

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290326** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.05.16**

(51) Int. Cl. *C12N 5/02* (2006.01)  
*C12N 5/071* (2010.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2020.08.14**

---

**(54) СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК**

---

(31) **62/886,683**

(32) **2019.08.14**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/046330**

(87) **WO 2021/030672 2021.02.18**

(71) Заявитель:  
**ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
МАССАЧУСЕТТС (US)**

(72) Изобретатель:

**Йун Сеонгкю, Куанг Бингйю,  
Гэлбрейт Шон (US)**

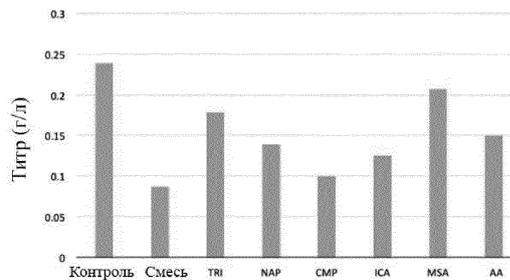
(74) Представитель:

**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,  
Христофоров А.А., Строкова О.В.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова  
М.Ю., Парамонова К.В., Прищепный  
С.В., Джермакян Р.В. (RU)**

---

(57) Способ культивирования клеток включает (i) культивирование клеток в среде для культивирования клеток и (ii) поддержание по меньшей мере одного метаболита, выбранного из аконитовой кислоты (AA), лейциновой кислоты (HICA), цитидинмонофосфата (CMP), метилянтарной кислоты (MSA), тригонеллина (TRI) и N-ацетилпутресцина (NAP) ниже ингибирующей концентрации в среде для культивирования клеток в отношении по меньшей мере одного метаболита.

Периодическая культура (титр)



**A1**

**202290326**

**202290326**

**A1**

## **СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК**

### **ОПИСАНИЕ**

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой США 62/886683, поданной 14 августа 2019 года, которая включена посредством ссылки в полном объеме.

#### **ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ФИНАНСИРУЕМЫХ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА ИССЛЕДОВАНИЙ ИЛИ РАЗРАБОТОК**

[0001] Настоящее изобретение было сделано при государственной поддержке Национального научного фонда в соответствии с 1624718. Государство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

#### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ НАСТОЯЩЕЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

[0002] Настоящее изобретение относится к способам культивирования клеток, продуцирования белков, таких как моноклональные антитела, в клетках млекопитающих, новым биомаркерам и способам контроля продуцирования белков с применением новых биомаркеров.

#### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0003] Клетки млекопитающих, такие как клеточные линии яичника китайского хомяка (СНО), применяются в качестве хозяев для получения терапевтических антител в биофармацевтической промышленности. В процессе получения антител клетки СНО, например, демонстрируют неэффективный и слабо регулируемый метаболизм, поскольку они склонны использовать большую часть доступных питательных веществ для продуцирования метаболитов, представляющих собой отходы, а не для потребностей своего роста. На поздней стадии биопроцесса клетки перестают расти и перестают продуцировать антитела, даже если уровень питательных веществ достаточен для поддержания роста и продуцирования белка. Накопленные метаболиты во время процесса являются одной из основных причин, ограничивающих скорость пролиферации клеток и продуцирования антител. Для контроля метаболизма и повышения продуктивности клеток

СНО крайне важно идентифицировать ингибирующие метаболиты, представляющие собой отходы, и изучать их пути.

[0004] Необходимым является идентификация ингибирующих метаболитов и разработка стратегии контроля.

### **КРАТКОЕ РАСКРЫТИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0005] В соответствии с одним аспектом способ культивирования клеток включает (i) культивирование клеток в среде для культивирования клеток и (ii) поддержание по меньшей мере одного метаболита, выбранного из аконитовой кислоты (AA), лейциновой кислоты (HICA), цитидинмонофосфата (CMP), метилянтарной кислоты (MSA), тригонеллина (TRI) и N-ацетилпутресцина (NAP) ниже ингибирующей концентрации в среде для культивирования клеток в отношении по меньшей мере одного метаболита.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[0006] На Фиг. 1 изображена интегральная плотность жизнеспособных клеток в виде накопления клеток в периодической культуре. Условия смеси исключали ICA и включали AA, HICA, CMP, MSA, TRI и NAP.

[0007] На Фиг. 2 изображено продуцирование антител, ингибируемое ингибирующими метаболитами. Производительность показана в г/л. Условия смеси были такими же, как на Фиг. 1.

[0008] На Фиг. 3 изображен график плотности жизнеспособных клеток для теста методом добавок с подпиткой.

[0009] На Фиг. 4 изображено, что HICA, CMP, ICA и TRI (снижение титра на 30-40% по сравнению с контролем) демонстрировали более сильное ингибирование продуктивности. Значения представляют собой значения титра при сборе (день 14), измеренные посредством HPLC со стандартными кривыми в трех повторах.

[0010] На Фиг. 5 изображено влияние качества продукта на G1F, одно из соединений гликанового профиля, обнаруженных в лекарственном средстве на основе антител на основе IgG, с указанием уровня гликозилирования. По сравнению с контрольной группой (столбец 9) AA, HICA, CMP, MSA и ICA оказывали более высокое влияние на образование G1F.

[0011] На Фиг. 6 изображено влияние качества продукта на G2F, одно из соединений гликанового профиля, обнаруженных в лекарственном средстве на основе антител на основе IgG, с указанием уровня гликозилирования. По сравнению с

контрольной группой (столбец 9) АК полностью ингибирует образование G2F, а все остальные 6 ингибиторов оказывали значительное влияние на образование G2F.

[0012] На Фиг. 7 изображена жидкостная хроматограмма для контрольной культуры в день 14. Во время биопроцесса наблюдали соединения гликанового профиля G0F, G1F и G2F.

[0013] На Фиг. 8 изображена жидкостная хроматограмма для культуры методом добавок AA в день 14. Наблюдали только пики G0F и G1F, G2F в ходе биопроцесса не образовывался.

[0014] На Фиг. 9 изображена жидкостная хроматограмма для культуры методом добавок AA в день 14.

[0015] На Фиг. 10 изображен пример стратегии контроля NAP. Он представляет собой метаболический путь N-ацетилпутресцина (NAP) в клетках CHO. Стратегия контроля 1: снизить концентрацию пролина и аргинина в среде, что приведет к снижению продуцирования NAP. В современной биотехнологии клеток CHO очень распространено перекармливание (слишком высокое содержание питательных веществ), что будет влиять на производство и качество биопроизводства. Стратегия контроля 2: снизить уровень экспрессии фермента (SAT1/2), например, посредством введения siRNA. При снижении экспрессии фермента скорость накопления NAP замедляется. В качестве дополнения или в качестве альтернативы повышение уровня экспрессии MAOB (моноаминоксидазы) приводит к переключению NAP на нижерасположенный цикл TCA, который может обеспечить энергию для роста клеток и продуцирования белка. Стратегия контроля 3: повышение активности MAOB для переключения NAP на нижерасположенный цикл TCA, который может обеспечить энергию для роста клеток и продуцирования белка.

[0016] На Фиг. 11 изображены профили роста клеток после активации регуляторных ферментов для продуцирования ингибирующих метаболитов. Контроль обозначает контрольное состояние культуры клеток с подпиткой CHO K1 без трансфекции каких-либо генов. T1 обозначает профиль роста клеток с Got1, трансфицированным в клеточную линию CHO K1. T2 обозначает трансфекцию Got1 и Nogal. T3 обозначает трансфекцию Got1, Nogal, Cat и Slc35a1. Резкое повышение пиковой плотности клеток наблюдали после трансфекции, тогда как пиковая плотность клеток возрастала на 50,9% в T2 и T3 по сравнению с контролем.

[0017] Вышеописанные и другие признаки будут оценены и понятны специалистам в данной области техники из следующего подробного описания, чертежей и прилагаемой формулы изобретения.

## ПОДРОБНОЕ РАСКРЫТИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0018] Клетки яичника китайского хомяка (СНО) остаются основными средствами для получения моноклональных антител (mAb). Для достижения высокой продуктивности антител производственный процесс осуществляется в условиях высокой плотности клеток (>10 миллионов клеток/мл). Однако производительность становится сдерживающим фактором вследствие больших концентраций секретируемых ингибирующих метаболитов, в то время как плотность клеток достигает рекордно высоких уровней. Накопление этих ингибирующих метаболитов ставит под угрозу рост клеток, а также создает риск для общего качества продукта, поскольку было показано, что накопление побочных продуктов, представляющих собой отходы (таких как аммиак), изменяет ключевые свойства продукта на основе рекомбинантных белков. Помимо обычных ингибиторов, в этом исследовании были идентифицированы и охарактеризованы посредством метаболомики новые метаболические биомаркеры с применением LC-MS. Производственный процесс для метаболомики ингибиторов, представляющих собой отходы, включал идентификацию кандидатов, проверку ингибирующего воздействия и количественную оценку, а также разработку стратегии контроля.

[0019] Новыми биомаркерами продуцирования белка в клетках СНО и других клетках млекопитающих являются аконитовая кислота (AA) или более конкретно аконитовая кислота (AA), лейциновая кислота (HICA), цитидинмонофосфат (CMP), метилянтарная кислота (MSA), тригонеллин (TRI) и N-ацетилпутресцин (NAP). Гуанозинмонофосфат (GMP) и индол-3-карбоновая кислота (ICA), которые были идентифицированы ранее, также были идентифицированы в исследованиях, описанных в данном документе, и могут быть объединены с биомаркерами, впервые описанными в данном документе.

[0020] В данном документе описаны способы культивирования клеток, в которых определяют концентрацию по меньшей мере одного метаболита, выбранного из аконитовой кислоты (AA), лейциновой кислоты (HICA), цитидинмонофосфата (CMP), метилянтарной кислоты (MSA), тригонеллина (TRI) и N-ацетилпутресцина (NAP), поддерживаемого при низких уровнях в среде для культивирования клеток. При культивировании клеток, и, в частности, при культивировании клеток с высокой плотностью, такой как, например, биопроцесс с периодической подпиткой и/или перфузией, направленные на получение большого количества рекомбинантного белка, представляющего интерес, рост клеток может быть ингибирован накоплением

метаболитов, таких как AA, HICA, CMP, MSA, TRI и/или NAP. Ингибирующее действие этих метаболитов может быть ограничено поддержанием их концентрации в культуральной среде ниже уровней, при которых они ингибируют рост клеток, продуктивность рекомбинантного белка и качество продукта. Качество продукта включает без ограничения характер гликозилирования, варианты заряда, агрегацию и фрагментацию, все из которых можно контролировать способами, описанными в данном документе.

