

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041694**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.23

(21) Номер заявки
201890137

(22) Дата подачи заявки
2016.08.03

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

(54) СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК С ДОБАВЛЕНИЕМ ТАУРИНА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/200,689

(32) 2015.08.04

(33) US

(43) 2018.07.31

(86) PCT/US2016/045403

(87) WO 2017/024062 2017.02.09

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

(72) Изобретатель:
**Джонсон Эми С., Кэйси Меган Е.,
Ошоди Шадиа, Лоуренс Шон (US)**

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

(56) WO-A1-2014145098

WO-A1-9964578

JINFENG MIAO ET AL.: "Taurine attenuates lipopolysaccharide-induced disfunction in mouse mammary epithelial cells", CYTOKINE, ACADEMIC PRESS LTD, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 59, no. 1, 11 April 2012 (2012-04-11), pages 35-40, XP028513251, ISSN: 1043-4666, DOI: 10.1016/J.CYTO.2012.04.009 [retrieved on 2012-04-19] the whole document

WO-A1-2014058025

US-A1-2008008695

(57) В настоящем изобретении описана композиция, содержащая улучшенную среду для культивирования эукариотических клеток, которую можно применять для получения представляющего интерес белка. Таурин можно добавлять в бессывороточные среды или химически определяемые среды для повышения образования представляющего интерес белка. Предусмотрены способы рекомбинантной экспрессии высоких уровней белка с помощью средовых композиций.

B1

041694

041694

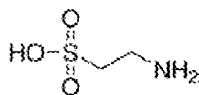
B1

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к среде и способам культивирования клеток и получения рекомбинантных белков. В частности, настоящее изобретение относится к среде с добавлением таурина и способам культивирования в ней рекомбинантных эукариотических клеток с целью получения биопрепаратов на основе белка.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Органическая кислота таурин, часто называемая β-аминокислотой, встречается в высоких концентрациях в большинстве тканей и представляет собой производное аминокислоты цистеина (Huxtable, R.J., 1992, *PhysiolRev*, 72:101-163).



Структура таурина

Таурин присутствует во многих тканях человека и других видов млекопитающих, например головном мозге, сетчатке, миокарде, скелетных и гладких мышцах, тромбоцитах и нейтрофилах.

Признано, что таурин способствует осморегуляции, стабилизации мембран и противовоспалительному эффекту, а также регулирует синтез митохондриальных белков посредством повышения активности цепи переноса электронов, что защищает от образования супероксидов (Jong et al., 2010, *Journal of Biomedical Science* 17(Suppl 1):S25; Jong et al., 2012, *Amino Acids* 42:2223-2232sw). В первичных культурах нейронов таурин был описан в качестве цитопротектора благодаря подавлению индуцированной глутаматом токсичности. Были разработаны различные среды для культивирования эмбрионов, содержащие таурин.

Методики культивирования клеток, предусматривающие аминокислотные подпитки, давно применяются при получении рекомбинантных белков из культивируемых клеток. Аминокислоты представляют собой предшественники биосинтеза, источники энергии, осмолиты и т.д., и их применение в культурах-продуцентах существенно связано с непрерывным клеточным ростом и продуктивностью.

В то же время физиологические события, которые способствуют продуктивности и высокоэффективной экспрессии белков, являются бесчисленными, и конкурирующие активности и транспортные механизмы делают разработку стратегий подпитки сложной проблемой. Тип аминокислотной добавки и время добавления также может оказывать влияние на качество белка, образующегося в культуре (Altamirano, et al., 2006, *Electron. J. Biotechnol.* 9:61-67). Накопление побочных продуктов часто является проблематичным при получении культуры клеток и считается следствием несбалансированности питательных веществ в культуре клеток, в конечном итоге подавляющей клеточный рост (Fan, Y. et al. *Bio-technolBioeng.* 2015 Mar; 112(3):521-35). Гипотаурин или его аналог или предшественник был предложен при культивировании клеток для достижения желаемых результатов снижения интенсивности окраски композиции, содержащей полученный рекомбинантным путем полипептид (WO 2014145098 A1, опубликовано 18 сентября 2014 г.). Также была описана среда для культивирования клеток, которая способствует созреванию незрелых клеток пигментного эпителия сетчатки в зрелые клетки пигментного эпителия сетчатки (WO 2013184809 A1, опубликовано 12 декабря 2013 г.). Однако оптимизация продуктивности рекомбинантных белков в культурах с добавлением таурина не является общепризнанной в данной области. Способы культивирования клеток, которые повышают продуктивность экспрессируемых рекомбинантных путем белков, сводя к минимуму выход потенциально токсичных побочных продуктов клеточного метаболизма, таких как аммиак, являются крайне желательными. Любой стабильный рост продуктивности можно приравнять к значительно более высокому обеспечению биотерапевтического продукта в промышленном объеме.

Таким образом, в данной области существует необходимость в среде и способах культивирования клеток млекопитающих, где среда обеспечивает нормальный и устойчивый рост и поддержание клеток и получение высоких титров биофармацевтической лекарственной субстанции.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Авторы настоящего изобретения сделали неожиданное открытие, заключающееся в том, что включение таурина в среду для культивирования клеток повышает специфическую продуктивность клеток и способствует снижению образованию побочного аммиачного продукта этими клетками. Различные стратегии подпитки, включающие таурин, способствуют получению повышенных титров белка. Кроме того, добавление таурина не оказывает отрицательного влияния на характеристики культуры или качество образующихся антител.

Настоящее изобретение предусматривает способ получения терапевтического белка с высоким выходом, предусматривающий культивирование линии рекомбинантных клеток в среде, содержащей таурин, где линия клеток содержит стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок.

Настоящее изобретение относится к среде для культивирования клеток, которая является бессыво-

роточной и содержит от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ таурина. Настоящее изобретение относится к среде для культивирования клеток, которая является бессывороточной и содержит от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 1 мМ таурина, от приблизительно 0,2 до приблизительно 1 мМ таурина, от приблизительно 0,3 до приблизительно 1 мМ таурина, от приблизительно 0,4 до приблизительно 1 мМ таурина или от приблизительно 0,5 до приблизительно 1 мМ таурина. Настоящее изобретение относится к среде для культивирования клеток, которая является бессывороточной и содержит от приблизительно 1 мМ до приблизительно 10 мМ таурина. Настоящее изобретение относится к среде для культивирования клеток, которая является бессывороточной и содержит от приблизительно 1 мМ до приблизительно 5 мМ таурина, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 6 мМ таурина, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 7 мМ таурина, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 8 мМ таурина или от приблизительно 1 мМ до приблизительно 9 мМ таурина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среда дополнительно содержит дополнительные аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, глицина, пролина, аланина, валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среда содержит <16 г/л гидролизата. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среда не содержит гидролизата.

В соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит основную среду, которая является химически определяемой, например, изготовленный по заказу состав, или коммерчески доступную основную среду. В соответствии с одним вариантом осуществления полная среда является химически определяемой, не содержит сывороток и не содержит гидролизата.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вся среда, в том числе основная среда и подпитки, содержит суммарно по меньшей мере 115 мМ смеси аминокислот или солей аминокислот. В соответствии с одним вариантом осуществления смесь аминокислот содержит аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, глицина, пролина, аланина, валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана, в количестве, выбранном из табл. 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среда содержит одну или несколько жирных кислот. В соответствии с одним конкретным вариантом осуществления среда содержит смесь жирных кислот (или производных жирных кислот) и альфа-токоферол. Жирные кислоты или производные жирных кислот выбирают из группы, состоящей из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, тиоктовой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидоновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, декановой кислоты, додекановой кислоты, гексановой кислоты, лигноцериновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среда содержит смесь нуклеотидов. В соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среда содержит смесь солей. Соли включают в себя двухвалентные катионы, такие как кальций и магний. В соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит хлорид кальция и сульфат магния. Другие соли могут включать в себя фосфаты.

В соответствии с одним вариантом осуществления среда (1) содержит 0,1±0,015 мМ, 1±0,015 мМ, 3±0,05 мМ, 5±0,10 мМ, 7±0,15 мМ или 10±0,2 мМ таурина, (2) содержит <16 г/л гидролизата, (3) является бессывороточной, (4) необязательно дополнительно содержит смесь аминокислот, (5) содержит смесь жирных кислот, (6) содержит смесь нуклеозидов, в том числе аденозина, гуанозина, цитидина, уридина, тимидина и гипоксантина, и (7) содержит соли кальция, магния и фосфат.

Настоящее изобретение предусматривает способ получения представляющего интерес белка с высоким выходом, предусматривающий культивирование линии рекомбинантных клеток в среде для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ таурина, где линия клеток содержит стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок. В соответствии с другими вариантами осуществления среда включает в себя любое из вышеуказанных аспектов по настоящему изобретению.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение предусматривает способ культивирования эукариотических клеток с целью повышения образования рекомбинантного белка, предусматривающий стадии (а) размножения или поддержания клеток в определяемой среде для культивирования клеток во время фазы роста, (b) добавления основной среды для культивирования клеток, содержащей приблизительно от 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ L-таурина, и экспрессии представляющего интерес рекомбинантного белка во время фазы образования продукта, и (с) повышения титра представляющего интерес белка посредством добавления таурина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления добавление таурина предусмотрено по меньшей мере один раз во время фазы образования продукта, или два раза, три раза, четыре раза, или пять раз во время фазы образования продукта, или каждый день во время фазы образования продукта. В соответствии с другими вариантами осуществления способ дополнитель-

но предусматривает добавление среды для культивирования от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ L-таурина во время фазы роста. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает повышение образования рекомбинантного белка по сравнению с эукариотическими клетками без добавления таурина или с добавлением таурина в количестве менее 0,1 мМ и при одинаковых в ином отношении условиях.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение предусматривает способ культивирования клеток в среде для культивирования клеток, например, любом варианте осуществления среды, описанном в вышеизложенном аспекте. В соответствии с одним вариантом осуществления способ предусматривает стадии размножения или поддержания клетки или клеток в среде, которая (1) содержит таурин в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1+0,015 мМ, (2) содержит <16 г/л гидролизата или не содержит гидролизата, (3) не содержит сывороток, (4) необязательно содержит аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из смеси аминокислот, выбранных из табл. 1.

В соответствии с одним вариантом осуществления необязательную смесь аминокислотных добавок выбирают из группы, состоящей из аминокислот в табл. 1.

Таблица 1

Аминокислота	Диапазон мМ (ммоль/л)	Диапазон (г/л)
Аланин	0-11,2	0-1
Аргинин	2,4-11,9	0,5-2,5
Аспарагинин	1,3-33,3	0,2-5
Аспарагининовая кислота	1,5-93,9	0,2-12,5
Цистеин	1,1-19,9	0,2-3,5
Глутаминовая кислота	1,4-47,6	0,2-7
Глутамин	0-23,9	0-3,5
Глицин	0-16,7	0-1,25
Гистидин	1-9,5	0,2-2
Изолейцин	1,5-22,9	0,2-3
Лейцин	1,5-38,1	0,2-5
Лизин	2,7-24,6	0,5-4,5
Метионин	1,3-13,4	0,2-2
Фенилаланин	1,2-18,2	0,2-3
Пролин	1,7-26,1	0,2-3
Серин	1,9-57,1	0,2-6
Треонин	1,7-33,6	0,2-4
Триптофан	0,5-14,7	0,1-3
Тирозин	0,9-22,2	0,2-5
Валин	1,7-34,1	0,2-4

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка или клетки представляют собой клетки млекопитающих, клетки птиц, клетки насекомых, клетки дрожжей или бактериальные клетки. В соответствии с одним вариантом осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающих, пригодные для получения рекомбинантных белков, такие как клетки CHO или производное CHO-K1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетки экспрессируют представляющий интерес белок, такой как биотерапевтический белок. Биотерапевтический белок может представлять собой антигенсвязывающий белок, который может содержать Fc-домен. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представляющий интерес белок представляет собой Fc-слитый белок, такой как молекула ScFv или молекула-ловушка. Молекулы-ловушки включают без ограничения белок-ловушку для VEGF и белок-ловушку для IL-1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представляющий интерес белок представляет собой антитело, такое как моноклональное антитело человека, гуманизированное моноклональное антитело, биспецифическое антитело или фрагмент антитела.

