средах, например, количество инсулина в средах для культивирования клеток после добавления, составляет приблизительно от 0,1 до 10 мкМ. Также в составы сред по определенным вариантам осуществления можно включать одну или несколько добавок в момент использования.

Буферы общеизвестны в данной области. Изобретение не ограничено каким-либо конкретным буфером или буферами, и любой специалист в данной области может выбрать соответствующие буфер или буферную систему для использования с конкретной линией клеток, продуцирующей конкретный белок. В одном из вариантов осуществления буфер, добавляемый в момент использования, представляет собой NaHCO_3 . В одном из вариантов осуществления буфер, добавляемый в момент использования, содержит NaHCO_3 . В другом варианте осуществления буфер представляет собой HEPES.

Источники энергии для применения в качестве добавки в момент использования в культуре клеток также хорошо известны в данной области. Без ограничения в одном из вариантов осуществления источник энергии, добавляемый в момент использования, представляет собой глюкозу. Учитывая конкретные и определенные требования конкретных линии клеток и продуцируемого белка, в одном из вариантов осуществления глюкозу в среды можно добавлять в концентрации приблизительно от 1 до 20 мМ. В определенных случаях глюкозу можно добавлять на высоких уровнях вплоть до 10 г/л.

Также в области культуры клеток и продукции белка хорошо известны хелаторы. Двумя стандартными хелаторами, используемыми в данной области, являются дигидрат ЭДТА натрия и цитрат, хотя в практическом осуществлении настоящего изобретения можно использовать другие хелаторы. В одном из вариантов осуществления хелатор, добавляемый в момент использования, представляет собой дигидрат ЭДТА натрия. В одном из вариантов осуществления хелатор, добавляемый в момент использования, представляет собой цитрат, такой как $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.

В одном из вариантов осуществления культуру клеток можно обогащать одной или несколькими аминокислотами, добавляемыми в момент использования, например, такими как глутамин. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток обогащена глутамином, добавляемым в момент использования в конечной концентрации приблизительно от 1 до 13 мМ.

Другие добавки в момент использования включают одну или несколько из различных солей металлов, такие как соли железа, никеля, цинка и меди. В одном из вариантов осуществления среды для культивирования клеток обогащают любым одним или несколькими из сульфата меди, сульфата цинка, хлорида железа и сульфата никеля.

В одном из вариантов осуществления среды для культивирования клеток обогащают любой одной или несколькими или всеми из указанных ниже добавок в момент использования: приблизительно 29,8 мМ NaHCO_3 , приблизительно 2 мМ глутамин, приблизительно 0,86 мкМ инсулин, приблизительно 11,1 мМ глюкоза, приблизительно 6,54 мкМ сульфат цинка, приблизительно 0,168 мкМ сульфат меди, приблизительно 75 мкМ хлорид железа, приблизительно 0,639 мкМ сульфат никеля, приблизительно 85 мкМ ЭДТА и приблизительно 50 мкМ цитрат.

В одном из вариантов осуществления среды обогащают с интервалами в течение культивирования клеток в соответствии с процессом с периодической подпиткой. Культивирование с периодической подпиткой общеизвестно в данной области и применяется для оптимизированной продукции белка (см. Y.M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* 2010 Sep-Oct;26(5): 1400-10).

Относительно роста клеток в культуре без орнитина или путресцина жизнеспособность клеток, плотность жизнеспособных клеток и удвоение клеток улучшены. Относительно жизнеспособности клеток, клетки, растущие в OS средах демонстрирует жизнеспособность, которая по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере в 3 раза выше, чем жизнеспособность сходных или идентичных клеток, растущих не в OS средах.