[0021] В соответствии с одним аспектом способ культивирования клеток включает (i) культивирование клеток в среде для культивирования клеток для начала процесса культивирования клеток, и (ii) поддержание по меньшей мере одного метаболита, выбранного из AA, HICA, CMP, MSA, TRI и NAP ниже ингибирующей концентрации в среде для культивирования клеток в отношении по меньшей мере одного метаболита. В соответствии с одним аспектом клетки представляют собой клетки млекопитающих.

[0022] Иллюстративные клеточные линии CHO включают CHOK1, CHO GS и DG44. Другие клеточные линии млекопитающих включают клеточные линии, применяемые для получения терапевтических продуктов для применения у человека, таких как клетки HEK 293, клетки HT-1080, сконструированные Т-клетки и сконструированные естественные клетки-киллеры.

[0023] Ингибирующие количества метаболитов могут находиться в диапазоне от 1 нМ до 50 мМ, более конкретно от 100 нМ до 10 мМ.

[0024] Когда метаболит представляет собой AA, ингибирующая концентрация может составлять ниже 100 мкМ, 440 мкМ, 880 мкМ, 3 мМ, 5 мМ или 10 мМ.

[0025] Когда метаболит представляет собой HICA, ингибирующая концентрация может составлять ниже 10 мкМ, 23,5 мкМ, 47 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ.

[0026] Когда метаболит представляет собой CMP, ингибирующая концентрация может составлять ниже 5 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ или 1 мМ.

[0027] Когда метаболит представляет собой MSA, ингибирующая концентрация может составлять ниже 1 мкМ, 3,75 мкМ, 7,5 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ.

[0028] Когда метаболит представляет собой TRI, ингибирующая концентрация может составлять ниже 0,1 мкМ, 0,35 мкМ, 0,7 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ.

[0029] Когда метаболит представляет собой NAP, ингибирующая концентрация может составлять ниже 0,1 мкМ, 0,3 мкМ, 0,6 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ.

[0030] В соответствии с одним аспектом способ включает измерение концентрации по меньшей мере одного метаболита. Концентрацию метаболита можно измерить любым способом, известным специалисту-аналитику.

[0031] Концентрацию метаболитов можно измерять один или несколько раз во время культивирования клеток. В соответствии с аспектами концентрацию метаболита измеряют непрерывно, периодически, каждые 30 минут, каждый час, каждые два часа, два раза в день, ежедневно или каждые два дня. В соответствии с предпочтительным аспектом концентрацию метаболита измеряют ежедневно.

[0032] Концентрация может быть измерена в способе, который не автоматизирован и не интегрирован в способ культивирования клеток. Например, может быть применен способ измерения, при котором образец вручную берется из среды для культивирования клеток, чтобы можно было измерить конкретную концентрацию в образце. В качестве альтернативы определение концентрации метаболитов может быть автоматизировано и интегрировано в способ культивирования клеток.

[0033] Иллюстративные способы измерения концентрации метаболитов включают спектроскопию на основе ядерного магнитного резонанса (NMR), рамановскую спектроскопию, высокоэффективную/ультраэффективную жидкостную хроматографию (H/UPLC), жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (LC-MS), газовую хроматографию-масс-спектрометрию (GC-MS) или их комбинацию. При GC-MS, например, эксперимент можно проводить с автоматическим автодозатором, который отбирает образцы из реактора и передает их к оборудованию в запрограммированном порядке. В не представленных данных идентификация AA, HICA, CMP, MSA, TRI и NAP была подтверждена с применением комбинации одного или нескольких из вышеперечисленных способов.

[0034] В соответствии с одним аспектом, когда измеренная концентрация одного или нескольких метаболитов превышает предварительно определенное значение, такое как ингибирующая концентрация, используется стратегия контроля для ограничения концентрации ингибирующего метаболита. В стратегии контроля I концентрация предшественника (например, аминокислоты, глюкоза) по меньшей мере одного метаболита в среде для культивирования клеток снижается за счет уменьшения количества предшественника, подаваемого клеткам. Ограничение предшественников метаболитов будет приводить к снижению накопления ингибирующих метаболитов. Этот способ также можно обозначить как контроль среды. Предварительно определенное значение выбирают таким образом, чтобы снижение концентрации предшественника

предупреждало повышение концентрации одного или нескольких метаболитов выше ингибирующей концентрации.

[0035] Когда метаболит представляет собой AA, предшественником является глютамин, глюкоза, аргинин и/или аспарагин.

[0036] Когда метаболит представляет собой HISA, предшественником является лейцин и/или изолейцин.

[0037] Когда метаболит представляет собой CMP, предшественником является глютамин, аргинин и/или аспарат.

[0038] Когда метаболит представляет собой MSA, предшественником является лизин, изолейцин, серин, глюкоза и/или глютамин.

[0039] Когда метаболит представляет собой TRI, предшественником является аспарат, триптофан и/или глютамин.

[0040] Когда метаболит представляет собой NAP, предшественником является аргинин, пролин, аспарат, глютамин и/или аспарагин.

[0041] Комбинации вышеупомянутых предшественников также могут быть снижены в способах.

[0042] Снижение концентрации предшественников ингибирующих метаболитов может приводить к снижению концентрации ингибитора для оптимизации способа.

[0043] Концентрация предшественника в среде для культивирования клеток может быть снижена за счет снижения количества предшественника, подаваемого клеткам, например, за счет снижения концентрации предшественника в питательной среде, снижения скорости подачи, снижения количества или объема подачи, или их комбинации. Например, питательная среда может быть заменена питательной средой, содержащей более низкую концентрацию предшественника.

[0044] Концентрация предшественников может находиться в диапазоне от 0,01 г/л до 2 г/л. Более конкретно:

[0045] когда предшественником является аргинин, концентрация может быть ниже 0,2 г/л, 0,3 г/л, 0,4 г/л, 0,5 г/л или 0,6 г/л;

[0046] когда предшественником является аспарагин, концентрация может быть составлять 0,1 г/л, 0,3 г/л, 0,5 г/л, 0,7 г/л или 0,9 г/л;

[0047] когда предшественником является аспарагиновая кислота, концентрация может быть составлять 0,1 г/л, 0,3 г/л, 0,5 г/л, 0,7 г/л или 0,9 г/л;

[0048] когда предшественником является глютамин, концентрация может составлять ниже 0,1 г/л, 0,6 г/л, 0,9 г/л, 1,2 г/л или 1,5 г/л;

[0049] когда предшественником является изолейцин, концентрация может составлять ниже 0,05 г/л, 0,15 г/л, 0,25 г/л, 0,35 г/л или 0,45 г/л;

[0050] когда предшественником является лейцин, концентрация может составлять ниже 0,1 г/л, 0,2 г/л, 0,3 г/л, 0,4 г/л или 0,5 г/л;

[0051] когда предшественником является лизин, концентрация может составлять ниже 0,1 г/л, 0,2 г/л, 0,3 г/л, 0,4 г/л или 0,5 г/л;

[0052] когда предшественником является пролин, концентрация может составлять ниже 0,05 г/л, 0,15 г/л, 0,25 г/л, 0,35 г/л или 0,45 г/л;

[0053] когда предшественником является серин, концентрация может составлять ниже 0,05 г/л, 0,15 г/л, 0,25 г/л, 0,35 г/л или 0,45 г/л;

[0054] когда предшественником является триптофан, концентрация может составлять ниже 0,01 г/л, 0,03 г/л, 0,07 г/л, 0,1 г/л или 0,15 г/л.

[0055] План экспериментов, такой как план Плакетта-Бермана или методика с использованием поверхности отклика (RSM), может применяться для определения оптимальной концентрации предшественника из указанного выше диапазона концентраций для сведения к минимуму накопления ингибирующих метаболитов.

[0056] Снижение количества глюкозы, например, может предусматривать культивирование клеток при низких концентрациях глюкозы с использованием альтернативных источников углерода, включая без ограничения фруктозу и галактозу, с использованием клеточной линии со сниженным уровнем белка гликолитических ферментов, включая без ограничения переносчик гексозы или лактатдегидрогеназу, с использованием клеточной линии с подавленными уровнями клеточного белка как лактатдегидрогеназы, так и киназы пируватдегидрогеназы, или с использованием клеточной линии со сверхэкспрессией фермента пируваткарбоксилазы, или с использованием ингибиторов (низкомолекулярных или белковых) для сигнальных путей (таких как АКТ, mTOR, HIF1a), которые регулируют активность путей энергетического метаболизма (гликолиз, цикл ТСА и окислительно-восстановительный путь).

[0057] В стратегиях контроля 2a, b и 3 экспрессией вышерасположенного и нижерасположенного фермента (стратегия 2) или активностью (стратегия 3) манипулируют для снижения синтеза ингибирующих метаболитов. Общая идея, лежащая в основе стратегий контроля 2 и 3, состоит в том, чтобы снижать уровень вышерасположенного фермента для того, чтобы клетки продуцировали меньше ингибирующих метаболитов, и/или повышать уровень нижерасположенных ферментов

для того, чтобы клетки потребляли метаболиты для выработки энергии. На Фиг. 10 изображены три стратегии контроля, проиллюстрированные в отношении NAP.

[0058] В стратегии контроля 2a экспрессия вышерасположенного и/или нижерасположенного фермента, который контролирует уровень метаболита, может регулироваться с использованием ингибирующей нуклеиновой кислоты, такой как siRNA. Термин «ингибирующая нуклеиновая кислота» означает одноцепочечную или двухцепочечную РНК или ДНК, в частности, РНК, такую как олигонуклеотиды триплекса, рибозимы, аптамеры, малые интерферирующие РНК, включая siRNA (короткую интерферирующую РНК) и shRNA (короткую шпилечную РНК), антисмысловую РНК, или ее часть, или ее аналог, или ее миметик, которые способны снижать или ингибировать экспрессию целевого гена или последовательности. Ингибирующие нуклеиновые кислоты могут функционировать, например, в результате опосредования деградации или ингибирования трансляции mRNA, которые комплементарны интерферирующей последовательности РНК. Ингибирующая нуклеиновая кислота при введении в клетку млекопитающего приводит к снижению (например, на 5%, 10%, 25%, 50%, 75% или даже 90-100%) экспрессии (например, транскрипции или трансляция) целевой последовательности. Как правило, ингибитор нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере часть целевой молекулы нуклеиновой кислоты или ее ортолога, или соответствует им, содержит по меньшей мере часть комплементарной цепи целевой молекулы нуклеиновой кислоты. Ингибирующие нуклеиновые кислоты могут характеризоваться существенной или полной идентичностью с целевым геном или последовательностью или могут включать область ошибочного спаривания (т.е. мотив ошибочного спаривания). Последовательность ингибирующей нуклеиновой кислоты может соответствовать полноразмерному целевому гену или его подпоследовательности. В соответствии с одним аспектом молекулы ингибирующей нуклеиновой кислоты синтезируют химическим путем.