Учитывая положительные эффекты на получение белка при включении таурина в различные формы бессывороточных сред, клетки, культивируемые в соответствии с этим способом, образуют в среднем повышенный титр белка. В соответствии с одним вариантом осуществления при сравнении с титром белка в среде, которую не дополняли таурином, клетки, выращиваемые в среде с добавлением таурина в

соответствии с этим способом, образуют белки, имеющие титр белка, который по меньшей мере на 8% больше, чем титр контрольной культуры сравнения (т.е. культуры, которую не дополняли таурином). В соответствии с одним вариантом осуществления клетки, выращиваемые в культуре с добавлением таурина, при сравнении с титром белка в среде, которую не дополняли таурином, образуют титр белка, который 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% или по меньшей мере на 29% больше, чем контрольная культура сравнения.

Аналогично включение таурина в отдельности в бессывороточные среды способствует тому, что в культивируемых клетках достигают более низкого уровня побочного аммиачного продукта, чем без включения таурина. В соответствии с одним бессывороточным и не содержащим гидролизата вариантом осуществления среды с добавлением таурина в культуре клеток можно достичь сниженного уровня аммиачного побочного продукта (mM NH_3), который от по меньшей мере на 4% ниже до 32% ниже, чем в аналогичной культуре клеток, которая не содержит добавки (т.е. менее 0,1 mM таурина или без добавления таурина).

В соответствии с другим вариантом осуществления способ предусматривает стадию добавления одной или нескольких целевых добавок к среде для культивирования клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целевая добавка представляет собой любую одну или несколько из NaHCO_3 , глутамина, инсулина, глюкозы, CuSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , NiSO_4 , Na_4EDTA и цитрата Na_3 . В соответствии с одним вариантом осуществления способ предусматривает стадию добавления каждого из следующих целевых химических соединений к среде для культивирования клеток: NaHCO_3 , глутамина, инсулина, глюкозы, CuSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , NiSO_4 , Na_4EDTA и цитрата Na_3 . В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целевые добавки можно включать в среду на начальном этапе.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления аспект предусматривает способ культивирования клеток в бессывороточной среде, которая состоит фактически из (1) таурина в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 mM ; (2) содержит <16 г/л гидролизата, (3) является бессывороточной, (4) необязательно дополнительно содержит суммарно по меньшей мере приблизительно 20 mM , или по меньшей мере приблизительно 25 mM , или по меньшей мере приблизительно 30 mM , или по меньшей мере приблизительно 40 mM , или по меньшей мере приблизительно 50 mM , или по меньшей мере приблизительно 60 mM , или по меньшей мере приблизительно 70 mM смеси аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение предусматривает способ получения представляющего интерес белка, предусматривающий стадии (1) введения в клетку последовательно нуклеиновой кислоты, которая кодирует представляющий интерес белок; (2) выбора клетки или клеток, экспрессирующих представляющий интерес белок; (3) культивирования выбранной клетки в соответствии с вариантом осуществления бессывороточной среды для культивирования клеток, описанной в предыдущем аспекте или в соответствии с любым вариантом осуществления способа, описанного в настоящем документе; и (4) экспрессии представляющего интерес белка в клетке, где представляющий интерес белок секретируется в среду. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка, используемая при получении белка, представляет собой клетку млекопитающего, способную образовывать биотерапевтическое средство, такую как клетку CHO, 293 и ВНК, или любые их производные. В соответствии с одним вариантом осуществления клетка представляет собой клетку CHO, такую как клетка CHO-K1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представляющий интерес белок представляет собой антигенсвязывающий белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представляющий интерес белок представляет собой белок, который имеет Fc-домен. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие два представляющие интерес белка могут перекрываться, например, в случае, рецепторного Fc-слитого белка, антитела и ScFv белка, в качестве примера. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления представляющий интерес белок представляет собой антитело, такое как антитело человека или гуманизированное антитело, фрагмент антитела, такой как Fab или F(ab')_2 , биспецифическое антитело, молекулу-ловушку, такую как белок-ловушку для VEGF или белок-ловушку для IL-1, молекулу ScFv, растворимый TCR-Fc-слитый белок или т.п.

В соответствии с одним вариантом осуществления представляющий интерес белок способен образовываться при среднем титре в 14-й, 15-й, 16-й или 17-й день, который по меньшей мере на 8% больше, чем средний титр в 14-й, 15-й, 16-й или 17-й день, образуемый аналогичной клеткой в бессывороточной среде, которая содержит менее 0,1 mM или не предусматривает добавления таурина. В соответствии с одним вариантом осуществления представляющий интерес белок способен образовываться при среднем титре в 6-й, 7-й, 8-й, 9-й, 10-й, 11-й, 12-й, 13-й, 14-й, 15-й, 16-й или 17-й день, который 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% или по меньшей мере на 29% больше, чем средний титр в 6-й, 7-й, 8-й, 9-й, 10-й, 11-й, 12-й, 13-й, 14-й, 15-й, 16-й или 17-й день, образуемый аналогичной клеткой в бессывороточной среде для культивирования клеток, которая содержит менее 0,1 мМ таурина или не предусматривает добавления такового.

В соответствии с другим вариантом осуществления представляющий интерес белок образуется в результате (1) введения в клетку СНО последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует представляющий интерес белок, такой как антитело или другой антигенсвязывающий белок; (2) выбора клетки, стабильно экспрессирующей представляющий интерес белок; (3) культивирования выбранной клетки в бессывороточной среде, содержащей от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ таурина.

Краткое описание чертежа

На чертеже показан титр (выход) белка из образцов, извлекаемых в каждый день из культуры-продуцента в культуре клеток, образующей Ab3, где предусмотрено добавление таурина (сплошные квадраты, соединенные сплошными линиями) по сравнению с ситуацией, где не предусмотрено добавление таурина (х, соединенные пунктирными линиями). Преимущества культуры с добавлением таурина для выхода белка можно наблюдать уже на 6-й день культивирования с образованием продукта.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также необходимо понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления, и не носит ограничивающий характер, поскольку область настоящего изобретения определена формулой изобретения.

Используемые в настоящем описании и прилагаемой форме изобретения формы существительного единственного числа включают формы множественного числа, если контекст четко не определяет иное. Таким образом, например, ссылка на "способ" включает один или несколько способов и/или стадий, описанных в настоящем документе, и/или которые станут очевидными специалистам в данной области при прочтении настоящего раскрытия.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, как обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или равноценные тем, которые описаны в настоящем документе, можно использовать при практическом осуществлении настоящего изобретения, ниже описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упоминаемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Авторы настоящего изобретения сделали неожиданное открытие, заключающееся в том, что добавление таурина к среде для культивирования клеток повышает образование белка рекомбинантной клеткой в культуре клеток по сравнению со средой для культивирования клеток, которая содержит очень мало или не содержит таурина.

Перед описанием культур клеток и способов настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что применяемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не носит ограничивающий характер.

Названия разделов, используемые в настоящем документе, представлены лишь для организационных целей, и не предполагают ограничивать описываемый предмет изобретения. Способы и методики, описываемые в настоящем документе, как правило, осуществляют в соответствии со стандартными способами, известными в данной области, и описанными в различных общих и более конкретных источниках, которые упомянуты и описаны по всему настоящему описанию, если не указано иное. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001) and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), Julio E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998), и Dieffenbach and Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995). Все публикации, упоминаемые по всему настоящему раскрытию, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Определения

"Таурин" также известен как 2-аминоэтансульфоновая кислота (номенклатура IUPAC; регистрационный номер в CAS 107-35-7). Термины "таурин" и "L-таурин" используются взаимозаменяемо для обозначения одного и того же органического соединения. Таурин представляет собой органическую кислоту, содержащую аминокислотную группу, однако не считается "аминокислотой" в традиционном понимании спе-

циалистов в данной области, когда аминокислоты содержат как аминогруппу, так и карбоксильную группу. Биосинтез таурина происходит, когда гипотаурин, который представляет собой производное цистеина, превращается в таурин в результате окисления.

Термины "добавка", "добавление", "с добавлением" и т.п. относятся к добавлению элемента, компонента, молекулы и др., которые можно использовать в среде для культивирования клеток для поддержания и/или активации роста и/или дифференцировки клеток, в целях расширения или усиления свойства культуры в целом или для восполнения недостатка. С этой точки зрения добавление таурина предусматривает добавление таурина в определенной концентрации в раствор к среде для культивирования.

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо по всему описанию и относятся к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, соединенных друг с другом пептидной связью. Пептиды, полипептиды и белки могут также включать в себя модификации, такие как гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксилирование и АДФ-рибозилирование. Пептиды, полипептиды и белки могут представлять собой научный или коммерческий интерес, в том числе лекарственные средства на основе белка. Пептиды, полипептиды и белки включают в себя, в числе прочего, антитела и химерные или слитые белки. Пептиды, полипептиды и белки образуются линиями рекомбинантных животных клеток с помощью способов культивирования клеток.

Термин "гетерологичная полинуклеотидная последовательность", используемый в настоящем документе, относится к полимерам нуклеиновой кислоты, кодирующим представляющие интерес белки, такие как химерные белки (аналогичные молекулам-ловушкам), антитела или части антител (например, VH, VL, CDR3), которые образуются в качестве биофармацевтической лекарственной субстанции. Гетерологичная полинуклеотидная последовательность может быть получена с помощью методик генной инженерии (например, такая как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, лишенная интронов последовательность и т.д.) и введена в клетку, где она может быть расположена в виде эписомы или интегрирована в геном клетки. Гетерологичная полинуклеотидная последовательность может представлять собой встречающуюся в природе последовательность, которая включена в эктопический участок в геноме продуцирующей клетки. Гетерологичная полинуклеотидная последовательность может представлять собой встречающуюся в природе последовательность из другого организма, такую как последовательность, кодирующую ортолог человека.

Термин "антитело" относится к иммуноглобулиновой молекуле, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR или VH) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет вариабельный участок легкой цепи и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена (CL). VH- и VL-участки могут быть дополнительно разделены на участки гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, упорядоченных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает в себя ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает в себя молекулы антител, получаемые, экспрессируемые, образующиеся или выделяемые с помощью рекомбинантных средств, такие как антитела, выделяемые из клетки-хозяина, трансфицированной с целью экспрессии антитела. Термин антитело также включает в себя биспецифическое антитело, которое включает в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним отличающимся эпитопом. Биспецифические антитела в целом описаны в публикации заявки на выдачу патента США №2010/0331527, которая включена посредством ссылки в настоящий документ.

Термин "антигенсвязывающий участок" антитела (или "фрагмент антитела") относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий участок" антитела, включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; (ii) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), который состоит из VH-домена, (vi) выделенный CDR, (vii) scFv, который состоит из двух доменов Fv-фрагмента, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием одиночной белковой цепи, в которой VL- и VH-участки соединяются попарно с образованием моновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диантитела, также охвачены термином "антитело" (см., например, Holliger et al. (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Более того, антитело или его антигенсвязывающий участок может представлять собой часть более крупной иммуноадгезивной молекулы, образованной с помощью ковалентной или нековалентной ассо-

циации антитела или участка антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких иммуноадгезивных молекул включают применение коровьего участка стрептавидина с образованием тетрамерной scFv-молекулы (Kipriyanov et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) и применение цистеинового остатка, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки с образованием бивалентных и биотинилированных scFv-молекул (Kipriyanov et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Участки антител, такие как Fab- и F(ab')₂-фрагменты, могут быть получены из целых антител с помощью стандартных методик, таких как переваривание папаином или пепсином целых антител. Более того, антитела, участки антител и иммуноадгезивные молекулы можно получить с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, широко известных из уровня техники (см. Sambrook et al., 1989).