В определенных вариантах осуществления скорость удвоения жизнеспособных клеток млекопитающих в OS средах по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, по меньшей мере на 13%, по меньшей мере на 14%, по меньшей мере на 15%, по

меньшей мере на 16%, по меньшей мере на 17%, по меньшей мере на 18%, по меньшей мере на 19%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 21%, по меньшей мере на 22%, по меньшей мере на 23%, по меньшей мере на 24%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 26%, по меньшей мере на 27%, по меньшей мере на 28%, по меньшей мере на 29%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере в 3 раза выше, чем скорость удвоения клеток млекопитающих, культивируемых не в OS средах. В определенных вариантах осуществления скорость удвоения жизнеспособных клеток млекопитающих в OS средах приблизительно на 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30% выше, чем скорость удвоения клеток млекопитающих не в OS средах.

В определенных вариантах осуществления время удвоения активно проходящих цикл клеток млекопитающих в OS средах составляет менее 30 ч, менее 29 ч, менее 28 ч, менее 27 ч, менее 26 ч, менее 25 ч, менее 24 ч, менее 23 ч, менее 22 ч, менее 21 ч, менее 20 ч, менее 19 ч или менее 18 ч. В определенных вариантах осуществления время удвоения активно растущих клеток млекопитающих в OS средах составляет менее 28 ч. В определенных вариантах осуществления время удвоения клеток млекопитающих в OS средах составляет приблизительно 27 ± 1 ч, приблизительно 26 ± 1 ч, приблизительно 25 ± 1 ч, приблизительно 24 ± 1 ч, приблизительно 23 ± 1 ч, приблизительно 22 ± 1 ч или приблизительно 21 ± 1 ч. В определенных вариантах осуществления время удвоения активно проходящих цикл клеток млекопитающих в OS средах составляет приблизительно 24 ± 1 ч. В определенных вариантах осуществления время удвоения активно делящихся клеток, культивируемых в OS средах по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 16%, по меньшей мере на 17%, по меньшей мере на 18%, по меньшей мере на 19%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 25% меньше, чем время удвоения активно проходящих цикл клеток, культивируемых не в OS средах.

Продукция белка

В дополнение к химически определенным OS средам и способам культивирования клеток в OS средах настоящее изобретение относится к способам продукции белков, таких как терапевтически эффективное антитело или другое биофармацевтическое лекарственное вещество, в клетках, культивируемых в OS средах.

В определенных вариантах осуществления скорость продукции белка клетками млекопитающих, культивируемыми в OS средах, по меньшей мере на 5, 10, 15 или 20% выше, чем скорость продукции белка идентичными клетками млекопитающих, культивируемыми не в OS средах. В определенных вариантах осуществления скорость продукции белка в клетках, культивируемых в OS средах, составляет по меньшей мере 1 пкг/клетку/сутки ("PCD"), по меньшей мере 2 PCD, по меньшей мере 3 PCD, по меньшей мере 4 PCD, по меньшей мере 5 PCD, по меньшей мере 6 PCD, по меньшей мере 7 PCD, по меньшей мере 8 PCD, по меньшей мере 9 PCD, по меньшей мере 10 PCD, по меньшей мере 15 PCD, по меньшей мере 20 PCD, по меньшей мере 25 PCD, по меньшей мере 30 PCD, по меньшей мере 35 PCD, по меньшей мере 40 PCD, по меньшей мере 45 PCD, по меньшей мере 50 PCD, по меньшей мере 75 PCD или по меньшей мере 100 PCD.

В определенных вариантах осуществления выход или титр продукции белка, которые можно выражать в граммах белкового продукта на литр среды для культивирования, из клеток, культивируемых в OS средах, составляет по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 1 г/л, по меньшей мере 1,2 г/л, по меньшей мере 1,4 г/л, по меньшей мере 1,6 г/л, по меньшей мере 1,8 г/л, по меньшей мере 2 г/л, по меньшей мере 2,5 г/л, по меньшей мере 3 г/л, по меньшей мере 3,5 г/л, по меньшей мере 4 г/л, по меньшей мере 4,5 г/л, по меньшей мере 5 г/л, по меньшей мере 5,5 г/л, по меньшей мере 6 г/л, по меньшей мере 6,5 г/л, по меньшей мере 7 г/л, по меньшей мере 7,5 г/л, по меньшей мере 8 г/л, по меньшей мере 8,5 г/л, по меньшей мере 9 г/л, по меньшей мере 9,5 г/л, по меньшей мере 10 г/л или по меньшей мере 20 г/л.