[0059] В стратегии контроля 2b рекомбинантная ДНК используется для сверхэкспрессии одного или нескольких нижерасположенных ферментов, которые контролируют уровень метаболита, за счет чего снижается уровень метаболита.

[0060] В стратегии контроля 3 активацию фермента можно контролировать с помощью двух разных подходов:

[0061] Подход 1: регулирование экспрессии фермента для снижения синтеза метаболита предусматривает добавление ингибитора активности фермента. Иллюстративные ингибиторы активности фермента включают малые молекулы, пептиды,

белки и нуклеиновые кислоты, которые связываются с активным центром фермента и препятствуют активности фермента.

[0062] Подход 2: Поскольку все ингибирующие метаболиты могут быть далее метаболизированы в цикл ТСА для получения энергии, активаторы гликолитического пути, такие как НК-1 и ГК, могут использоваться для снижения накопления ингибирующих метаболитов.

[0063] Для стратегий контроля 2 и 3 в соответствии с определенными аспектами, в которых метаболит представляет собой АА, а фермент представляет собой ADI1, HOGA1, TAD1 или их комбинацию;

в которых метаболит представляет собой HICA, а фермент представляет собой GOT1, D-HicDH, MMUT, AUH, HMGCL, HADHA/B или их комбинацию;

в которых метаболит представляет собой CMP, а фермент представляет собой UCK1/2, NT5, CMAS, CMPK1, DDYD, CDA, SLC35A1, RRM1, HOGA1 или их комбинацию;

в которых метаболит представляет собой MSA, а фермент представляет собой GOT1, ETHE1, AMT, HADHA/B, MMUT или их комбинацию;

в которых метаболит представляет собой TRI, а фермент представляет собой NADSYN1, NNMT, CAT, NMNAT1, SULT4A1 или их комбинацию;

в которых метаболит представляет собой NAP, а фермент представляет собой SAT1/2, HOGA1, AMD1, ODC1, GOT1, MAOB или их комбинацию; или их комбинацию.

[0064] В стратегии контроля 4 поддержание по меньшей мере одного метаболита ниже ингибирующей концентрации в среде для культивирования клеток в отношении по меньшей мере одного метаболита предусматривает контроль параметров процесса, включая температуру, уровень растворенного кислорода, pH или их комбинацию. Оптимальную температуру, уровень растворенного кислорода и pH можно определить по скорости ферментативной реакции и накоплению ингибирующих метаболитов. Способ может быть оптимизирован для биопроцессов с периодической подпиткой и перфузией.

[0065] Иллюстративные температуры составляют от приблизительно 30 °C до приблизительно 40 °C, в частности, температуры 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C и 37 °C в ранней фазе и поздней фазе культивирования клеток.

[0066] Иллюстративные значения pH находятся в диапазоне от 5,5 до 8,5, например, pH 6,5, 6,7, 6,9, 7, 7,2, 7,4 или 7,6. Барботирование CO<sub>2</sub> и/или добавление Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> можно использовать для осуществления баланса pH. Иллюстративные скорости

барботирования CO<sub>2</sub> включают 0,3 SLPH, 0,4 SLPH, 0,5 SLPH, 0,6 SLPH и 0,7 SLPH (стандартный литр в час). Иллюстративные скорости перемешивания для добавки Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> включают 90 об./мин., 120 об./мин., 150 об./мин. и 170 об./мин. (раундов в минуту).

[0067] Иллюстративные заданные значения растворенного кислорода включают от 5% до 50%, например, 20%, 30% и 40%.

[0068] Любая клетка, которую можно выращивать в клеточной культуре, может быть использована в способах, описанных в данном документе. В соответствии с некоторыми аспектами клетка представляет собой клетку млекопитающего. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих включают линии миеломы мышей BALB/c (NSO/I, ECACC №: 85110503); ретинобласты человека (PER.C6, CruCell, Лейден, Нидерланды); линии почек обезьяны CV1, трансформированные SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линии почек эмбрионов человека (клетки 293 или 293, субклонированные для выращивания в суспензии); клетки почек детенышей хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI; клетки MRC 5; клетки FS4; и линию гепатомы человека (Hep G2). В соответствии с одним аспектом клетки представляют собой клетки CHO, клетки HEK 293, клетки HT-1080, сконструированные Т-клетки и сконструированные естественные клетки-киллеры. Сконструированные Т-клетки включают CAR Т-клетки.

[0069] В способах, описанных в данном документе, можно использовать любое количество коммерчески доступных и некоммерчески доступных клеточных линий гибридомы. Термин «гибридома», используемый в данном документе, относится к клетке или потомству клетки, полученному в результате слияния иммортализованной клетки и антителопродуцирующей клетки. Такая полученная гибридома представляет собой иммортализованную антителопродуцирующую клетку. Отдельные клетки, используемые для создания гибридомы, могут быть получены из любого млекопитающего, включая без ограничения крысу, свинью, кролика, овцу, козу и человека. В соответствии с некоторыми аспектами гибридома представляет собой клеточную линию триомы, которая возникает,

когда потомство слияний гетерогбридной миеломы, которое является продуктом слияния между клетками человека и клеточной линией мышинной миеломы, впоследствии сливаются с плазматической клеткой. В соответствии с некоторыми аспектами гибридома представляет собой любую иммортализованную гибридную клеточную линию, которая продуцирует антитела, такую как, например, квадромы. Специалисту в данной области техники будет понятно, что клеточные линии гибридомы могут иметь различные потребности в питании и/или могут требовать различных условий культивирования для оптимального роста, и он сможет изменять условия по мере необходимости.

[0070] Термины «культура» и «культура клеток», используемые в данном документе, относятся к клеточной популяции, которая суспендирована в среде в условиях, подходящих для выживания и/или роста клеточной популяции. Как будет понятно специалистам в данной области техники, в соответствии с некоторыми аспектами эти термины, используемые в данном документе, относятся к комбинации, содержащей клеточную популяцию и среду, в которой популяция суспендирована. В соответствии с некоторыми аспектами клетки клеточной культуры включают клетки млекопитающих.

[0071] Способы, описанные в данном документе, можно использовать с любым способом культивирования клеток, который подходит для необходимого способа (например, получения рекомбинантного белка (например, антитела)). В качестве неограничивающего примера клетки можно выращивать в периодических культурах или периодических культурах с подпиткой, где культуру терминируют после достаточной экспрессии рекомбинантного белка (например, антитела), после чего собирают экспрессированный белок (например, антитело). В качестве альтернативы в качестве еще одного неограничивающего примера клетки можно выращивать с периодической повторной подпиткой, при котором культура не терминируется, а новые питательные вещества и другие компоненты периодически или постоянно добавляются в культуру, во время которой экспрессируется рекомбинантный белок (например, антитело) собирают периодически или постоянно. Другие подходящие способы (например, культивирование в центрифужных пробирках) известны в данной области техники и могут использоваться для практического применения способов, описанных в данном документе.

[0072] В соответствии с некоторыми аспектами клеточная культура представляет собой периодическую культуру с подпиткой. Термин «периодическая культура с подпиткой», используемый в данном документе, относится к способу культивирования клеток, при котором дополнительные компоненты добавляются в культуру во время или после начала процесса культивирования. Такие предоставленные компоненты обычно

содержат питательные компоненты для клеток, которые были деплетированы в процессе культивирования. Периодическую культуру с подпиткой обычно терминируют в какой-то момент, а клетки и/или компоненты среды собирают и необязательно очищают. В соответствии с некоторыми аспектами периодическая культура с подпиткой содержит базовую среду с добавлением питательной среды.

[0073] В качестве альтернативы клетки можно выращивать в процессе перфузии. В процессе перфузии клетки остаются в биореакторе, при этом постоянно удаляются продукты жизнедеятельности клеток и деплетированная среда. Свежая среда добавляется примерно с той же скоростью, что и деплетированная среда удаляется из системы. Удаление отработанной среды может быть выполнено с помощью чередующегося тангенциального потока, стандартной фильтрации с тангенциальным потоком, фильтрации с использованием полых волокон и т.п.

[0074] Клетки можно выращивать в любом удобном объеме, выбранном практикующим специалистом. Например, клетки можно выращивать в небольших реакционных сосудах объемом от нескольких миллилитров до нескольких литров. В качестве альтернативы клетки можно выращивать в крупномасштабных коммерческих биореакторах объемом примерно от по меньшей мере 1 литра до 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000, 15000, 20000 или 25000 литров или больше или любом объеме между ними.

[0075] Температуру клеточной культуры выбирают, прежде всего, исходя из диапазона температур, при котором клеточная культура остается жизнеспособной, и диапазона, в котором продуцируется высокий уровень необходимого продукта (например, рекомбинантного белка). В целом, большинство клеток млекопитающих хорошо растут и могут продуцировать необходимые продукты (например, рекомбинантные белки) в диапазоне температур от приблизительно 25 °C до 42 °C, хотя способы, описанные в данном документе, не ограничиваются этими температурами. Определенные клетки млекопитающих хорошо растут и могут продуцировать необходимые продукты (например, рекомбинантные белки или антитела) в диапазоне температур от приблизительно 35 °C до 40 °C. В соответствии с некоторыми аспектами клеточную культуру выращивают при температуре 20-45 °C один или несколько раз в процессе культивирования клеток. Специалисты в данной области техники смогут выбрать подходящую температуру или температуры для выращивания клеток в зависимости от конкретных потребностей клеток и конкретных производственных требований практикующего специалиста. Клетки можно выращивать в течение любого периода

времени, в зависимости от потребностей практикующего специалиста и требований самих клеток. В соответствии с одним аспектом клетки выращивают при 37 °С. В соответствии с другими аспектами клетки выращивают при 36,5 °С.

[0076] В соответствии с некоторыми аспектами клетки выращивают во время начальной фазы роста (или фазы роста) в течение большего или меньшего времени, в зависимости от потребностей практикующего специалиста и требований самих клеток. В соответствии с некоторыми аспектами клетки выращивают в течение периода времени, достаточного для достижения предварительно определенной плотности клеток. В соответствии с некоторыми аспектами клетки выращивают в течение периода времени, достаточного для достижения плотности клеток, которая представляет собой заданный процент от максимальной плотности клеток, которой в конечном итоге достигли бы клетки, если бы им давали возможность расти без помех. Например, клетки можно выращивать в течение периода времени, достаточного для достижения необходимой плотности жизнеспособных клеток 1-99 процентов от максимальной плотности клеток. В соответствии с некоторыми аспектами клетки выращивают до тех пор, пока плотность клеток не возрастет на более чем 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% на день культивирования. В соответствии с некоторыми аспектами клетки выращивают до тех пор, пока плотность клеток не возрастет на более чем 5% на день культивирования.