Термин "антитело человека" включает в себя антитела, имеющие вариабельные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин "антитело человека", используемое в настоящем документе, не включает в себя антитела, в которых CDR-последовательности, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Термин "рекомбинантное антитело человека", используемое в настоящем документе, включает в себя все антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных средств, такие как антитела, экспрессируемые с помощью рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделяемые из комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител человека, антитела, выделяемые из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см., например, Taylor et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295), или антитела, получаемые, экспрессируемые, образующиеся или выделяемые любым другим способом, включающим соединение последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в соответствии с определенными вариантами осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают *in vitro* мутагенезу (или при применении животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-участков рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, при том, что получены из VH- и VL-последовательностей зародышевой линии человека либо были отнесены к ним, могут не встречаться в природе в репертуаре зародышевой линии антител человека *in vivo*.

"Fc-слитые белки" содержат часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-участок иммуноглобулиновой молекулы, которые в ином случае не встречаются совместно в природе. Получение слитых белков, содержащих гетерологичные полипептиды, слитые с различными участками полученных из антител полипептидов (в том числе Fc-доменом), было описано, например, 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", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11, 1992. "Рецепторные Fc-слитые белки" содержат один или несколько доменов рецептора, связанного с Fc-фрагментом, который в соответствии с некоторыми вариантами осуществления содержит шарнирный участок, за которым следует CH₂- и CH₃-домен иммуноглобулина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc-слитый белок содержит две или более отдельных цепей рецептора, которые связываются с одним или несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок-ловушку, такой как, например, белок-ловушка для IL-1 (например, рилонцепт, который содержит связывающий лиганд RACp участок IL-1, слитый с внеклеточным участком R1 IL-1, слитым с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004), или белок-ловушка для VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig Flt1 рецептора VEGF, слитого с доменом 3 Ig Flk1 рецептора VEGF, слитого с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159).

Культивирование клеток

Термины "среда для культивирования клеток" и "среда для культивирования" относятся к раствору питательных веществ, применяемому для выращивания клеток млекопитающих, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, таких как углеводный источник энергии, незаменимые (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и заменимые (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глицин, пролин, серин и тирозин) аминокислоты, следовые элементы, источники энергии, липиды, витамины и др. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например, сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые обеспечивают исходные материалы, которые поддерживают клеточный рост. Среды могут содержать экстракты дрожжевого происхождения или соевые экстракты вместо экстрактов животного происхождения. Химически определяемая среда относится

к среде для культивирования клеток, в которой все из химических компонентов являются известными (т.е. имеют известную химическую структуру). Химически определяемая среда не содержит никаких компонентов животного происхождения, таких как пептоны сывороточного или животного происхождения. В соответствии с одним вариантом осуществления среда представляет собой химически определяемую среду.

Раствор может также содержать компоненты, которые усиливают рост и/или выживание свыше минимальной величины, в том числе гормоны и факторы роста. Раствор предпочтительно составляют в соответствии с рН и концентрацией солей, которые оптимальны для выживания и пролиферации клеток.

Термин "линия клеток" относится к клетке или клеткам, которые получены из конкретной линии посредством серийного пассирования или пересеивания клеток. Термин "клетки" используется взаимозаменяемо с термином "клеточная популяция".

Термин "клетка" включает в себя любую клетку, которая является подходящей для экспрессии последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Клетки включают в себя клетки эукариот, такие как животные клетки, не принадлежащие человеку, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки птиц, клетки насекомых, клетки дрожжей или слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квандромы. В соответствии с определенными вариантами осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В соответствии с другими вариантами осуществления клетку выбирают из следующих клеток: CHO (например, CHO-K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, например, Jurkat (Т-лимфоцита) или Daudi (В-лимфоцита), A431 (эпидермальной), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, клетки MMT, стволовой клетки, опухолевой клетки и линии клеток, полученной из вышеупомянутой клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка содержит один или два вирусных гена, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6®). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой клетку CHO. В соответствии с другими вариантами осуществления клетка представляет собой клетку CHO-K1.

Один аспект настоящего изобретения относится к культуре для посева, в которой клеточную популяцию разрачивают перед получением белка и сбором культуры-производителя. Таурин можно добавлять к основной среде в составе на основе культуры для посева в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше.

Другой аспект настоящего изобретения относится к культуре-производителю, в которой белок образуется и его собирают. Перед фазой образования продукта обычно происходит фаза роста (также известная как культивирование в системе посевных ферментеров или культивирование для посева), где все компоненты для культивирования клеток подаются в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования, затем клеточную популяцию разрачивают до готовности для промышленного объема. Соответственно сосуд для культивирования засевают клетками при подходящей плотности засева для начальной фазы клеточного роста в зависимости от исходной линии клеток. В соответствии с некоторыми аспектами таурин можно добавлять к основной среде для культивирования в составе на основе культуры для посева в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, с целью дополнительного улучшения или повышения продуктивности клеток в последующей фазе образования продукта.

Один аспект настоящего изобретения относится к культуре-производителю, где условия культивирования модифицируют для усиления роста рекомбинантных эукариотических клеток, повышая при этом образование одного или нескольких представляющих интерес рекомбинантных белков такими клетками и поддерживая жизнеспособность клеток, в частности, с помощью добавления таурина к среде культуры-производителя и/или культуре для системы посевных ферментеров. В сосуде для культивирования продукта или биореакторе исходную среду для культивирования или клетки подают в сосуд для культивирования после фазы культивирования для посева или фазы роста. В соответствии с определенными вариантами осуществления клеточный супернатант или клеточный лизат собирают после культивирования с образованием продукта. В соответствии с другими вариантами осуществления представляющий интерес полипептид или белок извлекают из среды для культивирования или клеточного лизата, или так или иначе в зависимости от локализации представляющего интерес белка, с помощью методик, широко известных в данной области.

Сосуды для культивирования включают без ограничения луночные планшеты, Т-колбы, встряхиваемые колбы, сосуды с мешалкой, вращающиеся колбы, полволоконные биореакторы с воздушным подъемом и т.п. Подходящий сосуд для культивирования клеток представляет собой биореактор. Биореактор относится к сосуду для культивирования, который изготовлен или сконструирован для манипуляции или контроля средовых условий. Такие сосуды для культивирования широко известны из уровня техники.

Процессы и системы биореакторов были разработаны с целью оптимизации газообмена, доставки достаточного количества кислорода для поддержания роста и продуктивности клеток и удаления CO₂.

Поддержание эффективности газообмена является важным критерием обеспечения эффективного расширения объема культивирования клеток и образования белка. Такие системы являются общеизвестными специалисту в данной области.

В фазе образования полипептидного продукта термин "культивирование клеток с периодической подпиткой" или "культивирование клеток с подпиткой" относится к периодическому культивированию, где животные клетки и среду для культивирования изначально подают в сосуд для культивирования и дополнительные питательные вещества для культивирования подают медленно, непрерывно или пошагово, к культуре во время культивирования, с периодическим сбором клеток и/или продукта или без такового, до завершения культивирования. Культивирование с периодической подпиткой включает в себя "полунепрерывное культивирование с периодической подпиткой", где периодически всю культуру (которая может включать в себя клетки и среду) удаляют и замещают свежей средой. Культивирование с периодической подпиткой отличается от простого "периодического культивирования", где все компоненты для культивирования клеток (в том числе животные клетки и все питательные вещества для культивирования) подают в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования в периодической культуре. Культивирование с периодической подпиткой может дополнительно отличаться от перфузионного культивирования в том смысле, что супернатант не удаляют из сосуда для культивирования во время процесса, в то время как при перфузионном культивировании клетки задерживаются в культуре, например, с помощью фильтрации, и среду для культивирования непрерывно или периодически вводят и удаляют из сосуда для культивирования. В то же время предусмотрено удаление образцов в целях проверки во время культивирования клеток с периодической подпиткой. Процесс периодической подпитки продолжается до тех пор, пока не определено то, что достигнут максимальный рабочий объем и/или образование белка.

Фраза "непрерывное культивирование клеток" при использовании в настоящем документе относится к методике, используемой для непрерывного выращивания клеток, обычно в определенной фазе роста. Например, если требуется непрерывное поступление клеток или требуется образование определенного представляющего интерес полипептида или белка, культура клеток может нуждаться в поддержании определенной фазы роста. Таким образом, условия должны постоянно контролироваться и корректироваться соответствующим образом с целью поддержания клеток в этой определенной фазе.

Среды

Настоящее изобретение предусматривает среду для культивирования клеток, которая является бессывороточной и содержит от приблизительно 0,1 до 10 mM таурина. Термин "бессывороточная" применяется к среде для культивирования клеток, которая не содержит животных сывороток, таких как эмбриональная бычья сыворотка. Бессывороточная среда может содержать <16 г/л гидролизатов, таких как соевый гидролизат. Настоящее изобретение также предусматривает химически определяемую среду, которая является не только бессывороточной, но также и не содержит гидролизата. Термин "не содержащий гидролизата" применяется в отношении среды для культивирования клеток, которые не содержат гидролизатов экзогенного белка, таких как гидролизаты животного или растительного белка, такие как, например, пептоны, триптоны и т.п. Термин "основная среда" представляет собой исходную среду (представленную в системе посевных ферментеров и/или в 0-й день образования культуры клеток), в которой размножаются клетки, и содержит все необходимые питательные вещества, которые включают в себя основную смесь аминокислот. Различные прописи (например, составы) для основных сред могут быть изготовлены или приобретены в коммерчески доступных партиях. Аналогично "основная среда с подпиткой" содержит смеси из дополнительных питательных веществ, которые обычно расходуются во время культивирования с образованием продукта и используются в стратегиях подпитки (для так называемого культивирования с "периодической подпиткой"). Множество основных сред с подпиткой являются коммерчески доступными. Термин "подпитка" включает предусмотренные графиком добавки или добавки к среде через равные интервалы, например, в соответствии с протоколом, в том числе систему непрерывного культивирования с подпиткой, как в хеостате (см. C. Altamirano et al., *Biotechnol Prog.* 2001 Nov-Dec; 17(6):1032-41), или в соответствии со способом с периодической подпиткой (Y.M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* 2010 Sep-Oct; 26(5):1400-10). Например, культуру можно подпитывать один раз в день, через день, через три дня, или можно подпитывать, когда концентрация определенного компонента среды, который подлежит контролю, опускается за пределы желаемого диапазона.

Удаление сыворотки или уменьшение или удаление гидролизатов из среды для культивирования клеток, при одновременном снижении вариабельности от партии к партии и улучшении стадий последующей обработки, к сожалению, снижает рост, выживание клеток и экспрессию белка. Таким образом, химически определяемая бессывороточная и содержащая незначительное количество или не содержащая гидролизатов среда, нуждается в дополнительных компонентах для улучшения клеточного роста и образования белка.

В связи с этим среда для культивирования клеток по настоящему изобретению содержит основную среду, содержащую все необходимые питательные вещества для культивирования жизнеспособных клеток. Таурин можно добавлять к основной среде в составе на основе культуры для посева в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше. Кроме того, таурин можно добавлять к основной среде в

составе на основе культуры-продуцента, которую затем можно периодически подпитывать (как в так называемых культурах с "периодической подпиткой") дополнительными компонентами или без применения таковых, такими как полиамины, или повышенными концентрациями компонентов, например, аминокислот, солей, сахаров, витаминов, гормонов, факторов роста, буферов, антибиотиков, липидов, следовых элементов и т.п., в зависимости от потребностей клеток, подлежащих культивированию, или желаемых параметров культивирования клеток.