В определенных вариантах осуществления белковый продукт (представляющий интерес белок) представляет собой антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, полиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, фрагмент Fab или фрагмент $F(ab')_2$, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой антитело IgG4.

В определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит молекулу Fc и другой домен (например, слитый с Fc белок). В определенных вариантах осуществления слитый с Fc белок представляет собой слитый белок рецептор-Fc, который содержит один или несколько из одного или нескольких внеклеточных доменов рецептора, связанных с молекулой Fc. В определенных вариантах осуществления молекула Fc содержит шарнирную область с последующими доменами CH2 и CH3 IgG. В определенных вариантах осуществления слитый

белок рецептор-Fc содержит два или более различных рецепторных цепи, которые связываются с одним лигандом или несколькими лигандами. Например, слитый с Fc белок представляет собой ловушку, например, такую как ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит связывающую лиганд IL-1RAcP область, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки) ловушка VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159).

Настоящее изобретение для продукции белка не ограничено конкретным типом клеток. Примеры типов клеток, подходящих для продукции белка, включают клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки птиц, клетки бактерий и клетки дрожжей. Клетки могут представлять собой стволовые клетки или рекомбинантные клетки, трансформированные вектором для рекомбинантной экспрессии генов, или клетки, трансфицированные вирусом для продукции вирусных продуктов. Клетки могут содержать рекомбинантную гетерологичную полинуклеотидную конструкцию, кодирующую представляющий интерес белок. Эта конструкция может представлять собой эпису, или она может представлять собой элемент, который физически интегрирован в геном клетки. Также клетки могут продуцировать представляющий интерес белок без кодирования этого белка гетерологичной полипептидной конструкцией. Другими словами, клетка может кодировать представляющий интерес белок в природе, например В-клетка, продуцирующая антитело. Клетки также могут являться первичными клетками, такими как клетки куриного эмбриона или первичными линиями клеток. Примеры пригодных клеток включают клетки BSC, клетки LLC-MK, клетки CV-1, клетки COS, клетки VERO, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки CRFK, клетки RAF, клетки RK, клетки TCMK-1, клетки LLCPK, клетки PK15, клетки LLC-RK, клетки MDOK, клетки BHK-21, курица embryo клетки, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки BHK, клетки 293, клетки RK, клетки Per.C6 и клетки CHO. В различных вариантах осуществления линия клеток представляет собой производное клеток CHO, такое как мутантные линии CHO-K1, CHO DUX B-11, CHO DG-44, Veggie-CHO, GS-CHO, S-CHO или CHO lcc.

В одном из вариантов осуществления клетка, которая представляет собой клетку CHO, экспрессирует белок эктопически. В одном из вариантов осуществления белок содержит область тяжелой цепи иммуноглобулина, такую как область CH1, CH2 или CH3. В одном из вариантов осуществления белок содержит область CH2 и CH3 иммуноглобулина человека или грызуна. В одном из вариантов осуществления белок содержит область CH1, CH2 и CH3 иммуноглобулина человека или грызуна. В одном из вариантов осуществления белок содержит шарнирную область и область CH1, CH2 и CH3. В конкретном варианте осуществления белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления белок содержит вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления белок представляет собой антитело, такое как антитело человека, антитело грызуна или химерное антитело человека/грызуна (например, человека/мыши, человека/крысы или человека/хомяка).