[0077] В соответствии с некоторыми аспектами клеткам позволяют расти в течение определенного периода времени. Например, в зависимости от исходной концентрации клеточной культуры, температуры, при которой выращивают клетки, и собственной скорости роста клеток клетки можно выращивать в течение 0-20 или более дней, в частности, в течение от 4 до 10 дней. В некоторых случаях клеткам может быть позволено расти в течение месяца или больше. Практикующий специалист сможет выбрать продолжительность начальной фазы роста в зависимости от требований к получению белка и потребностей самих клеток.

[0078] Культуру клеток можно перемешивать или встряхивать во время начальной фазы культивирования, чтобы увеличить оксигенацию и распределение питательных веществ в клетках. Специалисту в данной области техники будет понятно, что может быть предпочтительно контролировать или регулировать определенные внутренние условия биореактора во время начальной фазы роста, включая, помимо прочего, рН, температуру, оксигенацию и т.п.

[0079] В конце начальной фазы роста по меньшей мере одно из условий культивирования может быть изменено таким образом, что применяется второй набор условий культивирования, и в культуре происходит метаболический сдвиг. Метаболический сдвиг может быть достигнут, например, посредством изменения температуры, уровня растворенного кислорода, рН, осмоляльности или уровня химического индуктивного вещества в клеточной культуре. В соответствии с одним неограничивающим аспектом условия культивирования изменяются путем изменения температуры культивирования. Однако, как известно в данной области техники, изменение температуры не является единственным механизмом, с помощью которого может быть достигнут соответствующий метаболический сдвиг. Например, такой метаболический сдвиг также может быть достигнут путем изменения других условий культивирования, включая без ограничения рН, растворенный кислород, осмоляльность и уровни бутирата натрия. Время смены культуры будет определяться практикующим специалистом на основе требований к получению белка или потребностей самих клеток.

[0080] При смещении температуры культуры сдвиг температуры может быть относительно постепенным. Например, для полного изменения температуры может потребоваться несколько часов или дней. В качестве альтернативы температурный сдвиг может быть относительно выраженным. Например, изменение температуры может быть завершено менее чем за несколько часов. При наличии соответствующего производственного и контрольного оборудования, такого как стандартное для промышленного крупномасштабного производства полипептидов или белков, изменение температуры может быть завершено менее чем за час.

[0081] В соответствии с некоторыми аспектами после изменения условий клеточной культуры, как обсуждалось выше, клеточную культуру поддерживают для последующей фазы продуцирования при втором наборе условий культивирования, способствующих выживанию и жизнеспособности клеточной культуры и подходящих для экспрессии необходимого полипептида или белка при коммерчески приемлемых уровнях.

[0082] Как обсуждалось выше, культура может быть изменена путем изменения одного или нескольких условий культивирования, включая без ограничения температуру, растворенный кислород, рН, осмоляльность и уровни бутирата натрия. В соответствии с некоторыми аспектами температура культуры смещается. В соответствии с этим аспектом во время последующей фазы продуцирования культуру поддерживают при температуре или диапазоне температур, которые ниже, чем температура или диапазон температур начальной фазы роста. Как обсуждалось выше, для повышения плотности или

жизнеспособности клеток или для повышения экспрессии рекомбинантного белка можно использовать множественные дискретные температурные сдвиги.

[0083] Клетки могут экспрессировать рекомбинантный белок, генный продукт или клеточный продукт. В соответствии с некоторыми аспектами клетки экспрессируют рекомбинантный белок, и способ культивирования клеток включает фазу роста и фазу продуцирования. Способ, описанный в данном документе, может применяться на стадии роста, стадии продуцирования или на обеих стадиях.

[0084] Способы, описанные в данном документе, можно применять для улучшения роста клеток в культуре клеток высокой плотности при высокой плотности клеток. Высокая плотность клеток, используемая в данном документе, относится к плотности клеток выше  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $5 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^7$  клеток/мл,  $5 \times 10^7$  клеток/мл,  $1 \times 10^8$  клеток/мл или  $5 \times 10^8$  клеток/мл, предпочтительно выше  $1 \times 10^7$  клеток/мл, более предпочтительно выше  $5 \times 10^7$  клеток/мл.

[0085] В соответствии с некоторыми аспектами рост клеток определяется плотностью жизнеспособных клеток (VCD), максимальной плотностью жизнеспособных клеток или интегрированным содержанием жизнеспособных клеток (IVCC). В соответствии с некоторыми аспектами рост клеток определяется максимальной плотностью жизнеспособных клеток. Термин «плотность жизнеспособных клеток», используемый в данном документе, относится к числу клеток, присутствующих в данном объеме среды. Плотность жизнеспособных клеток может быть измерена любым способом, известным специалисту в данной области техники. Предпочтительно плотность жизнеспособных клеток измеряют с применением автоматического счетчика клеток, такого как Bioprofile Flex®. Термин «максимальная плотность клеток», используемый в данном документе, относится к максимальной плотности клеток, достигаемой во время культивирования клеток. Термин «жизнеспособность клеток», используемый в данном документе, относится к способности клеток в культуре выживать при заданном наборе условий культивирования или экспериментальных вариациях. Например, для определения жизнеспособности клетки можно использовать краситель (например, трипановый синий), который не проходит через мембрану живой клетки, но может проходить через разрушенную мембрану мертвой или умирающей клетки.

[0086] Термин «интегрированное содержание жизнеспособных клеток (IVCC)», используемый в данном документе, относится к площади под кривой плотности жизнеспособных клеток (VCD). IVCC можно рассчитать по следующей формуле:

$$IVCC_{t+1} = IVCC_t + (VCD_t + VCD_{t+1}) * (\Delta t) / 2$$

где  $\Delta t$  представляет собой разницу во времени между временными точками  $t$  и  $t+1$ .  $IVCC_{t=0}$  можно считать пренебрежимо малым.  $VCD_t$  и  $VCD_{t+1}$  представляют собой плотности жизнеспособных клеток во временные точки  $t$  и  $t+1$ .

[0087] Термин «титр», используемый в данном документе, относится, например, к общему количеству рекомбинантно экспрессированного белка, продуцируемого клеточной культурой в заданном количестве объема среды. Титр обычно выражается в граммах белка на литр среды.

[0088] В соответствии с некоторыми аспектами рост клеток повышается на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% по сравнению с контрольной культурой. Контрольная культура может быть идентична культуре, описанной выше, за исключением того, что ее не культивируют на стадии (ii). В соответствии с некоторыми аспектами рост клеток повышается на по меньшей мере 10% по сравнению с контрольной культурой. В соответствии с некоторыми аспектами рост клеток повышается на по меньшей мере 20% по сравнению с контрольной культурой.

[0089] В соответствии с некоторыми аспектами продуктивность определяется титром и/или объемной продуктивностью. Термин «титр», используемый в данном документе, относится, например, к общему количеству рекомбинантно экспрессированного белка, продуцируемого клеточной культурой в заданном количестве объема среды. Титр обычно выражается в граммах белка на литр среды. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления продуктивность определяют по титру. В соответствии с некоторыми аспектами продуктивность повышается на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% по сравнению с контрольной культурой. В соответствии с некоторыми аспектами продуктивность повышается на по меньшей мере 10% по сравнению с контрольной культурой. В соответствии с некоторыми аспектами продуктивность повышается на по меньшей мере 20% по сравнению с контрольной культурой.

[0090] В соответствии с некоторыми аспектами максимальная плотность клеток клеточной культуры составляет более  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $5 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^7$  клеток/мл,  $5 \times 10^7$  клеток/мл,  $1 \times 10^8$  клеток/мл или  $5 \times 10^8$  клеток/мл. В соответствии с некоторыми аспектами максимальная плотность клеток клеточной культуры составляет более  $5 \times 10^6$  клеток/мл. В соответствии с некоторыми аспектами максимальная плотность клеток клеточной культуры составляет более  $1 \times 10^8$  клеток/мл.

[0091] Термины «среда», «среда для культивирования клеток» и «среда для культивирования», используемые в данном документе, относятся к раствору,

содержащему питательные вещества, которые питают растущие клетки млекопитающих. Обычно такие растворы содержат незаменимые и заменимые аминокислоты, витамины, источники энергии, липиды и микроэлементы, необходимые клетке для минимального роста и/или выживания. Такой раствор может также содержать дополнительные компоненты, которые усиливают рост и/или выживаемость выше минимальной скорости, включая без ограничения гормоны и/или другие факторы роста, определенные ионы (такие как натрий, хлорид, кальций, магний и фосфат), буферы, витамины, нуклеозиды или нуклеотиды, микроэлементы (неорганические соединения, обычно присутствующие в очень низких конечных концентрациях), неорганические соединения, присутствующие в высоких конечных концентрациях (например, железо), аминокислоты, липиды и/или глюкозу или другой источник энергии. В соответствии с некоторыми аспектами среду преимущественно составляют с рН и концентрацией соли, оптимальными для выживания и пролиферации клеток. В соответствии с некоторыми аспектами среда представляет собой питательную среду, которую добавляют после начала культивирования клеток.

[0092] В соответствии со способами, описанными в данном документе, можно использовать широкий спектр питательной среды для млекопитающих. В соответствии с некоторыми аспектами клетки можно выращивать в одной из множества сред с определенным химическим составом, где компоненты сред известны и контролируются. В соответствии с некоторыми аспектами клетки можно выращивать в сложной среде, в которой не все компоненты среды известны и/или контролируются.

[0093] Среда для выращивания культур клеток млекопитающих с определенным химическим составом широко разрабатывались и публиковались в течение последних нескольких десятилетий. Все компоненты определенных сред хорошо охарактеризованы, поэтому определенные среды не содержат сложных добавок, таких как сыворотка или гидролизаты. Ранние составы сред были разработаны для обеспечения роста клеток и поддержания их жизнеспособности практически без учета продуцирования белка. Совсем недавно составы сред были разработаны специально для поддержки высокопродуктивных клеточных культур, продуцирующих рекомбинантный белок. Такие среды обычно содержат большое количество питательных веществ и, в частности, аминокислот для поддержания роста и/или поддержания высокой плотности клеток. При необходимости эти среды могут быть модифицированы специалистом в данной области техники для применения в способах, описанных в данном документе.