Настоящее изобретение предусматривает, что среда для культивирования клеток с добавлением таурина может истощаться во время культивирования с образованием белка, если не предусмотрено дополнительное добавление аминокислот, или среда для культивирования с добавлением таурина может быть "неистощаемой", если предусмотрено добавление аминокислот взамен израсходованным аминокислотам (как описано ниже). Авторы настоящего изобретения заметили, что культуры, которые во время фазы образования продукта дополняют таурином, характеризуются повышением образования рекомбинантного белка при различных условиях культивирования, как описано выше.

Настоящее изобретение предусматривает среду с добавлением таурина, которая содержит таурин в концентрации (выраженной в миллимолях на литр), составляющей по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мМ.

В соответствии с одним вариантом осуществления среда дополнительно содержит 100 ± 15 мкМ орнитина, или 300 ± 45 мкМ орнитина, или 600 ± 90 мкМ орнитина, или даже 900 ± 135 мкМ орнитина. В соответствии с другим вариантом осуществления среда содержит по меньшей мере приблизительно 5 ± 1 мг/л орнитина-HCl, или по меньшей мере приблизительно 10 ± 2 мг/л орнитина-HCl, или по меньшей мере $15 \pm 2,25$ мг/л орнитина-HCl, или по меньшей мере приблизительно $50 \pm 7,5$ мг/л орнитина-HCl, или по меньшей мере приблизительно 100 ± 15 мг/л орнитина-HCl, или по меньшей мере приблизительно $150 \pm 22,5$ мг/л орнитина-HCl.

Путресцин можно необязательно добавлять к дополняемой среде. Путресцин был включен в очень низких концентрациях в качестве компонента в некоторых составах на основе среды для культивирования клеток; см., например WO 2005/028626, в котором описано включение 0,02-0,08 мг/л путресцина; патент США № 5426699 (0,08 мг/л); патент США № RE30985 (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 (~100 мкМ - ~1000 мкМ); заявка на выдачу патента 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 соответствии с некоторыми вариантами осуществления среду дополнительно дополняют комбинацией орнитина и путресцина, где путресцин может находиться в концентрации от по меньшей мере приблизительно 150 до 720 мкМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среду дополнительно дополняют путресцином в концентрации от приблизительно 170 до 230 мкМ. В соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит 200 ± 30 мкМ путресцина в дополнение к $>90 \pm 15$ мкМ орнитина. В соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит $<30 \pm 4,5$ мг/л путресцина-2HCl в дополнение к $<15 \pm 2,25$ мг/л орнитина. В соответствии с другим вариантом осуществления среда содержит $>30 \pm 4,5$ мг/л путресцина-2HCl в дополнение к $>15 \pm 2,25$ мг/л орнитина-HCl (см. международную публикацию № WO 2014/144198 A1, опубликованную 18 сентября 2014 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В соответствии с еще одними вариантами осуществления орнитин присутствует в среде в концентрации, варьирующей от $0,09 \pm 0,014$ мМ до $0,9 \pm 0,14$ мМ, такой как $0,09 \pm 0,014$ мМ, $0,3 \pm 0,05$ мМ, $0,6 \pm 0,09$ мМ или $0,9 \pm 0,14$ мМ орнитина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среда также содержит по меньшей мере $0,20 \pm 0,03$ мМ путресцина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительный путресцин присутствует в концентрации, варьирующей от $0,20 \pm 0,03$ мМ до $0,714 \pm 0,11$ мМ, такой как $0,20 \pm 0,03$ мМ, $0,35 \pm 0,06$ или $0,714 \pm 0,11$ мМ путресцина.

Различные другие добавки могут быть добавлены в среду для культивирования, и определение дополнительных подходящих условий находится в пределах компетентности специалиста в данной области. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среду дополняют смесью аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина, лизина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, валина, аргинина, гистидина, аспарагина, глутамина, аланина, изолейцина, лейцина, метионина, тирозина и триптофана, для того, чтобы она была неистощаемой, или в случае, когда необходимы дополнительные питательные вещества.

В соответствии с одним вариантом осуществления среду дополнительно дополняют от приблизительно 170 до 175 мкМ нуклеозидов. В соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит пуриновые производные в суммарной концентрации, составляющей 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 соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит приблизительно от 100 до 110 мкМ пуриновых производных. Пуриновые производные включают в себя ги-

поксантин и нуклеозиды аденозин и гуанозин. В соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит пиримидиновые производные в суммарной концентрации, составляющей приблизительно 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 соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит приблизительно от 65 до 75 мкМ пиримидиновых производных. Пиримидиновые производные включают в себя нуклеозиды тимин, уридин и цитидин. В соответствии с одним конкретным вариантом осуществления среда содержит аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

В дополнение к включению любой из вышеуказанных добавок, в соответствии с одним вариантом осуществления среду дополнительно дополняют микромолярными количествами жирных кислот (или производных жирных кислот) и токоферола. В соответствии с одним вариантом осуществления жирные кислоты включают в себя любую одну или несколько из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, тироновой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, декановой кислоты, додекановой кислоты, гексановой кислоты, лигноцериновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты. В соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит токоферол, линолевую кислоту и тироновую кислоту.

В соответствии с одним вариантом осуществления среду также можно дополнительно дополнять смесью витаминов, которая включает в себя другие питательные вещества и незаменимые питательные вещества в суммарной концентрации, составляющей от по меньшей мере приблизительно 700 мкМ до по меньшей мере приблизительно 2 мМ. В соответствии с одним вариантом осуществления смесь витаминов содержит одно или несколько из D-биотина, холина хлорида, фолиевой кислоты, мио-инозитола, ниацинамида, пиридоксина HCl, D-пантотеновой кислоты (hemiCa), рибофлавина, тиамина HCl, витамина B12 и т.п. В соответствии с одним вариантом осуществления смесь витаминов включает в себя все из D-биотина, холина хлорида, фолиевой кислоты, мио-инозитола, ниацинамида, пиридоксина HCl, D-пантотеновой кислоты (hemiCa), рибофлавина, тиамина HCl и витамина B12.

Различные варианты осуществления среды по настоящему изобретению включают в себя любую из комбинаций вышеописанных вариантов осуществления, в том числе химически определяемую, не содержащую гидролизата бессывороточную среду, содержащую таурин в указанных количествах, совместно, в числе прочего, с (a) аминокислотами; (b) необязательно нуклеозидами; (c) солями двухвалентных катионов; (d) жирными кислотами и токоферолом; и (e) витаминами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления все небольшие количества гидролизатов могут быть добавлены к среде с добавлением таурина.

Авторы настоящего изобретения предполагают, что при практическом осуществлении настоящего изобретения можно использовать любую одну или несколько из множества основных сред или их комбинаций, к которым добавляют таурин. Основные среды хорошо известны в данной области и включают в себя, в числе прочего, среду MEME (минимальную питательную среду) Игла (Eagle, Science, 1955, 112(3168):501-504), среду F-12 Хэма (Ham, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1965, 53:288-293), среду F-12 K, среду Дульбекко, среду Игла в модификации Дульбекко (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1952 August; 38(8):747-752), среду DMEM/F12 Хэма в соотношении 1:1, среду T8 Тройэлла, среду A2 Холмса и Вольфа (Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 10:389-401), среду Веймута (Davidson and Waymouth, Biochem. J., 1945, 39(2): 188-199), среду E Вильямса (William's et al., Exp. Cell Res., 1971, 69: 105 et seq.), среду RPMI1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc, 1967, 199:519-524), среду MCDB 104/110 (Bettger et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1981, 78(9):5588-5592), среду HL-1 Ventrex, среду с альбумином и глобулином (Orr et al., Appl. Microbiol., 1973, 25(1):49-54), среду RPMI-1640, среду RPMI-1641, среду Дульбекко в модификации Искова, среду 5 A Маккоя, среду L-15 Лейбовица и бессывороточные среды, такие как EX-CELL™ 300 Series (JRH Biosciences, Ленекса, Канзас), среду с протамином, цинком и инсулином (Weiss et al., 1974, US 4072565), среду с биотином и фолатом (Cartaya, 1978, US Re30985), среду с трансферрином и жирными кислотами (Baker, 1982, US 4560655), среду с трансферрином и EGF (Hasegawa, 1982, US 4615977; Chessebeuf, 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 соответствии с определенным вариантом осуществления среда является химически определяемой и содержит в дополнение к таурину смеси аминокислот, как определено в настоящем документе, CaCl₂·2H₂O; буфер HEPES, KCl; MgSO₄; NaCl; Na₂HPO₄ или другие фосфатные соли; пируват; D-биотин; холина хлорид; фолиевую кислоту; мио-инозитол; ниацинамид; пиридоксина HCl; D-пантотеновую кислоту; рибофлавин; тиамина HCl; витамин B12; p-аминобензойную кислоту; этаноламин HCl; полоксамер 188; DL-α-токоферола фосфат; линолевую кислоту; Na₂SeO₃; тиоктовую кислоту и глюкозу; и необязательно аденозин; гуанозин; цитидин; уридин; тимидин; и гипоксантин 2Na.

В соответствии с одним вариантом осуществления исходная осмолярность среды по настоящему изобретению составляет 200-500, 250-400, 275-350 или приблизительно 200 мОсм. Во время роста клеток

в среде по настоящему изобретению, в частности, после любых подпиток в соответствии с протоколом периодических подпиток, осмолярность культуры может повышаться до приблизительно 350, 400, 450, 500 или до приблизительно 550 мОсм.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, где осмолярность среды составляет менее чем приблизительно 300, осмолярность доводят до приблизительно 300 с помощью добавления одной или нескольких солей выше определяемого количества. В соответствии с одним вариантом осуществления осмолярность повышают до желаемого уровня с помощью добавления одного или нескольких осмолитов, выбранных из хлорида натрия, хлорида калия, магниевой соли, кальциевой соли, соли аминокислоты, 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 комбинаций. В соответствии с одним вариантом осуществления осмолит добавляют в дополнение к его концентрации в компоненте, который уже присутствует в определяемой среде (например, сахар добавляют в дополнение к его концентрации, определяемой для сахарного компонента).

Все без исключения варианты осуществления среды, описанные выше, а также любая другая бесывороточная среда, содержащая по меньшей мере приблизительно 0,1 мМ таурин, или среда, называемая средой с добавлением таурина. В противоположность этому, среда, не содержащая таурин, или среда, содержащая менее 0,1 мМ таурина, далее в настоящем документе называется средой без добавления таурина или без добавки таурина.

Культивирование с периодической подпиткой

Стратегии подпиток для культивирования клеток направлены на обеспечение оптимального роста и размножения клеток за пределами многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования клеток млекопитающих известны из уровня техники. 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. Биореакторы с псевдооживленным слоем, полволоконные биореакторы, роллерные флаконы, встряхиваемые колбы или биореакторы с механическим перемешиванием, с микроносителями или без таковых, а также управляемые в периодическом режиме, режиме с периодической подпиткой, непрерывном, полунепрерывном или перфузионном режиме, доступны для культивирования клеток млекопитающих. Среду для культивирования клеток или концентрированную среду с подпиткой можно добавлять к культуре непрерывно или через интервалы во время культивирования. Например, культуру можно подпитывать один раз в день, через день, через три дня, или можно подпитывать, когда концентрация определенного компонента среды, который подлежит контролю, опускается за пределы желаемого диапазона.

В дополнение к включению таурина, в соответствии с одним вариантом осуществления среду можно дополнительно дополнить аминокислотами в суммарной (общей) концентрации, составляющей по меньшей мере 20 мМ. В соответствии с одним вариантом осуществления концентрация исходных аминокислот, включенных в первоначальную среду для культивирования клеток, не предусмотрена в такой суммарной (общей) концентрации добавляемых аминокислот. В соответствии с одним вариантом осуществления среды для культивирования клеток или в соответствии со способом культивирования клеток или способом получения представляющего интерес белка среду можно дополнять в количестве, составляющем более чем приблизительно 20 мМ, более чем приблизительно 25 мМ, более чем приблизительно 30 мМ, более чем приблизительно 40 мМ, более чем приблизительно 50 мМ, более чем приблизительно 60 мМ, более чем приблизительно 70 мМ, более чем приблизительно 100 мМ, более чем приблизительно 200 мМ, более чем приблизительно 300 мМ, более чем приблизительно 400 мМ или более чем приблизительно 500 мМ, см. также таблицу 1 в настоящем документе. В соответствии с одним вариантом осуществления количество аминокислот, добавляемых к среде, составляет приблизительно 30±10 мМ или более.