Фазу продукции можно проводить в культуре любого масштаба от отдельных колб и колб на шейкере или одноразовых реакторов Wave bags, до одноклиторных биореакторов и до крупномасштабных промышленных биореакторов. Крупномасштабный процесс можно проводить в объеме приблизительно от 100 л до 20000 л или более. Для контроля продукции белка можно использовать одно или несколько средств, таких как температурный сдвиг или химическая индукция. Фаза роста может происходить при более высокой температуре, чем фаза продукции. Например, фаза роста может происходить при одной температуре приблизительно от 35 до 38°C, а фаза продукции может происходить при другой температуре приблизительно от 29 до 37°C, необязательно приблизительно от 30 до 36°C или приблизительно от 30 до 34°C. Кроме того, вместе, до или после температурного сдвига можно добавлять химические индукторы продукции белка, такие как кофеин, бутират, тамоксифен, эстроген, тетрациклин, доксициклин и бисацетамид гексаметилен (HMBА). Если индукторы добавляют после температурного сдвига, их можно добавлять в пределах от одного часа до пяти суток после температурного сдвига, например, в пределах от одних до двух суток после температурного сдвига. Продуцирующие культуры клеток можно запускать в качестве непрерывной подпитываемой системы культивирования, как в хемостате (см. С. Altamirano et al., *Biotechnol Prog.* 2001 Nov-Dec; 17(6): 1032-41), или в соответствии с процессом с периодической подпиткой (Huang, 2010).

Изобретение пригодно для улучшения продукции белка способами культивирования клеток. Линии клеток, используемые по изобретению, можно генетически конструировать для экспрессии полипептида, представляющего коммерческий или научный интерес. Генетическая инженерия линий клеток включает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток рекомбинантной полинуклеотидной молекулой или иной способ изменения (например, посредством гомологичной рекомбинации и активации генов или слияния рекомбинантной клетки с нерекомбинантной клеткой) для того, чтобы вызвать экспрессию клеткой-хозяином желаемого рекомбинантного полипептида. Способы и векторы для генетической инженерии клеток или линий клеток для экспрессии представляющего интерес полипептида хорошо известны специалистам в данной области; например, различные способы проиллюстрированы в Current

Protocols in Molecular Biology. Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988 и ежеквартальные обновления); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69. Широкий спектр линий клеток, подходящий для выращивания в культуре, доступен в American Type Culture Collection (Manassas, Va.) и у коммерческих поставщиков. Примеры линий клеток, широко используемых в промышленности, включают клетки VERO, BHK, HeLa, CV1 (включая Cos), MDCK, 293, 3T3, клетки миеломных линий (например, NSO, NS1), PC12, клетки WI38 и клетки яичника китайского хомяка (CHO). Клетки CHO широко используют для получения комплексных рекомбинантных белков, таких как цитокины, факторы свертывания крови и антитела (Brasel et al. (1996), Blood 88:2004-2012; Kaufman et al. (1988), J.Biol Chem 263:6352-6362; McKinnon et al. (1991), J Mol Endocrinol 6:231-239; Wood et al. (1990), J Immunol. 145:3011-3016). Желательными линиями клеток-хозяев CHO являются мутантные линии клеток с дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR) (Urlaub et al. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220), DXB1 1 и DG-44, так как эффективная система селекции и амплификации экспрессии гена на основе DHFR обеспечивает высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка в этих клетках (Kaufman RJ. (1990), Meth Enzymol 185:537-566). Кроме того, с этими клетками легко обращаться в качестве адгезивных или суспензионных культур, и они демонстрируют относительно хорошую генетическую стабильность. Клетки CHO и белки, рекомбинантно экспрессируемые ими, всесторонне охарактеризованы и одобрены для применения в клиническом и коммерческом производстве органами регулирования. В определенных вариантах осуществления линии клеток CHO представляют собой линии клеток, как описано в публикациях патентных заявок США №№ 2010/0304436 A1, 2009/0162901 A1 и 2009/0137416 A1 и патентах США №№ 7455988 B2, 7435553 B2 и 7105348 B2.

Настоящее изобретение не ограничено объемом указанных вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе, которые предназначены для иллюстрации отдельных аспектов или вариантов осуществления изобретения. В объем изобретения входят функционально эквивалентные способы и компоненты. Специалистам в данной области из приведенного выше описания и сопровождающих фигур в дополнение к описанному в настоящем документе очевидны различные модификации изобретения. Такие модификации находятся в объеме изобретения.