[0094] Не все компоненты сложных сред хорошо охарактеризованы, поэтому сложные среды могут содержать добавки, такие как простые и/или сложные источники

углерода, простые и/или сложные источники азота и сыворотку, среди прочего. В соответствии с некоторыми аспектами сложная среда содержит добавки, такие как гидролизаты, в дополнение к другим компонентам определенной среды, как описано в данном документе.

[0095] В соответствии с некоторыми аспектами определенная среда обычно содержит примерно пятьдесят химических соединений в известных концентрациях в воде. Большинство из них также содержат один или несколько хорошо охарактеризованных белков, таких как инсулин, IGF-1, трансферрин или BSA, но другие не требуют белковых компонентов и поэтому называются средами с определенными свойствами, не содержащими белков. Типичные химические компоненты среды делятся на пять широких категорий: аминокислоты, витамины, неорганические соли, микроэлементы и другие категории, не поддающиеся четкой классификации.

[0096] Среда для культивирования клеток может быть необязательно дополнена дополнительными компонентами. Термин «дополнительные компоненты», используемый в данном документе, относится к компонентам, которые усиливают рост и/или выживаемость выше минимальной скорости, включая без ограничения гормоны и/или другие факторы роста, определенные ионы (такие как натрий, хлорид, кальций, магний и фосфат), буферы, витамины, нуклеозиды или нуклеотиды, микроэлементы (неорганические соединения, обычно присутствующие в очень низких конечных концентрациях), аминокислоты, липиды и/или глюкозу или другой источник энергии. В соответствии с некоторыми аспектами к исходной культуре клеток могут быть добавлены дополнительные компоненты. В соответствии с некоторыми аспектами дополнительные компоненты могут быть добавлены после начала культивирования клеток.

[0097] Обычно микроэлементы относятся к различным неорганическим солям, содержащимся при микромолярных или более низких уровнях. Например, часто включаемыми микроэлементами являются цинк, селен, медь и другие. В соответствии с некоторыми аспектами железо (двухвалентное железо или соли трехвалентного железа) может быть включено в качестве микроэлемента в исходную среду для культивирования клеток в микромолярных концентрациях. Марганец также часто включается в число микроэлементов в виде двухвалентного катиона ( $MnCl_2$  или  $MnSO_4$ ) в диапазоне концентраций от наномолярных до микромолярных. Многочисленные менее распространенные микроэлементы обычно добавляют в наномолярных концентрациях.

[0098] В соответствии с некоторыми аспектами среда, применяемая в способе, представляет собой среду, подходящую для поддержания высокой плотности клеток,

такой как, например,  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $5 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^7$  клеток/мл,  $5 \times 10^7$  клеток/мл,  $1 \times 10^8$  клеток/мл или  $5 \times 10^8$  клеток/мл в клеточной культуре. В соответствии с некоторыми аспектами клеточная культура представляет собой периодическую культуру клеток млекопитающих с подпиткой, предпочтительно периодическую культуру клеток СНО с подпиткой.

[0099] Во многих случаях клетки будут отобраны или сконструированы для получения высоких уровней необходимых продуктов (например, рекомбинантного белка или антитела). Часто клетками манипулируют для получения высоких уровней рекомбинантного белка, например, путем введения гена, кодирующего белок, представляющий интерес, и/или путем введения генетических контрольных элементов, которые регулируют экспрессию этого гена (эндогенного или введенного).

[00100] Определенные белки могут оказывать неблагоприятное воздействие на рост клеток, жизнеспособность клеток или некоторые другие характеристики клеток, что в конечном итоге каким-то образом ограничивает получение белка, представляющего интерес. Даже среди популяции клеток одного конкретного типа, сконструированных для экспрессии определенного белка, существует изменчивость внутри клеточной популяции, так что определенные отдельные клетки будут расти лучше, продуцировать больше белка, представляющего интерес, или продуцировать белок с более высокими уровнями активности (например, ферментативной активностью). В соответствии с некоторыми аспектами клеточная линия эмпирически отбирается практикующим специалистом для устойчивого роста в конкретных условиях, выбранных для культивирования клеток. В соответствии с некоторыми аспектами отдельные клетки, сконструированные для экспрессии определенного белка, выбирают для крупномасштабного производства на основании роста клеток, конечной плотности клеток, процента жизнеспособности клеток, титра экспрессируемого белка или любой комбинации этих или любых других условий, которые считаются важными практикующим специалистом.

[00101] Любой белок, экспрессируемый в клетке-хозяине, может быть получен в соответствии со способами, описанными в данном документе. Термин «клетка-хозяин», используемый в данном документе, относится к клетке, которой манипулируют для получения белка, представляющего интерес, как описано в данном документе. Белок может экспрессироваться из гена, который является эндогенным для клетки, или из гетерологичного гена, введенного в клетку. Белок может представлять собой белок, который встречается в природе, или в качестве альтернативы может содержать последовательность, которая была сконструирована или выбрана.

[00102] Белки, которые необходимо экспрессировать, часто выбирают на основе представляющей интерес или полезной биологической или химической активности. Например, способы могут быть применены для экспрессии любого фармацевтически или коммерчески значимого фермента, рецептора, антитела, гормона, регуляторного фактора, антигена, связывающего средства и т.д. В соответствии с некоторыми аспектами белок, экспрессируемый клетками в культуре, выбирают из антител или их фрагментов, нанотел, однодоменных антител, гликопротеинов, терапевтических белков, факторов роста, факторов свертывания крови, цитокинов, слитых белков, фармацевтических лекарственных субстанций, вакцин, ферментов или Small Modular ImmunoPharmaceuticals™ (SMIP). Специалисту в данной области техники будет понятно, что любой белок может быть экспрессирован, и он сможет выбрать конкретный белок, который будет продуцирован, исходя из его или ее конкретных потребностей.

[00103] Получение антител представляет особый интерес в соответствии со способами настоящего изобретения. Антитела представляют собой белки, которые характеризуются способностью специфически связываться с определенным антигеном. Может быть получено любое антитело, которое может экспрессироваться в клетке-хозяине. В соответствии с некоторыми аспектами экспрессируемое антитело представляет собой моноклональное антитело.

[00104] В соответствии с некоторыми аспектами моноклональное антитело представляет собой химерное антитело. Химерное антитело содержит аминокислотные фрагменты, полученные более чем из одного организма. Молекулы химерного антитела могут содержать, например, антигенсвязывающий домен антитела мыши, крысы или других видов с константными областями человека.

[00105] В соответствии с некоторыми аспектами моноклональное антитело представляет собой человеческое антитело, полученное, например, за счет использования библиотек рибосомного дисплея или фагового дисплея или использования ксенографических видов, у которых гены нативного антитела инактивированы и функционально заменены генами человеческого антитела, при этом остаются интактными другие компоненты нативной иммунной системы.

[00106] В соответствии с некоторыми аспектами моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Гуманизированное антитело представляет собой химерное антитело, в котором подавляющее большинство аминокислотных остатков получены из человеческих антител, что сводит к минимуму любую потенциальную иммунную реакцию при доставке субъекту-человеку. В

гуманизированных антителах аминокислотные остатки в определяющих комплементарность областях заменены, по меньшей мере частично, остатками из отличных от человека видов, которые придают необходимую антигенную специфичность или аффинность. Такие измененные молекулы иммуноглобулина могут быть получены посредством любой из нескольких методик, известных в данной области техники.

[00107] В соответствии с некоторыми аспектами моноклональные, химерные или гуманизированные антитела, описанные выше, могут содержать аминокислотные остатки, которые не встречаются в природе ни в одном антителе ни у каких видов. Эти чужеродные остатки можно использовать, например, для придания новой или модифицированной специфичности, аффинности или эффекторной функции моноклональному, химерному или гуманизированному антителу. В соответствии с некоторыми аспектами антитела, описанные выше, могут быть конъюгированы с лекарственными средствами для системной фармакотерапии, такими как токсины, низкомолекулярные цитотоксические лекарственные средства, модификаторы биологического ответа и радионуклиды.

[00108] Как правило, молекула нуклеиновой кислоты, введенная в клетку, кодирует белок, который подлежит экспрессии. В качестве альтернативы молекула нуклеиновой кислоты может кодировать генный продукт, который индуцирует экспрессию необходимого белка клеткой. Например, введенный генетический материал может кодировать фактор транскрипции, который активирует транскрипцию эндогенного или гетерологичного белка. В качестве альтернативы или в качестве дополнения введенная молекула нуклеиновой кислоты может повышать трансляцию или стабильность белка, экспрессируемого клеткой. Способы, подходящие для введения нуклеиновых кислот в количестве, достаточном для достижения экспрессии белка, представляющего интерес, в клетки-хозяева млекопитающих, известны из уровня техники. Для клеток млекопитающих обычные способы введения генетического материала в клетки млекопитающих включают способ преципитации фосфатом кальция или способ с применением Lipofectamine™.

[00109] В соответствии с некоторыми аспектами вводимая нуклеиновая кислота находится в форме «голой» молекулы нуклеиновой кислоты. Например, молекула нуклеиновой кислоты, введенная в клетку, может состоять только из нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, и необходимых генетических контрольных элементов. В качестве альтернативы нуклеиновая кислота, кодирующая белок (включая необходимые регуляторные элементы), может содержаться в плазмидном векторе. Неограничивающие

типичные примеры подходящих векторов для экспрессии белков в клетках млекопитающих включают pCDNA1; pCD; pMCIneo Poly-A; бакуловирусный вектор, такой как pAC 373 или pAC 610; CDM8; и pMT2PC. В соответствии с некоторыми аспектами молекула нуклеиновой кислоты, подлежащая введению в клетку, содержится в вирусном векторе. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая белок, может быть встроена в вирусный геном (или частичный вирусный геном). Регуляторные элементы, управляющие экспрессией белка, могут быть включены в нуклеиновую кислоту, вставленную в вирусный геном (т.е. связаны с геном, вставленным в вирусный геном), или могут быть обеспечены самим вирусным геномом.