Режимы добавляемых подпиток могут быть оптимизированы специалистами в данной области для поддержания клеточного роста, сведения к минимуму клеточного стресса или обеспечения "неистощаемой среды" во время фазы образования продукта.

Термин "неистощаемая среда" включает в себя среду для культивирования клеток, которую определяли таким образом, чтобы она имела питательные вещества, в частности, аминокислоты, необходимые для образования представляющего интерес рекомбинантного белка. Аминокислотные подпитки обычно дополняют аминокислоты, необходимые в качестве структурных единиц для образования рекомбинантного белка в культуре клеток. В то же время некоторые аминокислоты могут расходоваться быстрее, чем другие, в зависимости от потребностей конкретного белка, образуемого клетками в культуре. В неистощаемой среде режим подпитки был определен таким образом, что необходимые аминокислоты восполняются по мере того, как они расходуются. Таким образом, уровни расхода и последующего оптимального потребления (пг/клетка-день) можно определять с помощью следующих стадий: культивирования эукариотической (эукариотических) клетки (клеток), экспрессирующей (экспрессирующих) представляющий интерес белок в среде для культивирования клеток; измерения концентрации каждой аминокислоты в среде для культивирования во временные точки с целью установления уровня расхода; выявления временной точки расхода, при которой концентрация аминокислоты опускается ниже уровня расхода; рас-

чета уровней потребления для каждой аминокислоты; и определения оптимального уровня потребления, как уровня потребления во временной точке непосредственно перед временной точкой расхода. Затем культуру клеток дополняют соответствующей концентрацией определенной аминокислоты с целью поддержания таких оптимальных уровней потребления, как определено, для того, чтобы среда для культивирования была неистощаемой.

Подразумевается, что настоящее изобретение предусматривает среду для культивирования клеток с добавлением таурина, с помощью которой повышается титр в истощаемых, а также неистощаемых культурах.

Настоящее изобретение предусматривает культуру клеток, содержащую линию клеток, экспрессирующую представляющий интерес белок в среде с добавлением таурина, как описано выше. Примеры клеточных линий, которые широко используют для получения биотерапевтических средств, включают в себя, 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 MDOК, клетки BHK, клетки BHK-21, клетки CHO, клетки CHO-K1, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки 3T3, клетки 293, клетки Per.C6 и клетки куриного эмбриона. В соответствии с одним вариантом осуществления линия клеток представляет собой линию клеток CHO или одну или более из нескольких определенных вариантов клеток CHO, оптимизированных для получения белка в большом объеме, например, CHO-K1.

В соответствии с одним вариантом осуществления культура клеток с добавлением таурина содержит инсулин, который можно добавлять в качестве целевого компонента к среде или можно включать в состав на основе среды. В соответствии с одним вариантом осуществления линия клеток содержит клетки, способные образовывать биотерапевтический белок.

В соответствии с одним вариантом осуществления среду дополняют через интервалы во время культивирования клеток в соответствии с процессом периодической подпитки. Культивирование с периодической подпиткой является общеизвестным из уровня техники и используется для оптимизации получения белка (см. Y.M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* 2010 Sep-Oct;26(5):1400-10).

Фаза клеточного роста или культивирование клеток (например, первое культивирование клеток), где не предусмотрен обмен среды, обычно сопровождается отличающимся вторым культивированием, известным как фаза образования полипептида. Способы с периодической подпиткой обычно применяют во время фазы образования продукта.

Настоящее изобретение предусматривает среду для культивирования клеток, содержащую от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ таурина в начале культивирования клеток с образованием продукта (0-й день). Альтернативно среду для культивирования клеток, содержащую от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ таурина, можно дополнять в 1-й день, 2-й день, 3-й день, 4-й день, 5-й день, 6-й день, 7-й день, 8-й день, 9-й день и/или 10-й день культивирования клеток с образованием продукта. Среда для культивирования клеток, добавляемая к культуре-продуценту в течение нескольких дней, содержит суммарное количество таурина от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ. Среда для культивирования клеток, содержащую общее количество таурина от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, можно добавлять любым последовательным образом.

Таурин можно также добавлять в основную среду в фазе разращивания системы посевных ферментеров.

Дополнительную подпитку можно выполнять для включения дополнительных питательных веществ, таких как витамины, аминокислоты и другие питательные вещества, описанные выше в настоящем документе, через интервалы с частотой каждый день или каждые 2-3 дня во время культивирования с образованием продукта. Дополнительную подпитку можно выполнять (добавляют дополнительные среды, содержащие питательные вещества) по меньшей мере 2 раза или по меньшей мере 8 раз во время всего культивирования с образованием продукта в течение 2-недельного или более длительного культивирования. В соответствии с другим вариантом осуществления дополнительную подпитку выполняют в каждый день в течение культивирования. Также предусмотрены альтернативные графики подпитки культур.

Также можно выполнять дополнительное добавление аминокислот для получения неистощаемой среды, где расходуемые аминокислоты определяют в соответствии со способами, известными из уровня техники и описанными в настоящем документе. При использовании этого режима дополнительные аминокислоты дополняют или добавляют через интервалы, предпочтительно с частотой каждый день или каждые 2-3 дня в течение культивирования с образованием продукта, в зависимости от определения расхода аминокислот. В соответствии с одним вариантом осуществления смесь дополнительных аминокислот для поддержания неистощаемой среды для культивирования клеток добавляют в или приблизительно в 1-й день, в или приблизительно в 2-й день, в или приблизительно в 3-й день, в или приблизительно в 4-й день, в или приблизительно в 5-й день, в или приблизительно в 6-й день, в или приблизительно в 7-й день, в или приблизительно в 8-й день, в или приблизительно в 9-й день, в или приблизительно в 10-й день, в или приблизительно в 11-й день, в или приблизительно в 12-й день, в или приблизительно в 13-й день и в или приблизительно в 14-й день, в течение 2-недельного или более длительного культивирования.

ния. Также предусмотрены альтернативные графики подпитки культур.

Животные клетки, такие как клетки СНО, можно культивировать в культурах малого объема, таких как в контейнерах на 125 мл, имеющих приблизительно 25 мл среды, контейнерах на 250 мл, имеющих от приблизительно 50 до 100 мл среды, контейнерах на 500 мл, имеющих от приблизительно 100 до 200 мл среды. Альтернативно культуры могут характеризоваться большим объемом, таким как, например, контейнеры на 1000 мл, имеющие от приблизительно 300 до 1000 мл среды, контейнеры на 3000 мл, имеющие от приблизительно 500 до 3000 мл среды, контейнеры на 8000 мл, имеющие от приблизительно 2000 до 8000 мл среды, и контейнеры на 15000 мл, имеющие от приблизительно 4000 до 15000 мл среды. Культуры для производства могут содержать от 10000 л среды и более. Культуры клеток большого объема, например, для клинического производства терапевтических средств на основе белка, обычно поддерживают в течение нескольких дней или даже недель, при этом клетки образуют желаемый(желаемые) белок(белки). В это время культуру можно дополнять концентрированной средой с подпиткой, содержащей компоненты, такие как питательные вещества и аминокислоты, которые расходуются во время культивирования. Концентрированная среда с подпиткой может быть основана на составе на основе любой среды для культивирования клеток. Такая концентрированная среда с подпиткой может содержать большинство из компонентов среды для культивирования клеток, например приблизительно 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 12×, 14×, 16×, 20×, 30×, 50×, 100×, 200×, 400×, 600×, 800× или даже приблизительно 1000× от их нормального полезного количества. Концентрированные среды с подпиткой обычно используют в способах культивирования с периодической подпиткой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среду для культивирования, содержащую таурин, дополнительно дополняют "целевыми добавками", также известными как добавки, целевые компоненты или целевые химические вещества, во время роста клеток или образования белка. Целевые добавки включают одно или несколько из факторов роста или других белков, буфера, источника энергии, соли, аминокислоты, металла и хелатора. Другие белки включают в себя трансферрин и альбумин. Факторы роста, которые включают в себя цитокины и хемокины, являются общеизвестными в данной области и, как известно, стимулируют клеточный рост или в некоторых случаях клеточную дифференцировку. Фактор роста обычно представляет собой белок (например, инсулин), малый пептид или стероидный гормон, такой как эстроген, DHEA, тестостерон и т.п. В некоторых случаях фактор роста может представлять собой не встречающееся в природе химическое соединение, которое способствует клеточной пролиферации или образованию белка, такое как тетрагидрофолат (THF), метотрексат и т.п. Неограничивающие примеры белковых и пептидных факторов роста включают в себя ангиопоэтины, костные морфогенетические белки (BMP), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста и дифференцировки 9 (GDF9), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста гепатомы (HDGF), инсулин, инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор, стимулирующий миграцию, миостатин (GDF-8), фактор роста нервов (NGF) и другие нейротрофины, фактор роста тромбоцитов (PDGF), тромбопоэтин (TPO), трансформирующий фактор роста альфа (TGF-α), трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), фактор некроза опухолей альфа (TNF-α), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), агонисты сигнального пути Wnt, плацентарный фактор роста (PIGF), эмбриональный бычий соматотропин (FBS), интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 и т.п. В соответствии с одним вариантом осуществления среду для культивирования клеток можно дополнять целевым дополнительным фактором роста инсулином. В соответствии с одним вариантом осуществления концентрация инсулина в среде, например, количество инсулина в среде для культивирования клеток после добавления, может составлять от приблизительно 0,1 до 10 мкМ.

Буферы являются общеизвестными в данной области. Настоящее изобретение не ограничено каким-либо определенным буфером или буферами, и специалист в данной области может выбрать соответствующий буфер или буферную систему для применения с определенной линией клеток, образующей определенный белок. В соответствии с одним вариантом осуществления целевым дополнительным буфером является NaHCO_3 . В соответствии с другим вариантом осуществления буфером является HEPES. В соответствии с другими вариантами осуществления целевой дополнительный буфер содержит как NaHCO_3 , так и HEPES.

Источники энергии для применения в качестве целевой добавки в культуре клеток также являются общеизвестными в данной области. Без ограничения в соответствии с одним вариантом осуществления целевой дополнительный источник энергии представляет собой глюкозу. Учитывая определенные и конкретные требования определенной линии клеток и образующегося белка, в соответствии с одним вариантом осуществления глюкозу можно добавлять в концентрации от приблизительно 1 до 20 мМ в среде. В некоторых случаях глюкозу можно добавлять при высоких уровнях, составляющих 20 г/л или более.

Аналогичным образом хелаторы являются общеизвестными в области культивирования клеток и получения белка. Дигидрат и цитрат тетранатрия EDTA представляют собой два распространенных хелатора, используемые в данной области, в то же время и другие хелаторы можно использовать при практи-

ческом осуществлении настоящего изобретения. В соответствии с одним вариантом осуществления целевым дополнительным хелатором является дигидрат тетранатрия EDTA. В соответствии с одним вариантом осуществления целевым дополнительным хелатором является цитрат, такой как $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.

В соответствии с одним вариантом осуществления среду для культивирования клеток можно дополнительно дополнять одной или несколькими целевыми дополнительными аминокислотами в качестве источника энергии, например, глутамином. В соответствии с одним вариантом осуществления среду для культивирования клеток дополняют целевым дополнительным глутамином в конечной концентрации, составляющей от приблизительно 1 до 13 мМ.