Изобретение частично основано на открытии, что добавление орнитина или комбинации орнитина и путресцина в не содержащие сыворотки среды для культивирования клеток приводит к увеличенному росту клеток, жизнеспособности и продукции полипептидов в рекомбинантно сконструированных линиях клеток животных (или природных клеток), экспрессирующих представляющий интерес белок, таким образом, увеличивая надежность культуры, улучшая выход представляющего интерес полипептида.

Пример 1. Увеличенная плотность культуры жизнеспособных клеток

В 250 мл встряхиваемую колбу проводили инокуляцию из затравочной культуры линии рекомбинантных продуцирующих антитела клеток, происходящих из CHO K1. Инокулированные клетки выращивали при 36,5°C в течение семи суток и подпитывали глюкозой на сутки три и пять. Клетки выращивали в каждой из двух раздельных химически определенных (не содержащих гидролизата и не содержащих сыворотки) средах. Первая среда содержала приблизительно 75 мМ аминокислот (среда 1), вторая среда содержала приблизительно 40 мМ аминокислот (среда 2), и оба состава содержали не более 2,5 мкМ (0,4 мг/л) путресцина. Другую группу условий среды получали, добавляя в среду 2 соевый гидролизат в концентрации 7,5 г/л. В каждую из трех контрольных сред добавляли приблизительно 593 мкМ орнитина (в виде 100 мг/л L-орнитина-HCl) или комбинация приблизительно 593 мкМ орнитина (в виде 100 мг/л L-орнитина-HCl) и приблизительно 714 мкМ путресцина (в виде 115 мг/л путресцина·2HCl). На сутки 3, 5 и 7 отбирали аликвоты по 3 мл культур и подсчет количества жизнеспособных клеток проводили с использованием исключения трипанового синего на устройстве BioProfile FLEX™ (Nova Biomedical). В начальные сутки все культуры содержали $0,8 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на мл. Для данных сред (среда 1, среда 2 или среда 2 + соя) количества жизнеспособных клеток через период семь суток продемонстрировали, что у клеток CHO, растущих в средах, дополненных орнитином или орнитином и путресцином, повышена плотность жизнеспособных клеток. Эффект в течение семисуточного периода был особенно выражен в не содержащих гидролизатов средах (например, от 2-кратного до 4-кратного или более возрастание плотности жизнеспособных клеток). Не содержащая гидролизата OS среда 2 действовала сравнимо с содержащей сою не OS средой 2, что указывает на то, что преимущество соевого гидролизата для роста клеток можно воспроизвести посредством замены на орнитин. Также наблюдали увеличенную плотность клеток при добавлении орнитина или орнитина и путресцин в среду 2 + соя. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Средняя плотность жизнеспособных клеток в культуре (10^6 клеток на миллилитр) и кратность увеличения по сравнению с исходным уровнем*

Добавка:	Время	Без добавок	Орнитин	Орнитин + путресцин
Среда 1	3 суток	2,4 / 1×	6,1 / 2,5×	5,0 / 2,1×
	5 суток	3,4 / 1×	12,6 / 3,7×	12,4 / 3,6×
	7 суток	3,6 / 1×	7,0 / 1,9×	6,8 / 1,9×
Среда 2	3 суток	1,7 / 1×	5,1 / 3,0×	5,2 / 3,1×
	5 суток	2,0 / 1×	7,6 / 3,8×	8,0 / 4,0×
	7 суток	1,6 / 1×	5,9 / 3,7×	5,8 / 3,6×
Среда 2 + соевый гидролизат	3 суток	5,2 / 1×	5,4 / 1×	4,7 / 0,9×
	5 суток	7,7 / 1×	9,3 / 1,2×	9,3 / 1,2×
	7 суток	н.д.	9,6 / н.д.	9,1 / н.д.