[00110] «Голую» ДНК можно вводить в клетки путем образования осадка, содержащего ДНК и фосфат кальция. В качестве альтернативы «голая» ДНК также может быть введена в клетки путем образования смеси ДНК и DEAE-декстран и инкубации смеси с клетками или путем совместной инкубации клеток и ДНК в соответствующем буфере и воздействия на клетки высоковольтным электрическим импульсом (например, с помощью электропорации). Дополнительный способ введения клеток с «голой» ДНК заключается в смешивании ДНК с суспензией липосом, содержащей катионные липиды. Затем комплекс ДНК/липосома инкубируют с клетками. «Голую» ДНК также можно напрямую вводить в клетки, например, с помощью микроинъекции. В качестве альтернативы «голая» ДНК также может быть введена в клетки путем комплексообразования ДНК с катионом, таким как полилизин, который связан с лигандом для рецептора клеточной поверхности. Связывание комплекса ДНК-лиганд с рецептором облегчает поглощение ДНК посредством эндоцитоза, опосредованного рецептором.

[00111] Дефектные ретровирусы хорошо охарактеризованы для применения в переносе генов для целей генной терапии. Можно сконструировать рекомбинантный ретровирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, представляющий интерес, встроенную в ретровирусный геном. Кроме того, части ретровирусного генома могут быть удалены, чтобы сделать репликацию ретровируса дефектной. Такой дефектный по репликации ретровирус затем упаковывают в вирионы, которые можно использовать для инфицирования целевой клетки с помощью хелперного вируса стандартными методиками. Например, с геномом аденовируса можно манипулировать таким образом, чтобы он кодировал и экспрессировал белок, представляющий интерес, но был инактивирован с точки зрения его способности к репликации в нормальном жизненном цикле литического вируса. Иллюстративные аденовирусные векторы, полученные из штамма аденовируса Ad типа 5 d1324 или других штаммов аденовируса

(например, Ad2, Ad3, Ad7 и т. д.), известны специалистам в данной области техники. Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой встречающийся в природе дефектный вирус, которому требуется другой вирус, такой как аденовирус или вирус герпеса, в качестве хелперного вируса для эффективной репликации и продуктивного жизненного цикла.

[00112] Когда способ, применяемый для введения молекул нуклеиновой кислоты в популяцию клеток, приводит к модификации большей части клеток и эффективной экспрессии белка клетками, модифицированную популяцию клеток можно использовать без дальнейшего выделения или субклонирования отдельных клеток внутри популяции. Иными словами может иметь место достаточное продуцирование белка популяцией клеток, так что дальнейшее выделение клеток не требуется, и популяция может быть немедленно использована для посева клеточной культуры для продуцирования белка. В качестве альтернативы может быть желательно выделять и экспандировать гомогенную популяцию клеток из нескольких клеток или одной клетки, которые эффективно продуцируют белок.

[00113] В качестве альтернативы введению в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представляющий интерес, введенная нуклеиновая кислота может кодировать другой полипептид или белок, который индуцирует или повышает уровень экспрессии белка, эндогенно продуцируемого клеткой. Например, клетка может быть способна экспрессировать конкретный белок, но не может этого осуществлять без дополнительной обработки клетки. Точно так же клетка может экспрессировать недостаточное количество белка для необходимой цели. Таким образом, средство, которое стимулирует экспрессию белка, представляющего интерес, может быть использовано для индукции или повышения экспрессии этого белка клеткой. Например, введенная молекула нуклеиновой кислоты может кодировать фактор транскрипции, который активирует или усиливает транскрипцию белка, представляющего интерес. Экспрессия такого фактора транскрипции, в свою очередь, приводит к экспрессии или более сильной экспрессии белка, представляющего интерес.

[00114] Как правило, желательно выделять и/или очищать рекомбинантные белки, генные продукты или клеточные продукты, экспрессированные в соответствии со способами, описанными в данном документе. В соответствии с определенными аспектами экспрессируемый белок секретируется в среду, и, таким образом, клетки и другие твердые вещества могут быть удалены, например, путем центрифугирования или фильтрации в качестве первой стадии процесса очистки.

[00115] В качестве альтернативы экспрессируемый белок может быть связан с поверхностью клетки-хозяина. Например, среда может быть удалена, а клетки-хозяева, экспрессирующие белок, подвергнуты лизису в качестве первой стадии процесса очистки. Лизис клеток-хозяев млекопитающих может быть достигнут любым количеством средств, хорошо известных специалистам в данной области техники, включая физическое разрушение стеклянными гранулами и воздействие в условиях высокого pH.

[00116] Экспрессируемый белок может быть выделен и очищен стандартными способами, включая без ограничения хроматографию (например, ионообменную, аффинную, эксклюзионную хроматографию и хроматографию на гидроксипатите), гель-фильтрацию, центрифугирование или дифференциальную растворимость, осаждение этанолом и/или посредством любой другой доступной методики очистки белка.

[00117] В соответствии с определенными аспектами полученные полипептиды или белки будут характеризоваться фармакологической активностью и будут пригодны при получении фармацевтических средств. Белки и пептиды могут быть приготовлены для доставки любым доступным путем, включая без ограничения парентеральный (например, внутривенный), внутрикожный, подкожный, пероральный, назальный, бронхиальный, офтальмологический, чрескожный (местный), трансмукозальный, ректальный и вагинальный пути. Фармацевтические композиции обычно включают очищенный полипептид или белок, экспрессируемый из клеточной линии млекопитающих, средство доставки в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

[00118] Настоящее изобретение далее иллюстрируется следующими неограничивающими примерами.

## **ПРИМЕРЫ**

Пример 1: Идентификация ингибитора

[00119] Для скрининга всего метаболома СНО применяли масс-спектроскопию с колонкой для жидкостной хроматографии HILIC Orbitrap<sup>TM</sup> (LC-MS). Анализировали 30000 признаков, а в культуре клеток накапливали более 1000 признаков. Ингибирующее воздействие 20 наиболее эффективных признаков тестировали аналитически и

биологически. В Табл. 1 представлены метаболиты, структурно подтвержденные LC-MS. Конечную концентрацию культуры измеряли также с применением LC-MS другим способом.

Таблица 1: Структурно подтвержденные метаболиты с их конечной концентрацией культурального супернатанта.

| Проверенные метаболиты |                                  | MS2        | Эксп.               | m/z               | RT    | Подтвержденные |
|------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-------------------|-------|----------------|
| 6                      | Индол-3-карбоновая кислота (ICA) | 0,9300     | Отрицат.            | 160,0393          | 2,2   | 2,5            |
| 8                      | Метилантарная кислота (MSA)      | 0,8900     |                     | 131,0339          | 3,11  | 13,59          |
| 10                     | Аконитовая кислота (AA)          | 0,7100     | Отрицат.            | 173,0081          | 4,55  | 14359          |
| 25                     | Лейциновая кислота (HICA)        | 0,62       | Отрицат.            | 131,0703          | 2,26  | 64,09          |
| 1                      | Тригонеллин (TRI)                | 0,6800     | Положит.            | 138,0550          | 12,9  | 0,812          |
| 3                      | N-ацетилпутресцин (NAP)          | 0,9400     | Положит.            | 131,1179          | 15,34 | 0,196          |
| 4                      | Цитидинмонофосфат (CMP)          | 1; 0,87    | Положит. (отрицат.) | 324,0591;322,0435 | 18,45 | 11,27          |
| 5                      | Гуанозинмонофосфат (GMP)         | 0,99; 0,87 | Положит. (отрицат.) | 364,0653;362,0496 | 18,29 | 20             |

Пример 2: Стандартные биопроцессы и биологическое подтверждение метаболитов

[00120] Промышленный стандартный периодический процесс для CHO K-1: линию клеток NIH CHO-K1 культивировали в течение 6 дней с добавлением 6 мМ глутамин в день инокуляции. Рабочий объем составлял 30 мл во встряхиваемых колбах объемом на 125 мл, а плотность инокуляционных клеток составляла 0,5 миллион клеток/мл. Параметры для встряхивающего инкубатора: 125 об./мин. и 5% CO<sub>2</sub>.

[00121] Стандартный промышленный периодический процесс для CHO GS: линию клеток CHOZn® культивировали в течение 6 дней. Рабочий объем составлял 30 мл во встряхиваемых колбах объемом на 125 мл, а плотность инокуляционных клеток составляла 0,5 миллион клеток/мл. Параметры для встряхивающего инкубатора: 125 об./мин. и 5% CO<sub>2</sub>.

[00122] Промышленный стандартный периодический процесс для НЕК 293: линию клеток MBL НЕК 293 культивировали в течение 6 дней. Рабочий объем составлял 30 мл во встряхиваемых колбах объемом на 125 мл, а плотность инокуляционных клеток составляла 0,5 миллиона клеток/мл с добавлением 6 мМ глутамин в день инокуляции. Параметры для встряхивающего инкубатора: 125 об./мин. и 5% CO<sub>2</sub>.

[00123] Клетки подвергали воздействию идентифицированных ингибирующих метаболитов из Табл. 1 при их концентрации в конце культивирования в течение 6 дней при культивировании с подпиткой. AA, ICA, CMP и условие смеси продемонстрировали более низкую плотность клеток, чем в контрольной группе (Фиг. 3). Все ингибирующие метаболиты снижали продуцирование антител (Фиг. 4).

[00124] Промышленный стандартный процесс с периодической подпиткой: линию клеток СНО-К1 культивируют в соответствующих средах. В питательную среду в течение 14 дней добавляли 6 мМ глутамин в день инокуляции. Рабочий объем составлял 30 мл во встряхиваемых колбах объемом на 125 мл, а плотность инокуляционных клеток составляла 0,5 миллион клеток/мл. Параметры для встряхивающего инкубатора: 125 об./мин. и 5% CO<sub>2</sub>. Стратегия подкормки: 10% соответствующая питательная среда каждый день, начиная с дня 3 по день 13.

[00125] В стандартном промышленном периодическом процессе с подпиткой клетки подвергали воздействию ингибиторов в течение длительного периода времени. Этот эксперимент имитировал процесс производства терапевтических антител и повышал концентрацию ингибиторов в конце их концентрации в клеточной культуре. Было подтверждено, что ICA является известным ингибитором, и его использовали в качестве положительного контроля ингибитора. Условия смеси исключали ICA и включали AA, HICA, CMP, MSA, TRI, NAP. Процесс длился в течение 14 дней, и, начиная с дня 6, плотность клеток в условиях ингибитора была ниже, чем в партии отрицательного контроля. Результаты показаны на Фиг. 3. По сравнению с контрольной партией CMP, ICA, TRI и HICA продемонстрировали более сильное ингибирующее влияние на рост, что привело к падению VCD на 40-50% на пике VCD в день 9.

Пример 3 демонстрирует влияние метаболитов на продуктивность и качество.

[00126] Титр IgG измеряли посредством HPLC с колонкой с белком А. Качество продукта количественно оценивали по гликановому профилю IgG, который измеряли посредством HPLC с гликановой колонкой.