Другие целевые добавки включают в себя одну или несколько из различных солей металлов, таких как соли железа, никеля, цинка и меди. В соответствии с одним вариантом осуществления среду для культивирования клеток дополняют любым одним или несколькими из сульфата меди, сульфата цинка, хлорида железа и сульфата никеля.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления титр белка, образующийся в результате культивирования клеток в среде с добавлением таурина, составляет по меньшей мере на 4%, 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% или по меньшей мере на 29% больше, чем титр (выход) белка из клеток, культивируемых в среде без добавления таурина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления титр белка, образующийся из клеток в среде с добавлением таурина, составляет по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4% или по меньшей мере на 5% больше, чем титр (выход) белка из аналогичных или таких же клеток, культивируемых в среде без добавления таурина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления накопление аммиака в культуре клеток снижается более чем на 4%, более чем на 5%, более чем на 6%, более чем на 7%, более чем на 8%, более чем на 9%, более чем на 10%, более чем на 15% или более чем на 20% в среде с добавлением таурина по сравнению с культурой клеток в среде без добавления таурина.

Образование белка

Помимо сред с добавлением таурина и способов культивирования клеток в средах с добавлением таурина, настоящее изобретение предусматривает усовершенствованные способы образования белка, такого как терапевтически эффективное антитело или другая биофармацевтическая лекарственная субстанция, в клетке, культивируемой в средах с добавлением таурина. Настоящее изобретение предусматривает способ получения терапевтического белка с высоким выходом, предусматривающий культивирование линии рекомбинантных клеток в среде, содержащей таурин, где линия клеток содержит стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления титр (выход) белка, образуемый клетками млекопитающих, культивируемых в среде, содержащей таурин (среде с добавлением таурина), составляет по меньшей мере на 100 мг/л, по меньшей мере на 0,5 г/л, по меньшей мере на 1 г/л, по меньшей мере на 1,2 г/л, по меньшей мере на 1,4 г/л, по меньшей мере на 1,6 г/л, по меньшей мере на 1,8 г/л, по меньшей мере на 2 г/л, по меньшей мере на 2,5 г/л больше, чем титр белка, образуемый такой же клеткой млекопитающих, культивируемой в среде без добавления таурина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выход или титр белковой продукции, который можно выражать в граммах белкового продукта на литр среды для культивирования, из клеток, культивируемых в среде с добавлением таурина, 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, по меньшей мере 15 г/л или по меньшей мере 20 г/л.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления титр белка, образующийся из клеток в среде с добавлением таурина, составляет по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, 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% или по меньшей мере на 29% больше, чем титр (выход) белка из аналогичных или таких же клеток, культивируемых в среде без добавления таурина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белковый продукт (представляющий интерес белок) представляет собой антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, Fab-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело выбирают из группы, состоящей из антитела к белку программируемой клеточной смерти 1 (например, антитела к PD1, как описано в публикации заявки на выдачу патента США № US 2015/0203579A1), антитела к лиганду белка программируемой клеточной смерти 1 (например, антитела к PD-L1, как описано в публикации заявки на выдачу патента США № US 2015/0203580A1), антитела к Dll4, антитела к ангиопоэтину 2 (например, антитела к ANG2, как описано в патенте США № 9402898), антитела к ангиопоэтинподобному белку 3 (например, антитела к AngPt13, как описано в патенте США №9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитела к PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела к Erb3, антитела к рецептору пролактина (например, антитела к PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела к комплементу 5 (например, антитела к C5, как описано в патенте США № US 2015/0313194 A1), антитела к TNF, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитела к EGFR, как описано в патенте США №9132192, или антитела к EGFRvIII, как описано в патенте США № US 2015/0259423 A1), антитела к пропротеиновой конвертазе субтилизин/кексин (например, антитела к PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или патенте США № US 2014/0044730 A1), антитела к фактору роста и дифференцировки 8 (например, антитела к GDF8, также известного как антитело к мио-статину, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела к рецептору глюкагона (например, антитела к GCGR, как описано в патентах США №№US 2015/0337045 A1 или US 2016/0075778 A1), антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитела к IL4R, описанного в патенте США №US 2014/0271681 A1 или патентах США №№8735095 или 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, антитела к IL6R, как описано в патентах США №№7582298, 8043617 или 9173880), антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к интерлейкину 33 (например, антитела к IL33, как описано в патентах США №№US 2014/0271658 A1 или US 2014/0271642 A1), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, антитела к RSV, как описано в патенте США № US 2014/0271653 A1), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, антитела к CD3, как описано в патентах США №№ US 2014/0088295 A1 и US 20150266966 A1, и в заявке США № 62/222605), антитела к кластеру дифференцировки 20 (например, антителу к CD20, как описано в патентах США №№ US 2014/0088295 A1 и US 20150266966 A1, и в патенте США № 7879984), антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, антитела к CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела к Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, антитела к MERS, как описано в патенте США № US2015/0337029A1), антитела к вирусу Эбола (например, как описано в патенте США № US2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к гену активации лимфоцитов 3 (например, антитела к LAG3, или антитела к CD223), антитела к фактору роста нервов (например, антитела к NGF, как описано в патенте США № US 2016/0017029 и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела к активину А. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биспецифическое антитело выбирают из группы, состоящей из биспецифического антитела к CD3/CD20 (как описано в патентах США №№ US 2014/0088295 A1 и US 20150266966 A1), биспецифического антитела к CD3/муцину 16 (например, биспецифического антитела к CD3/Muc16) и биспецифического антитела к CD3/простатическому специфическому мембранному антигену (например, биспецифического антитела к CD3/PSMA). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представляющий интерес белок выбирают из группы, состоящей из алирокумаба, сарилумаба, фасинумаба, несвакумаба, дупилумаба, тревогрумаба, эвинакумаба и ринукумаба. Все публикации, упоминаемые по всему настоящему раскрытию, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, Fc-слитый белок). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или несколько доменов рецептора, связанного с Fc-фрагментом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc-фрагмент содержит шарнирный участок, сопровождаемый CH2- и CH3-доменом IgG. В соответствии с некоторыми вариан-

тами осуществления рецепторный Fc-слитый белок содержит две или более различающиеся цепи рецептора, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, белок-ловушка для IL-1 (например, рилонцепт, который содержит связывающий лиганд RAcP участок IL-1, слитый с внеклеточным участком R1 IL-1, слитым с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), или белок-ловушка для VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig Flt1 рецептора VEGF, слитого с доменом 3 Ig Flk1 рецептора VEGF, слитого с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В соответствии с другими вариантами осуществления Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или несколько из антигенсвязывающих доменов, таких как вариабельный фрагмент тяжелой цепи и вариабельный фрагмент легкой цепи антитела, связанного с Fc-фрагментом.

Настоящее изобретение не ограничено каким-либо определенным типом клетки для образования белка. Примеры типов клеток, подходящих для образования белка, включают клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки птиц, бактериальные клетки и клетки дрожжей. Клетки могут представлять собой стволовые клетки или рекомбинантные клетки, трансформированные вектором для рекомбинантной экспрессии гена, или клетки, трансфицированные вирусом, для получения продуктов вируса. Клетки могут содержать рекомбинантную гетерологичную полинуклеотидную конструкцию, которая кодирует представляющий интерес белок. Такая конструкция может представлять собой эписому и она может представлять собой элемент, который физически интегрирован в геном клетки. Клетки также могут образовывать представляющий интерес белок, при этом этот белок не кодируется на гетерологичной полипептидной конструкции. Другими словами, в природе клетка может кодировать представляющий интерес белок, например, В-клетка, образующая антитело. Клетки могут также быть первичными клетками, такими как клетки куриного эмбриона, или линиями первичных клеток. Примеры подходящих клеток включают в себя 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, клетки куриного эмбриона, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки BHK, клетки 293, клетки RK, клетки Per.C6 и клетки CHO. В соответствии с различными вариантами осуществления линия клеток представляет собой производное клетки CHO, такое как мутантные линии CHO-K1, CHO DUX B-11, CHO DG-44, Veggie-CHO, GS-CHO, S-CHO или CHO 1ес.

В соответствии с одним вариантом осуществления клетка, которая представляет собой клетку CHO, экспрессирует белок эктопически. В соответствии с одним вариантом осуществления белок содержит участок тяжелой цепи иммуноглобулина, такой как CH1-, CH2- или CH3-участок. В соответствии с одним вариантом осуществления белок содержит CH2- и CH3-участок иммуноглобулина человека или грызуна. В соответствии с одним вариантом осуществления белок содержит CH1-, CH2- и CH3-участок иммуноглобулина человека или грызуна. В соответствии с одним вариантом осуществления белок содержит шарнирный участок и CH1-, CH2- и CH3-участок. В соответствии с одним вариантом осуществления белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина. В соответствии с одним вариантом осуществления белок содержит вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина. В соответствии с одним вариантом осуществления белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина. В соответствии с одним вариантом 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 образования продукта можно осуществлять в любом объеме культивирования, от смешанных колб или мешков для биореактора Wave до однолитровых биореакторов и промышленных биореакторов большого объема. Аналогично фазу разрачивания системы посевных ферментеров можно выполнять в любом объеме культивирования, от смешанных колб или мешков для биореактора Wave до однолитровых или более крупных биореакторов. Процесс в большом объеме можно осуществлять в объеме от приблизительно 100 до 20000 л или более. Одно или несколько средств можно использовать для контроля образования белка, таких как температурный сдвиг или химическую индукцию. Фаза роста может происходить при более высокой температуре, чем фаза образования продукта. Например, фаза роста может происходить при первой температуре, составляющей от приблизительно 35 до 38°C, и фаза образования продукта может происходить при второй температуре, составляющей от приблизительно 29 до 37°C, необязательно от приблизительно 30 до 36°C или от приблизительно 30 до 34°C. Кроме этого, химические индукторы образования белка, такие как кофеин, бутират, тамоксифен, эстроген, тетрациклин, доксициклин и гексаметилен бис-ацетамид (НМВА), могут быть добавлены в дополнение к температурному сдвигу, перед или после такового. Если индукторы добавляют после температурного сдвига, то их можно добавлять через интервал от одного часа до пяти дней после температурного сдвига, например, через интервал от одного до двух дней после температурного сдвига. Культивирование клеток с образованием продукта можно проводить в виде системы непрерывного культивирования с подпиткой, как в хеомстате (см. С. Altamirano et al., 2001, выше), или в соответствии со способом периодической подпитки (Huang, 2010, выше).

Настоящее изобретение является полезным для повышения образования белка в результате спосо-

бов культивирования клеток. Линии клеток, используемые в настоящем изобретении, можно генетически сконструировать для экспрессии полипептида, представляющего коммерческий или научный интерес. Генетическое конструирование линии клеток включает в себя трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток рекомбинантной полинуклеотидной молекулой, или иным образом изменение (например, с помощью гомологичной рекомбинации и активации генов или слияния рекомбинантной клетки с нереконбинантной клеткой), с тем, чтобы вызывать экспрессию клеткой-хозяином желаемого рекомбинантного полипептида. Способы и векторы для генетического конструирования клеток или линий клеток с целью экспрессии представляющего интерес полипептида являются общеизвестными специалисту в данной области, например, различные методики приведены в *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, и ежеквартальные обновленные версии); 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. Большое разнообразие линий клеток, подходящих для роста в культуре, является доступным из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Виргиния) и от коммерческих поставщиков. Примеры линий клеток, широко используемых в промышленности, включают в себя линии клеток VERO, BHK, HeLa, CV1 (в том числе Cos), MDCK, 293, 3T3, линии клеток миеломы (например, NSO, NSI), клетки PC12, WI38 и клетки яичника китайского хомячка (CHO). Клетки CHO широко используются для получения сложных 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). Мутантные линии клеток с недостаточностью редуктазы (DHFR) (Urlaub et al. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220), DXBI 1 и DG-44 являются желательными линиями клеток-хозяев CHO, поскольку эффективная подлежащая селекции по DHFR и амплификации система экспрессии генов в этих клетках обеспечивает экспрессию рекомбинантного белка на высоком уровне (Kaufman R.J. (1990), *Meth. Enzymol.* 185:537-566). Кроме того, с этими клетками легко работать в качестве адгезивных или суспензионных культур и они характеризуются сравнительно высокой генетической стабильностью. Клетки CHO и белки, рекомбинантным образом экспрессируемые ими, были подробно описаны и были одобрены для применения в производстве для клинических исследований и коммерческом производстве регуляторными органами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линии клеток CHO представляют собой линии клеток, описанных в публикациях заявки на выдачу патента 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 в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, которые предусмотрены в качестве иллюстраций отдельных аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения. Функционально равноценные способы и компоненты находятся в пределах объема настоящего изобретения. Различные модификации настоящего изобретения, в дополнение к описанным в настоящем документе, очевидны специалистам в данной области исходя из вышеизложенного описания и сопровождающих чертежей. Такие модификации входят в объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1.