*Исходный уровень представляет собой среды без добавок для данного состава среды на данные сутки.

Авторы также изучили действие различных количеств орнитина·HCl (например, 50, 100 и 150 мг/мл) на плотность жизнеспособных клеток в среде 3, которая содержит приблизительно 75 мМ аминокислот и 0,4 мг/л путресцина HCl ("среда 3"). Для инокуляции 50 мл биореакторов TubeSpin® (TPP) при $0,4 \times 10^6$ клеток/мл в рабочем объеме 15 мл использовали одну культуру из системы посевных ферментеров линии рекомбинантных продуцирующих антитела клеток, происходящих из CHO K1. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C в течение трех суток. На сутки 3 отбирали аликвоты по 3 мл культур и определение количеств жизнеспособных клеток проводили с использованием исключения трипанового синего на устройстве BioProfile FLEX™ (Nova Biomedical). Все три уровня орнитина улучшали плотность клеток в среднем (N=3) немногим более чем в два раза. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2. Плотность жизнеспособных клеток в культуре (10^6 клеток на миллилитр) и кратность увеличения по сравнению с исходным уровнем*

	Контроль	Орнитин HCl		
Концентрация (мг/мл)	0	50	100	150
Плотность жизнеспособных клеток (10^6 клетки/мл)	1,3	3,2	3,1	3,1
Кратность увеличения по сравнению с контролем	1×	2,5×	2,4×	2,4×

*Исходный уровень представляет собой среду 3 без добавок.

Пример 2. Улучшенное время удвоения культуры клеток

В условиях различных сред для культивирования клеток определяли время удвоения линии рекомбинантных продуцирующих антитела клеток, происходящих из клеток CHO K1, в логарифмической фазе роста. Культуры из системы посевных ферментеров пересеивали при 36,5°C в 250 мл встряхиваемые колбы в течение периода 14 суток в каждой из трех отдельных сред: в среде 1, среде 2 и среде 2, содержащей соевый гидролизат (среда 2 + соя). На сутки 0 и во время посева в системе посевных ферментеров (каждые 2 или 3 суток) для каждого условия отбирали аликвоты по 1 мл и определение количеств жизнеспособных клеток проводили с использованием исключения трипанового синего на устройстве CDV™ (Nova Biomedical). Среду 1 тестировали без добавок или обогащенную орнитином·HCl в концентрации 100 мг/л или путресцином·2HCl в концентрации 115 мг/л и орнитином·HCl в концентрации 100 мг/л. Среду 2 с низким содержанием путресцина·2HCl (0,4 мг/л) тестировали без добавок или обогащенную орнитином·HCl в концентрации 100 мг/л или путресцином·2HCl в концентрации 115 мг/л и орнитином·HCl в концентрации 100 мг/л. Результаты приведены в таблицах 3 и 4. Для достижения значительного роста было необходимо обогащение среды 1 орнитином с путресцином или без. Обогащение не содержащей гидролизата среды 2 орнитином или орнитином + путресцин уменьшало время удвоения клеток приблизительно на величину от 25 до 30%. Также времена удвоения уменьшались после добавления орнитина или орнитина + путресцин в содержащую гидролизат среду 2 хоть и в меньшей степени.

Таблица 3. Время удвоения клеток (часы) и приблизительный процент уменьшения времени удвоения относительно исходного уровня* в среде 1

Добавка	Среда 1	
*Отсутствует	75	
Орнитин	23	69%
Путресцин + орнитин	21	72%

*Исходный уровень представляет собой среду 1 без добавок.

Таблица 4. Время удвоения клеток (часы) и приблизительный процент уменьшения времени удвоения относительно исходного уровня* в среде 2

Добавка	Среда 2		Среда 2 + соя	
*Без добавок	27		22,5	
Орнитин	21	22%	20,5	8,9%
Путресцин + орнитин	19,5	28%	21	6,7%

*Исходный уровень представляет собой среду 2 без добавок.