[00127] Все 7 метаболитов продемонстрировали ингибирующее влияние на продуктивность и качество продукта. HICA, CMP, ICA и TRI продемонстрировали сильное ингибирование продуктивности, которое составляет более 30% снижение продуктивности по сравнению с контролем (Фиг. 4). Качество продукта является критическим параметром для одобрения биопроцесса и лекарственного средства, где гликановый профиль является одним из наиболее важных критических атрибутов качества (CQA). AA, HICA, CMP, MSA и ICA продемонстрировали более сильное влияние на образование G1F (Фиг.5), и AA полностью ингибировала образование G2F, а все остальные 6 ингибиторов значительно влияли на образование G2F (Фиг. 6). Эксперименты методом добавок в двух повторностях продемонстрировали, что воздействие на гликановый профиль является стабильным (Фиг. 7, 8 и 9).

#### Выводы

[00128] Более 30000 признаков фиксировали в ходе исследования метаболомики с применением LC-MS, описанного в данном документе, и путем многомерного анализа данных и анализа путей выбирали 20 наиболее эффективных кандидатов в ингибиторы с высокой степенью достоверности в отношении совпадения идентификации. Кандидатов с высоким рангом экспериментально проверяли методом добавления их в периодическую культуру, и среди них 11 из 15 продемонстрировали ингибирующее влияние на рост клеток. Восемь побочных продуктов метаболизма проверяли структурно и биологически. Среди них шесть метаболитов представляли собой новые ингибирующие побочные продукты клеточного роста и/или продуцирования, а 4 из них представляли собой впервые идентифицированные метаболиты CHO (см. Табл. 2).

Таблица 2: AA, HICA, CMP, GMP, MSA, ICA, TRI и NAP идентифицировали в качестве ингибиторов для способа с клетками CHO в настоящем исследовании. О GMP и ICA сообщали в качестве ингибитора клеточной культуры CHO в публикациях/патентах, а остальные 6 метаболитов были заявлены нами. TRI, NAP, AA и MSA были впервые идентифицированы в качестве метаболитов клеток CHO.

| Идентификатор метаболита | Конц. (мкМ) | Путь           | Заявленный ингибитор |
|--------------------------|-------------|----------------|----------------------|
| AA                       | 14359       | Цитратный цикл | Нет                  |
| HICA                     | 64,09       | Лейцин         | Нет                  |
| CMP                      | 11,27       | Пиримидин      | Нет                  |

|     |       |                  |     |
|-----|-------|------------------|-----|
| GMP | 20    | Пурин            | Да  |
| MSA | 13,59 | Изолейцин        | Нет |
| ICA | 2,5   | Триптофан        | Да  |
| TRI | 0,812 | NADPH            | Нет |
| NAP | 0,196 | Аргинин и пролин | Нет |

Пример 4: Накопление ингибирующих метаболитов в периодической культуре с подпиткой

[00129] Условия процесса с периодической подпиткой были такими же, как и для промышленного стандартного процесса с периодической подпиткой для CHO K-1 в Примере 2. Условия периодического процесса были такими же, как и у промышленного стандартного периодического процесса CHO K-1 в Примере 2.

[00130] Метаболиты идентифицировали с помощью LC-ESI-MS. В Табл. 3 показаны идентифицированные ингибирующие метаболиты, накопленные в процессе, и их накопление через 6 дней в периодическом процессе и через 5, 8 и 14 дней в периодическом процессе с подпиткой.

Таблица 3: Накопление ингибирующих метаболитов в периодических процессах и периодической процессах с подпиткой

| CHO K1                            | День      | AA<br>мкМ | HICA<br>мкМ | MSA<br>мкМ | GMP<br>мкМ | TRI<br>мкМ | NAP<br>мкМ |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Партия</b>                     | <b>6</b>  | 1910      | 10,62       | 3,97       | 11,69      | 0,085      | 0,164      |
| <b>Периодическая<br/>подпитка</b> | <b>5</b>  | 1238      | 8,53        | 1,3        | 1,14       | 0,018      | 0,096      |
|                                   | <b>8</b>  | 4026      | 26,95       | 5,62       | 5,82       | 0,132      | 0,178      |
|                                   | <b>14</b> | 14359     | 64,09       | 13,59      | 11,27      | 0,812      | 0,196      |

[00131] В этом примере показаны концентрации ингибитора в периодической культуре и периодической культуре с подпиткой. Можно сделать вывод, что ингибирующие метаболиты накапливаются в основном биопроцессе.

Пример 5: Накопление ингибирующих метаболитов в CHO K1, CHO GS и HEK 293 в периодической культуре

[00132] Условия периодического процесса были такими же, как и для промышленного стандартного периодического процесса CHO K-1, CHO GS и HEK 293 в Примере 2. Метаболиты идентифицировали с помощью LC-ESI-MS. В Табл. 4 показаны

идентифицированные ингибирующие метаболиты, накопленные в процессе, и их накопление через 6 дней в периодическом процессе. В Табл. 4 показано, что шесть ингибирующих метаболитов существуют в различных линиях клеточных культур млекопитающих и накапливаются в периодической культуре.

Таблица 4: Накопление ингибирующих метаболитов в CHO K1, CHO GS и HEK 293 в периодической культуре

| <b>Конц.<br/>(мкМ)</b> | <b>AA</b> | <b>HICA</b> | <b>MSA</b> | <b>СMP</b> | <b>TRI</b> | <b>NAP</b> |
|------------------------|-----------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>CHO K1</b>          | 1910,00   | 10,62       | 3,97       | 11,69      | 0,09       | 0,16       |
| <b>CHO GS</b>          | 717,42    | 31,63       | 2,59       | 78,51      | 0,81       | 0,20       |
| <b>HEK 293</b>         | 984,53    | 53,80       | 1,55       | 2,43       | 0,02       | 0,17       |

[00133] На основе накопления в конце периодического культивирования можно сделать вывод, что ингибирующие метаболиты широко распространены в клеточных линиях млекопитающих.

Пример 6: Разработка способа для снижения накопления ингибирующих метаболитов

[00134] Трансфекция регуляторных генов для продуцирования ингибирующих метаболитов в клеточную линию CHO K1 в периодической культуре снижает рост ингибирующих метаболитов.

[00135] Целью трансфекции является сверхэкспрессия регуляторных генов/ферментов для ингибирующих метаболитов. Гены, кодируемые нижерасположенными ферментами, встраивали в клеточную линию CHO посредством сконструированных плазмид с *Got1*, *Hogal*, *Cat*, *Slc35a1* на векторе pcDNA 3.1 (+) (V79020, ThermoFisher Scientific). Плазмиду амплифицировали с использованием 5-альфа-компетентной *E. coli* (C2987I, New England BioLabs). Полиэтиленимин (408727, Millipore Sigma) использовали для трансфекции плазмид в клеточные линии млекопитающих для снижения концентрации ингибирующих метаболитов путем сверхэкспрессии регуляторных генов для ингибирующих метаболитов. Трансфекцию проводили так же, как промышленный стандартный периодический процесс CHO K1, за исключением того, что начальная плотность инокуляционных клеток составляла 1 миллион клеток/мл.

[00136] В Табл. 5 и на Фиг. 11 контроль указывает на контрольное состояние культуры клеток с подпиткой CHO K1 без трансфекции какого-либо гена; T1 указывает на

профиль роста клеток с *Got1*, трансфицированным в клеточную линию СНО К1; Т2 указывает на трансфекцию *Got1* и *Hoga1*; и Т3 указывает на трансфекцию *Got1*, *Hoga1*, *Cat* и *Slc35a1*. Как показано в Табл. 5 и на Фиг. 11, по сравнению с контрольной клеточной культурой, концентрация всех ингибирующих метаболитов снижалась при сверхэкспрессии генов регуляции ингибирующих метаболитов в клеточной линии СНО К1, а профиль роста улучшался.

Таблица 5: Трансфекция генов регуляции ингибирующих метаболитов в клеточную линию СНО К1 в периодической культуре.

| Клоны           | Дни<br>культивирования | AA<br>мкМ | HICA<br>мкМ | MSA<br>мкМ | СMP<br>мкМ | TRI<br>мкМ | NAP<br>мкМ |
|-----------------|------------------------|-----------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Контроль</b> | <b>1</b>               | 0,000     | 0,000       | 0,007      | 0,000      | 0,006      | 0,044      |
| <b>Т3</b>       | <b>1</b>               | 0,000     | 0,000       | 0,010      | 0,000      | 0,004      | 0,000      |
| <b>Контроль</b> | <b>3</b>               | 1026,918  | 10,696      | 0,865      | 1,720      | 0,021      | 0,158      |
| <b>Т2</b>       | <b>3</b>               | 984,457   | 3,826       | 0,619      | 1,692      | 0,019      | 0,178      |
| <b>Т3</b>       | <b>3</b>               | 874,268   | 2,786       | 0,405      | 0,978      | 0,001      | 0,072      |
| <b>Контроль</b> | <b>5</b>               | 1910,126  | 10,686      | 3,966      | 11,687     | 0,044      | 0,165      |
| <b>Т2</b>       | <b>5</b>               | 1868,026  | 9,951       | 2,868      | 9,433      | 0,042      | 0,129      |
| <b>Т3</b>       | <b>5</b>               | 1277,005  | 9,173       | 2,296      | 5,005      | 0,030      | 0,113      |

[00137] На основе этих данных можно сделать вывод, что концентрация ингибитора снижалась после трансфекции генов регуляции ингибирующих метаболитов в клеточную линию СНО.

[00138] Использование терминов в единственном числе (особенно в контексте следующей далее формулы изобретения) подразумевает включение единственного и множественного числа, если в данном документе не указано иное или явно не противоречит контексту. Термины «первый», «второй» и т.д., используемые в данном документе, не предназначены для обозначения какого-либо конкретного порядка, а просто для удобства обозначают множество, например, слоев. Термины «содержащий», «имеющий», «включающий в себя» и «включающий» рассматриваются в виде открытых терминов (т.е., означающих «включающий в себя без ограничения»), если не указано иное. Предполагается, что перечисление диапазонов значений будет использоваться

только в виде сокращенного способа отдельного упоминания каждого отдельного значения, входящего в диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание так, как если бы оно было отдельно упомянуто в данном документе. Конечные точки всех диапазонов включены в диапазон и могут комбинироваться независимо друг от друга. Все способы, описанные в данном документе, можно выполнять в подходящем порядке, если не указано иное или иным образом не находится в противоречии с контекстом. Применение любых и всех примеров или иллюстративного стиля (например, «такой как»), предусматривает лишь более эффективное описание настоящего изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения, если не указано иное. Никакой стиль в настоящем описании не следует воспринимать как указывающий на какой-либо не заявленный элемент в качестве необходимого для целей практического осуществления настоящего изобретения, как используется в данном документе.