Повышенные титры антител в результате добавления таурина.

Пример 1A.

Высокопроизводительное культивирование во встряхиваемой колбе.

Встряхиваемые колбы на 250 мл засеивали культурой для посева линии клеток, образующих моноклональное антитело (Ab1), полученной из CHO-K1. Внесенные клетки выращивали при температуре 35,5°C в течение семнадцати дней и подпитывали глюкозой и другими дополнительными питательными веществами, по мере необходимости. Клетки выращивали в химически определяемой (не содержащей гидролизат и бессывороточной) основной среде.

Каждую колбу для культур либо не дополняли (колба 1a), либо дополняли 1 mM таурина в 0-й день (колба 1b).

Таблица 2. Средние титры антитела за 17 дней (г/л) и примерное повышение титров (%) относительно исходного уровня

Колба	Добавка к среде	Титр Ab1	
1a	Без добавления*	7,3 г/л	
1b	Таурин	7,9 г/л^	8%

*Контроль исходного уровня для % повышения титра; колба 1b по сравнению с титром в среде без добавления (колба 1a)

^Различие в конечном титре между культурой без добавления и с добавлением является статически значимым ($p < 0,05$)

Значения титров рассчитывали исходя из белка, собранного в 17-й день, и они являлись статистиче-

ски значимыми ($p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем. Культуры с добавлением таурина характеризовались в целом 8% повышением конечного титра белка по сравнению с культурами без добавления.

Пример 1В.

Настольные биореакторы.

В аналогичном примере, но при производстве большего объема, биореакторы на 2 л засеивали из культуры для посева линии клеток, образующих моноклональные антитела (Ab2, Ab3 или Ab4), полученной из СНО-К1. Засеянные культуры выращивали при температуре 35,5°C, заданном значении DO 40,4% и объеме барботажного воздуха 22 куб. см в течение 14 дней. Процессы в случае Ab2 и Ab3 характеризовались заданными значениями pH, составляющими $7,0 \pm 0,15$, в то время как процесс в случае Ab4 характеризовался заданным значением pH, составляющим $7,13 \pm 0,27$. Глюкозу, противовспенивающее средство и основную подпитку подавали в биореакторы по мере необходимости. Культуры выращивали в среде без добавления (биореактор 2а, 3а, 4а) или выращивали в среде с добавлением приблизительно 1 мМ таурина (Ab2 и Ab3) или в среде с добавлением приблизительно 3 мМ таурина (Ab4), добавляемого в 0-й день образования продукта (биореакторы 2b, 3b и 4b соответственно).

Выход (титр) антител составлял 6,4 г/л в случае клеток, образующих Ab2, в то время как клетки, выращиваемые с таурином, давали 8 г/л белка. 24% повышение титра по сравнению с клетками, выращиваемыми без добавления таурина, являлось статистически значимым ($p < 0,05$). Образующиеся конечные титры в случае культур, образующих Ab3, и культур, образующих Ab4, также были значимо выше ($p < 0,05$) через 14 дней (11 и 20% соответственно) по сравнению с культурами без добавления таурина. См. табл. 3.

Таблица 3. Средние титры антител за 14 дней (г/л) и примерное повышение титров (%) относительно исходного уровня

Добавка к среде	№ биореактора	Титр Ab2		№ биореактора	Титр Ab3		№ биореактора	Титр Ab4	
Без добавления*	2а	6,4 г/л		3а	6,6 г/л		4а	4,4 г/л	
Таурин	2b	8 г/л [^]	24%	3b	7,3 г/л [^]	11%	4b	5,3 г/л [^]	20%

*Среда без добавления представляет собой контроль исходного уровня для % повышения титра, где % повышения титра в биореакторах 2b, 3b или 4b % сравнивают с титром в среде без добавления (биореакторы 2а, 3а или 4а соответственно)

[^]Различия в конечном титре между культурами с добавлением и без добавления являются статистически значимыми ($p < 0,05$)

Динамику по отношению к титру белка откладывали на графике в случае культуры, образующей Ab3, и значимое увеличение титра белка в результате добавления таурина наблюдали в каждый день культивирования, начиная с 6-го дня.

Таблица 4. Повышение титра антител (г/л) в результате добавления таурина в характерные временные точки

Биореактор	Добавка к среде	Титр Ab3 в 6-й день		Титр Ab3 в 9-й день		Титр Ab3 в 14-й день	
3а	Без добавления*	1,7 г/л		4,1 г/л		6,6 г/л	
3b	Таурин	1,9 г/л	12%	5,3 г/л [^]	29%	7,3 г/л [^]	11%

*Примерное повышение (%) по сравнению со средой без добавления, собранной в тот же день

[^]Повышение титра при добавлении таурина является статистически значимым ($p < 0,05$) по сравнению с культурой без добавления

Значимое повышение титра могли наблюдать в культуре-продуcente уже на 6-й день (12% повышение по сравнению с той же культурой без добавления таурина). См. также чертеж. Максимальное различие в такой динамике наблюдали на 9-й день (значимое ($p < 0,05$) повышение на 29% в биореакторе 3b по сравнению с 3а), и значимое ($p < 0,05$) повышение титра на 11% наблюдали в последний день (14-й) культивирования.

Преимущества образования белка при добавлении таурина наблюдали в случае различных объемов (пример 1А и 1В) и различных линий клеток (пример 1В).

Пример 2.

Устойчивая продуктивность при изменении концентраций таурина при высокопроизводительном культивировании во встряхиваемой колбе.

Устойчивость титра белка исследовали при изменении количества таурина, добавляемого к культуре в 0-й день образования продукта. Встряхиваемые колбы на 250 мл засеивали культурой для посева линии клеток, образующих моноклональное антитело (Ab1), полученной из СНО-К1. Внесенные клетки выращивали при 35,5°C в течение четырнадцати дней и подпитывали глюкозой и другими дополнительными питательными веществами, по мере необходимости. Клетки выращивали в химически определяемой (не содержащей гидролизат и бессывороточной) основной среде.

Каждая культура не содержала таурин (без добавления) или содержала таурин в концентрациях 0,1 мМ, 0,3 мМ, 0,5 мМ, 0,7 мМ, 1 мМ, 3 мМ, 5 мМ, 7,5 мМ или 10 мМ.

Таблица 5. Средние титры антитела за 14 дней (г/л) для культур, дополняемых от 0,1 до 10 мМ таурина

Встряхиваемая колба	Добавка к среде	Титр Ab1	
5a	Без добавления*	6,5 г/л	
5b	0,1 мМ таурина#	6,7 г/л	3%
5c	0,3 мМ таурина^	6,8 г/л	5%
5d	0,5 мМ таурина^	6,9 г/л	6%
5e	0,7 мМ таурина^	7,0 г/л	8%
5f	1 мМ таурина^	7,0 г/л	8%
5g	5 мМ таурина^	7,1 г/л	9%
5h	7,5 мМ таурина^	7,1 г/л	9%
5i	10 мМ таурина^	7,1 г/л	9%

*Среда без добавления представляет собой контроль исходного уровня для % повышения титра

#Различие в конечном титре является статистически значимым по сравнению с контролем без добавления ($p < 0,1$)

^Различие в конечном титре является статистически значимым по сравнению с контролем без добавления ($p < 0,05$)

Показано, что изменение количества добавки таурина устойчиво приводило к высоким титрам, если таурин добавляли в диапазоне от по меньшей мере 0,1 до 10 мМ. Конечные титры в случае условий с добавлением таурина значимо отличались от условия без добавления. В случае добавления 0,1 мМ таурина отмечали $p < 0,1$, в то время как в случае добавления от 0,3 до 10 мМ таурина отмечали $p < 0,05$.

Пример 3.

Исследование изменения графиков подпитки таурином при высокопроизводительном культивировании во встряхиваемой колбе.

Пример 3А.

Добавление таурина во время фазы разрачивания системы посевных ферментеров.

Преимущества добавления таурина к культуре во время фазы разрачивания системы посевных ферментеров определяли в модели высокопроизводительного культивирования во встряхиваемой колбе. В колбе 6а (табл. 6) клетки СНО, образующие Ab1, размораживали в химически определяемой (не содержащей гидролизата и бессывороточной) основной среде, дополняемой 1 мМ таурина. Концентрацию таурина основной среды поддерживали при 1 мМ во всей фазе разрачивания. Во время образования продукта основную среду для культивирования дополняли 1 мМ таурина в 0-й день. Глюкозу и основную подпитку питательных веществ подавали по мере необходимости в течение 17-дневного образования продукта.

Клетки колбы 6b выращивали в не содержащей таурин (без добавления) химически определяемой (не содержащей гидролизата и бессывороточной) основной среде во всей фазе разрачивания системы посевных ферментеров. На 0-й день образования продукта основную среду для культивирования дополняли 1 мМ таурина. В течение 17-дневного образования продукта глюкозу и основные подпитки питательных веществ подавали по мере необходимости.

Таблица 6. Средние титры антитела за 17 дней для культур, дополняемых 1 мМ таурина во время различных фаз процесса

Встряхиваемая колба	Добавление 1 мМ таурина	Титр Ab1
6a	Фазы разрачивания системы посевных ферментеров и образования продукта	7,7 г/л
6b	Только фаза образования продукта	7,8 г/л

Различия в конечном титре (17-й день) не являются статистически значимыми ($p > 0,1$).

Значения конечных (17-й день) титров для обоих условий (добавление таурина только при образовании продукта или совместно в системе посевных ферментеров и при образовании продукта) являются аналогичными. Образующиеся титры не являются статистически значимыми ($p > 0,1$). Преимущество добавления таурина в фазе разрачивания системы посевных ферментеров является аналогичным добавлению таурина в фазе образования продукта.

Пример 3В.

Изменение графиков подпитки таурином во время фазы образования продукта.

Для определения того, оказывало ли какое-либо влияние изменение стандартных графиков подпитки таурином на титр белка в случае культур с добавлением таурина, проводили дополнительные эксперименты в аналогичных культурах во встряхиваемых колбах, в которых выращивали клетки СНО, образующие Ab1. Клетки подвергали различным условиям культивирования, аналогичным примеру 2, где график подпитки был аналогичным до того, как добавляли основную подпитку глюкозы/питательных веществ по мере необходимости.

Культуры, образующие Ab1, дополняли суммарно 5 мМ таурина. Аналогичную продуктивность (7,1 г/л, 6,8 г/л и 7,0 г/л) наблюдали при изменении графиков подпитки таурином. Значения титров, сравниваемые в данном эксперименте, статистически не различались ($p>0,1$) (см. табл. 7).

Таблица 7. Средние титры антител за 14 дней (г/л) для культур, дополняемых 5 мМ таурина при изменении графиков

График подпитки таурином	Титр Ab1 в 14-й день
5 мМ в 0-й день	7,1 г/л
1 мМ в 0-й, 3-й, 5-й, 7-й, 10 дни (суммарно 5 мМ)	6,8 г/л
1 мМ в 0-й день; 2 мМ в 7-й, 10-й дни (суммарно 5 мМ)	7,0 г/л

Различия между значениями в 14-й день не являются статистически значимыми ($p>0,1$).