Пример 3. Увеличенные титры антител

После установления того, что добавление орнитина или орнитина + путресцина улучшает клеточную пролиферацию и плотность жизнеспособных клеток в культуре авторы дополнительно исследовали влияние этих условий на титры продуцируемых рекомбинантных белков. Авторы исследовали экспрессию и секрецию рекомбинантного IgG происходящей из CHO-K1 линией клеток. В этом эксперименте средний титр антител в культуре определяли на сутки семь в различных форматах сред. Как указано выше, тестировали среду 1 с низким содержанием путресцина (0,4 мг/л путресцина·2HCl), орнитина (100 мг/л орнитина·HCl) и с орнитином и путресцином (100 мг/л орнитина·HCl /115 мг/л путресцина·2HCl). Также тестировали среду 2 и среду 2 + соя с низким уровнем путресцина (0,4 мг/л путресцина·2HCl), орнитина (100 мг/л орнитина·HCl) и с орнитином и путресцином (100 мг/л орнитина·HCl /115 мг/л путресцина·2HCl). Во всех случаях добавление орнитина или орнитина и путресцина на уровне выше 0,4 мг/л приводило к значительно более высоким титрам белка, например, по меньшей мере приблизительно в два раза более высоким титрам. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5. Средние семисуточные титры антител и приблизительная кратность увеличения (×) титров относительно исходного уровня*

Добавка	среда 1		среда 2		среда 2 + соя	
Без добавок*	0,31 г/л	1×	0,29 г/л	1×	0,54 г/л	1×
Орнитин	0,94 г/л	3,0×	0,65 г/л	2,2×	0,98 г/л	1,8×
Путресцин + орнитин	0,95 г/л	3,1×	0,64 г/л	2,2×	1,07 г/л	2×

*Исходный уровень установлен на титр в средах каждого типа без добавок.

Авторы также исследовали влияние различных количеств орнитина·HCl (например, 50, 100 и 150 мг/мл) в среде 3 на продукцию антител. Для инокуляции 50 мл биореакторов TubeSpin® (TPP) при $0,4 \times 10^6$ клеток/мл в рабочем объеме 15 мл использовали одну культуру из системы посевных ферментеров линии рекомбинантных продуцирующих антитела клеток, происходящих из CHO K1. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C в течение трех суток. Все три уровня добавляемого орнитина улучшали титры антител в среднем (N=3) немногим более 50%. Результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6. Титры антител (грамм на литр) и кратность увеличения титров по сравнению с исходным уровнем*

	Контроль	Орнитин HCl		
Концентрация добавки (мг/мл)	0	50	100	150
Титр антитела (мг/мл)	79	120	127	124
Кратность увеличения относительно контроля	1×	1,5×	1,6×	1,6×

*Исходный уровень представляет собой среду 3 без добавок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Среда для культивирования клеток, которая не содержит сыворотки и гидролизата белков, содержащая $0,6 \pm 0,09$ мМ орнитина, $0,714 \pm 0,11$ мМ путресцина и смесь аминокислот или их солей.
2. Среда для культивирования клеток по п.1, в которой смесь аминокислот или их солей содержит не менее 40 ± 6 мМ смеси аминокислот или их солей.
3. Среда для культивирования клеток по п.1 или 2, в которой смесь аминокислот или их солей состоит из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.
4. Среда для культивирования клеток по любому по пп.1-3, дополнительно содержащая одну или несколько жирных кислот.
5. Среда для культивирования клеток по п.4, в которой одна или несколько жирных кислот выбраны из линолевой кислоты, липоевой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, каприловой кислоты, лауриновой кислоты, гексановой кислоты, лигноцериновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты.
6. Среда для культивирования клеток по любому по пп.1-5, дополнительно содержащая смесь нуклеозидов.
7. Среда для культивирования клеток по п.6, в которой смесь нуклеозидов включает аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.
8. Среда для культивирования клеток по п.7, дополнительно содержащая один или несколько двухвалентных катионов.
9. Среда для культивирования клеток по п.8, в которой один или несколько двухвалентных катионов выбраны из магния и кальция.
10. Способ культивирования клеток, включающий этапы:
 - (а) предоставление среды для культивирования клеток по любому из предшествующих пунктов и
 - (б) размножение или поддержание клеток в указанной среде с получением культуры клеток.
11. Способ по п.10, где клетка выбрана из клетки млекопитающего, клетки птицы, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки дрожжей.
12. Способ по п.11, где клетка представляет собой клетку СНО.
13. Способ по п.12, где клетка экспрессирует представляющий интерес белок.
14. Способ по п.13, где представляющий интерес белок представляет собой антигенсвязывающий белок.
15. Способ по любому по пп.13, 14, где представляющий интерес белок содержит домен Fc.
16. Способ по любому по пп.13, 14, где представляющий интерес белок представляет собой слитый белок рецептор-Fc.
17. Способ по п.16, где слитый белок рецептор-Fc представляет собой белок-ловушку.
18. Способ по п.17, где белок-ловушка представляет собой антагонист IL-1 или антагонист VEGF.
19. Способ по любому по пп.13, 14, где представляющий интерес белок представляет собой антитело или фрагмент антитела.
20. Способ по п.19, где антитело или фрагмент антитела представляют собой рекомбинантное антитело человека или его фрагмент.
21. Способ по любому по пп.10-20, где среднее время удвоения клеток составляет не более 30 ч.
22. Способ по любому по пп.10-20, где среднее время удвоения клеток составляет не более 24 ч.
23. Способ по любому из пп.10-20, где культура клеток способна достигать плотности жизнеспособных клеток, которая по меньшей мере на 15% больше, чем у культуры клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина
24. Способ по любому из пп.10-20, где культура клеток способна достигать плотности жизнеспособных клеток по меньшей мере в 3 раза больше, чем у культуры клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.
25. Способ по любому по пп.10-20, дополнительно включающий добавление одной или нескольких добавок, которые выбраны из NaHCO_3 , глутамина, инсулина, глюкозы, CuSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , NiSO_4 , Na_4 ЭДТА и цитрата Na_3 .
26. Способ получения белка, представляющего интерес, включающий этапы:
 - (а) введение в клетку нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую представляющий интерес белок;
 - (б) отбор клетки, несущей эту нуклеиновую кислоту;
 - (с) культивирование отобранной клетки в среде для культивирования клеток по любому по пп.1-9 и
 - (д) экспрессия представляющего интерес белка в клетке, причем представляющий интерес белок секретируется в среду.

27. Способ по п.26, где клетка представляет собой клетку CHO, клетку НЕК293 или клетку ВНК.
28. Способ по любому из пп.26 или 27, где представляющий интерес белок представляет собой антигенсвязывающий белок.
29. Способ по любому из пп.26-28, где представляющий интерес белок содержит домен Fc.
30. Способ по п.28 или 29, где представляющий интерес белок выбран из антитела, слитого с Fc белка и белка ScFv.
31. Способ по п.30, где слитый с Fc белок представляет собой слитый белок растворимого TCR-Fc или слитый белок рецептор-Fc (TRAP).
32. Способ по любому из пп.28-31, где представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере на 7% больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.
33. Способ по любому из пп.28-31, где представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере на 14% больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.
34. Способ по любому из пп.28-31, где представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере на 80% больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.
35. Способ по любому из пп.28-31, где представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере в 2 раза больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.
36. Способ по любому из пп.28-31, где представляющий интерес белок получают со средним 7-суточным титром, который по меньшей мере в 3 раза больше, чем средний 7-суточный титр, получаемый при культивировании клеток в среде, которая содержит менее $0,09 \pm 0,014$ мМ орнитина и менее $0,2 \pm 0,03$ мМ путресцина.
37. Способ по любому из пп.28-31, где представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантное антитело человека.