Графики подпитки таурином как не оказывали никакого отрицательного эффекта, так и не изменяли результата в случае, когда добавление таурина было предпочтительным для выхода продукта. Таким образом, добавление таурина можно выполнять один раз в 0-й день, или выполнять в последующие дни фазы образования продукта, или можно выполнять через несколько интервалов во время фазы образования продукта.

Пример 4.

Измерение аммиачного побочного продукта при высокопроизводительном культивировании во встряхиваемой колбе.

Содержание аммиачного побочного продукта измеряли через 14 дней культивирования, проводимого аналогично примеру 2, для культур с добавлением таурина клеток СНО, образующих Ab1. Клетки подвергали различным условиям культивирования, аналогичным вышеописанным, где основную подпитку глюкозы/питательных веществ добавляли по мере необходимости.

Таблица 8. Среднее содержание и снижение (%) аммиака за 17 дней (мМ)

Добавка к среде	Аммиак в Ab1	
Без добавления*	2,56 мМ	
Таурин	1,73 мМ [^]	-32%

*Контроль исходного уровня для % снижения аммиака; условие с добавлением таурина по сравнению с содержанием аммиака в среде без добавления

[^]Снижение концентрации аммиака является статистически значимым ($p<0,1$)

В клетках, образующих Ab1, добавление таурина в среде поддерживало нормальное продолжительное культивирование, при этом содержание аммиачного продукта снижалось на 32%. Снижение концентрации аммиака в результате добавления таурина является статистически значимым ($p<0,1$).

Настоящее изобретение можно осуществлять в других конкретных вариантах осуществления.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ культивирования рекомбинантных клеток млекопитающего, экспрессирующих антиген-связывающий белок, предусматривающий стадии:

(а) размножение или поддержание клеток в химически определяемой среде для культивирования клеток во время фазы роста и

(b) добавление химически определяемой среды для культивирования клеток, содержащей от 0,1 до 10 мМ L-таурина, во время фазы образования продукта,

причем добавление L-таурина повышает титр антигенсвязывающего белка по меньшей мере на 3% по сравнению с клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок в среде для культивирования клеток, которая содержит менее 0,1 мМ L-таурина.

2. Способ по п.1, где добавление таурина из (b) предусмотрено от 1 до 5 раз во время фазы образования продукта.

3. Способ по п.1, где добавление таурина из (b) предусмотрено каждый день во время фазы образо-

вания продукта.

4. Способ по п.1, дополнительно предусматривающий добавление в культуру в химически определяемой среде для культивирования клеток от 0,1 до 10 mM L-таурина во время фазы роста.

5. Способ по п.1, где химически определяемая для культивирования клеток среда является бессывороточной и не содержит гидролизата.

6. Способ по п.1, где в химически определяемую для культивирования клеток среду добавляют орнитин и путресцин на стадии (b).

7. Способ по п.5, где рекомбинантную клетку млекопитающего выбирают из группы, состоящей из CHO, COS, клетки сетчатки, Vero, CV1, клетки почки, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, эпидермальной, CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, клетки MMT, клетки PER.C6®, стволовой клетки, опухолевой клетки и линии клеток, полученной из вышеупомянутой клетки.

8. Способ по п.7, где рекомбинантная клетка млекопитающего представляет собой клетку CHO.

9. Способ по п.7 или 8, где клетка CHO представляет собой CHO-K1, CHO DXB-11, CHO DG-44, Veggie-CHO, GS-CHO, S-CHO или CHO 1ес мутантную клетку.

10. Способ по п.7, где

клетка COS является клеткой COS 7,

клетка почки представляет собой клетку HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK или BHK21,

лимфоцит представляет собой клетку Джурката или Дауди или

эпидермальная клетка представляет собой клетку A431.

11. Способ по п.1, где антигенсвязывающий белок содержит Fc-домен.

12. Способ по п.1, где антигенсвязывающий белок выбирают из группы, состоящей из Fc-слитого белка, рецепторного Fc-слитого белка (TRAP), антитела, фрагмента антитела и ScFv-Fc-слитого белка.

13. Способ по п.1, где антигенсвязывающий белок выбирают из группы, состоящей из антитела к PD1, антитела к PDL-1, антитела к Dll4, антитела к ANG2, антитела к AngPt13, антитела к PDGFR, антитела к Erb3, антитела к PRLR, антитела к TNF, антитела к EGFR, антитела к PCSK9, антитела к GDF8, антитела к GCGR, антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к IL4R, антитела к IL6R, антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к RSV, антитела к NGF, антитела к CD3, антитела к CD20, антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к CD48, биспецифического антитела к CD3/CD20, биспецифического антитела к CD3/MUC16 и биспецифического антитела к CD3/PSMA.

14. Способ по п.1, где антигенсвязывающий белок выбирают из группы, состоящей из алирокумаба, сарилумаба, фасинумаба, несвакумаба, дупилумаба, тревогрумаба, эвинакумаба и ринукумаба.

15. Способ по п.12, где белок TRAP представляет собой афлиберцепт.

16. Способ по п.1, где рекомбинантная клетка млекопитающего содержит стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок.

17. Способ получения рекомбинантного антигенсвязывающего белка, предусматривающий стадии:

(a) введение в клетку или клетки млекопитающего нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок;

(b) выбор клетки (клеток), экспрессирующей (экспрессирующих) антигенсвязывающий белок;

(c) культивирование выбранной (выбранных) клетки (клеток) в среде для культивирования клеток, содержащей от 0,1 до 10 mM L-таурина; и

(d) получение антигенсвязывающего белка в клетке, где антигенсвязывающий белок секретируется в среду, причем добавление L-таурина повышает титр антигенсвязывающего белка по меньшей мере на 3% по сравнению с клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок в среде для культивирования клеток, которая содержит менее 0,1 mM L-таурина.

18. Способ по п.17, где клетка (клетки) стадии (c) способна к высокопродуктивному образованию антигенсвязывающего белка.

19. Способ по п.17, где клетка представляет собой клетку CHO, клетку HEK293 или клетку BHK.

20. Способ по п.19, где клетка CHO представляет собой CHO-K1, CHO DXB-11, CHO DG-44, Veggie-CHO, GS-CHO, S-CHO или CHO 1ес мутантную клетку.

21. Способ по п.17, где антигенсвязывающий белок содержит Fc-домен.

22. Способ по п.17, где антигенсвязывающий белок выбирают из группы, состоящей из Fc-слитого белка, рецепторного Fc-слитого белка (TRAP), антитела и фрагмента антитела.

23. Способ по п.17, где антигенсвязывающий белок выбирают из группы, состоящей из антитела к PD1, антитела к PDL-1, антитела к Dll4, антитела к ANG2, антитела к AngPt13, антитела к PDGFR, антитела к Erb3, антитела к PRLR, антитела к TNF, антитела к EGFR, антитела к PCSK9, антитела к GDF8, антитела к GCGR, антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к IL4R, антитела к IL6R, антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к RSV, антитела к NGF, антитела к CD3, антитела к CD20, антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к CD48, биспецифического антитела к CD3/CD20, биспецифического антитела к CD3/MUC16 и биспецифического антитела к CD3/PSMA.

24. Способ по п.17, где антигенсвязывающий белок выбирают из группы, состоящей из алирокумаба, сарилумаба, фасинумаба, несвакумаба, дупилумаба, тревогрумаба, эвинакумаба и ринукумаба.

25. Способ по п.22, где белок TRAP представляет собой афлиберцепт.

26. Способ по п.17, где клетка млекопитающего содержит стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок.

27. Способ получения антигенсвязывающего белка в среде для культивирования клеток с добавлением таурина, предусматривающий стадии:

(a) введение в клетку млекопитающего нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок;

(b) выбор клетки или клеток, экспрессирующих антигенсвязывающий белок;

(c) культивирование выбранной клетки (клеток) в среде для культивирования клеток;

(d) добавление в среду для культивирования клеток таурина в количестве от 0,1 до 10 мМ;

(e) поддержание культуры клеток в условиях добавления таурина из (d) в течение по меньшей мере 6 дней, причем добавление L-таурина повышает титр антигенсвязывающего белка по меньшей мере на 3% по сравнению с клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок в среде для культивирования клеток, которая содержит менее 0,1 мМ L-таурина, где антигенсвязывающий белок секретируется в среду; и

(f) сбор антигенсвязывающего белка.

28. Способ по п.27, где собранный антигенсвязывающий белок характеризуется титром белка, который повышается по меньшей мере на 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15% или по меньшей мере на 20% после по меньшей мере 6 дней по сравнению с клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок после по меньшей мере 6 дней в среде для культивирования клеток, которая содержит менее 0,1 мМ L-таурина.

29. Способ по п.27, где выбранная клетка (клетки) содержит стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок.

30. Способ по п.27, где антигенсвязывающий белок выбирают из группы, состоящей из Fc-слитого белка, рецепторного Fc-слитого белка (TRAP), антитела и фрагмента антитела.

31. Способ по п.27, где антигенсвязывающий белок выбирают из группы, состоящей из антитела к PD1, антитела к PDL-1, антитела к Dll4, антитела к ANG2, антитела к AngPt13, антитела к PDGFR, антитела к Erb3, антитела к PRLR, антитела к TNF, антитела к EGFR, антитела к PCSK9, антитела к GDF8, антитела к GCGR, антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к IL4R, антитела к IL6R, антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к RSV, антитела к NGF, антитела к CD3, антитела к CD20, антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к CD48, биспецифического антитела к CD3/CD20, биспецифического антитела к CD3/MUC16 и биспецифического антитела к CD3/PSMA.

32. Способ по п.27, где антигенсвязывающий белок выбирают из группы, состоящей из алирокумаба, сарилумаба, фасинумаба, несвакумаба, дупилумаба, тревогрумаба, эвинакумаба и ринукумаба.

33. Способ по п.30, где белок TRAP представляет собой афлиберцепт.

34. Способ по п.27, где способ может увеличить выход белка по меньшей мере на 0,1 г/л, по меньшей мере на 0,5 г/л, по меньшей мере на 1 г/л, по меньшей мере на 1,2 г/л, по меньшей мере на 1,4 г/л, по меньшей мере на 1,6 г/л, по меньшей мере на 1,8 г/л, по меньшей мере на 2 г/л, по меньшей мере на 2,2 г/л, по меньшей мере на 2,4 г/л или по меньшей мере на 2,5 г/л по сравнению с аналогичным способом получения в среде для культивирования клеток, которая содержит менее 0,1 мМ таурина.

35. Способ по п.1, где добавление L-таурина снижает уровень побочного аммиачного продукта по меньшей мере на 4% по сравнению с клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок в среде для культивирования клеток, которая содержит менее 0,1 мМ L-таурина.

36. Способ по п.1, где титр антигенсвязывающего белка, культивируемого в среде, содержащей от 0,1 до 10 мМ добавки L-таурина, составляет по меньшей мере 1,8 г/л.

37. Способ по п.17, где добавление L-таурина снижает уровень побочного аммиачного продукта по меньшей мере на 4% по сравнению с клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок в среде для культивирования клеток, которая содержит менее 0,1 мМ L-таурина.

38. Способ по п.17, где титр антигенсвязывающего белка, культивируемого в среде, содержащей от 0,1 до 10 мМ добавки L-таурина, составляет по меньшей мере 1,8 г/л.

39. Способ по п.27, где добавление L-таурина снижает уровень побочного аммиачного продукта по меньшей мере на 4% по сравнению с клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок в среде для культивирования клеток, которая содержит менее 0,1 мМ L-таурина.

40. Способ по п.27, где титр антигенсвязывающего белка, культивируемого в среде, содержащей от 0,1 до 10 мМ добавки L-таурина, составляет по меньшей мере 1,8 г/л.

41. Способ по п.27, где клетка млекопитающего содержит стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок.

Профили титра Ab3