[00139] Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на иллюстративный вариант осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что могут быть внесены различные изменения, а эквиваленты могут быть заменены их элементами без отклонения за пределы объема настоящего изобретения. Кроме того, можно выполнять много модификаций для адаптации конкретной ситуации или материала к идее настоящего изобретения, не выходя за рамки его необходимого объема. Таким образом, предполагается, что настоящее изобретение не ограничено определенным вариантом осуществления, раскрытым в качестве лучшего предполагаемого варианта выполнения настоящего изобретения, а настоящее изобретение будет включать все варианты осуществления в объеме прилагаемой формулы изобретения. Любая комбинация вышеописанных элементов во всех их возможных вариациях охватывается настоящим изобретением, если в данном документе не указано иное или иным образом явно не противоречит контексту.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ культивирования клеток, включающий

(i) культивирование клеток в среде для культивирования клеток, и

(ii) поддержание по меньшей мере одного метаболита, выбранного из аконитовой кислоты (AA), лейциновой кислоты (HICA), цитидинмонофосфата (CMP), метилантарной кислоты (MSA), тригонеллина (TRI) и N-ацетилпутресцина (NAP) ниже ингибирующей концентрации в среде для культивирования клеток в отношении по меньшей мере одного метаболита.

2. Способ по п. 1,

где метаболит представляет собой AA, а ингибирующая концентрация составляет менее 100 мкМ, 440 мкМ, 880 мкМ, 3 мМ, 5 мМ или 10 мМ,

где метаболит представляет собой HICA, а ингибирующая концентрация составляет менее 10 мкМ, 23,5 мкМ, 47 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ,

где метаболит представляет собой CMP, а ингибирующая концентрация составляет 5 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ или 1 мМ,

где метаболит представляет собой MSA, а ингибирующая концентрация составляет менее 1 мкМ, 3,75 мкМ, 7,5 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ,

где метаболит представляет собой TRI, а ингибирующая концентрация составляет менее 0,1 мкМ, 0,35 мкМ, 0,7 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ, или

где метаболит представляет собой NAP, а ингибирующая концентрация составляет менее 0,1 мкМ, 0,3 мкМ, 0,6 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или 3 мМ.

3. Способ по п. 1, где концентрацию по меньшей мере одного метаболита измеряют с применением спектроскопии на основе ядерного магнитного резонанса (NMR), рамановской спектроскопии, высокоэффективной/ультраэффективной жидкостной хроматографии (H/UPLC), жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS), газовой хроматографии-масс-спектрометрии (GC-MS) или их комбинации.

4. Способ по п. 1, где стадия ii) включает измерение концентрации по меньшей мере одного метаболита, и, когда измеренная концентрация по меньшей мере одного метаболита превышает предварительно определенное значение, концентрацию предшественника по меньшей мере одного метаболита в среде для культивирования клеток снижают за счет уменьшения количества предшественника, поступающего в клетки.

5. Способ по п. 4, где

метаболит представляет собой AA, предшественник представляет собой глутамин, глюкозу, аргинин, аспарагин или их комбинацию;

метаболит представляет собой HICA, предшественник представляет собой лейцин, изолейцин или их комбинацию;

метаболит представляет собой CMP, предшественник представляет собой глутамин, аргинин, аспартат или их комбинацию;

метаболит представляет собой MSA, предшественник представляет собой лизин, изолейцин, серин, глюкозу, глутамин или их комбинацию;

метаболит представляет собой TRI, предшественник представляет собой аспартат, триптофан, глутамин или их комбинацию;

метаболит представляет собой NAP, предшественник представляет собой аргинин, пролин, аспартат, глутамин, аспарагин или их комбинацию; или их комбинацию.

6. Способ по п. 1, где стадия ii) включает измерение концентрации по меньшей мере одного метаболита, и, когда измеренная концентрация по меньшей мере одного метаболита превышает предварительно определенное значение, регулирование экспрессии фермента для снижения синтеза метаболита.

7. Способ по п. 6,

где метаболит представляет собой AA, а фермент представляет собой ADI1, HOGA1, TAD1 или их комбинацию;

где метаболит представляет собой HICA, а фермент представляет собой GOT1, D-HicDH, MMUT, AUN, HMGCL, HADHA/B или их комбинацию;

где метаболит представляет собой CMP, а фермент представляет собой UCK1/2, NT5, CMAS, CMPK1, DDYD, CDA, SLC35A1, RRM1, HOGA1 или их комбинацию;

где метаболит представляет собой MSA, а фермент представляет собой GOT1, ETHE1, AMT, HADHA/B, MMUT или их комбинацию;

где метаболит представляет собой TRI, а фермент представляет собой NADSYN1, NNMT, CAT, NMNAT1, SULT4A1 или их комбинацию;

где метаболит представляет собой NAP, а фермент представляет собой SAT1/2, HOGA1, AMD1, ODC1, GOT1, MAOB или их комбинацию; или их комбинацию.

8. Способ по п. 6, где регулирование экспрессии фермента для снижения синтеза метаболита предусматривает добавление ингибирующей нуклеиновой кислоты, которая ингибирует экспрессию гена, кодирующего фермент.

9. Способ по п. 6, где регулирование экспрессии фермента для снижения синтеза метаболита предусматривает добавление молекулы рекомбинантной ДНК для сверхэкспрессии регулирующего фермента, при этом регулирующий фермент представляет собой нижерасположенный фермент.

10. Способ по п. 1, где стадия ii) включает измерение концентрации по меньшей мере одного метаболита, и, когда измеренная концентрация по меньшей мере одного метаболита превышает предварительно определенное значение, регулирование активности фермента для снижения синтеза метаболита.

11. Способ по п. 10,

где метаболит представляет собой AA, а фермент представляет собой ADI1, HOGA1, TAD1 или их комбинацию;

где метаболит представляет собой HICA, а фермент представляет собой D-HicDH, MMUT, AUN, HMGCL, NADHA/B или их комбинацию;

где метаболит представляет собой CMP, а фермент представляет собой UCK1/2, NT5, CMAS, CMPK1, DDYD, CDA, SLC35A1, RRM1, HOGA1 или их комбинацию;

где метаболит представляет собой MSA, а фермент представляет собой ETHE1, AMT, NADHA/B, MMUT или их комбинацию;

где метаболит представляет собой TRI, а фермент представляет собой NADSYN1, NNMT, CAT, NMNAT1, SULT4A1 или их комбинацию;

где метаболит представляет собой NAP, а фермент представляет собой SAT1/2, HOGA1, AMD1, ODC1, GOT1, MAOB или их комбинацию; или их комбинацию.

12. Способ по п. 10, где регулирование активности фермента для снижения синтеза метаболита предусматривает добавление в культуру ингибитора активности фермента.

13. Способ по п. 10, где регулирование активности фермента для снижения синтеза метаболита предусматривает добавление в культуру активатора гликолитического пути.

14. Способ по п. 1, где поддержание по меньшей мере одного метаболита ниже ингибирующей концентрации в среде для культивирования клеток в отношении по меньшей мере одного метаболита предусматривает контроль температуры, уровня растворенного кислорода, pH или их комбинации.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, где клетки представляют собой клетки CHO, клетки НЕК 293, клетки HT-1080, сконструированные Т-клетки или сконструированные естественные клетки-киллеры.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, где культура клеток представляет собой периодическую культуру, периодическую культуру с подпиткой или перфузионную культуру.

17. Способ по любому из предыдущих пунктов, где клетки экспрессируют рекомбинантный белок, генный продукт или клеточный продукт.

18. Способ по п. 17, дополнительно включающий получение и очистку рекомбинантного белка, генного продукта или клеточного продукта.

19. Способ по п. 17, где рекомбинантный белок представляет собой моноклональное антитело.

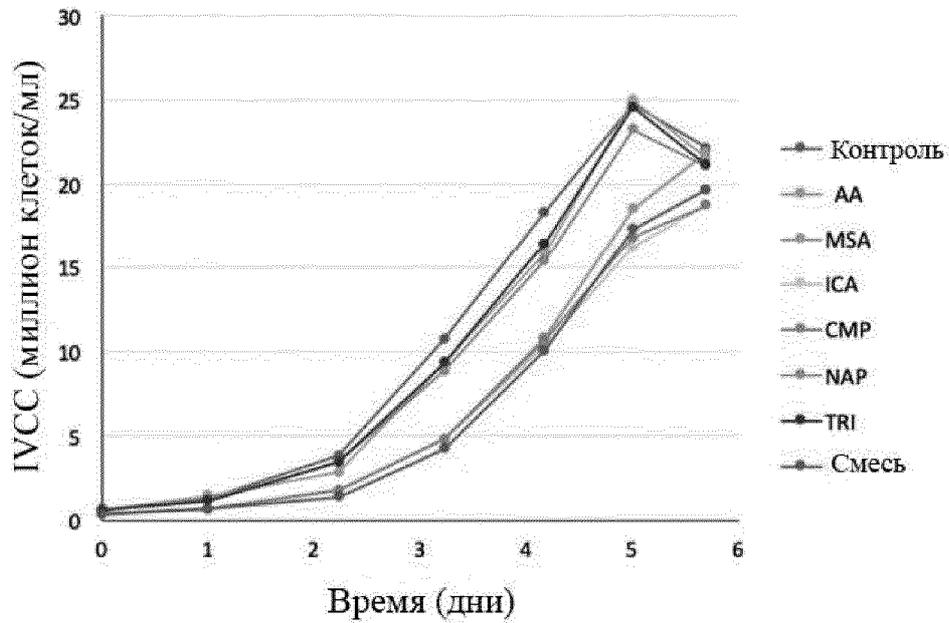
20. Способ по любому из предыдущих пунктов, где рост и/или продуктивность клеток повышены по сравнению с контрольной культурой, при этом контрольная культура идентична культуре по п. 1, за исключением того, что ее не культивируют с использованием стадии (ii).

21. Способ по п. 20, где рост клеток определяется максимальной плотностью жизнеспособных клеток и повышается на по меньшей мере 5% по сравнению с контрольной культурой.

22. Способ по любому из предыдущих пунктов, где максимальная плотность клеток клеточной культуры составляет более  $1 \times 10^6$  клеток/мл,  $5 \times 10^6$  клеток/мл,  $1 \times 10^7$  клеток/мл,  $5 \times 10^7$  клеток/мл,  $1 \times 10^8$  клеток/мл или  $5 \times 10^8$  клеток/мл.

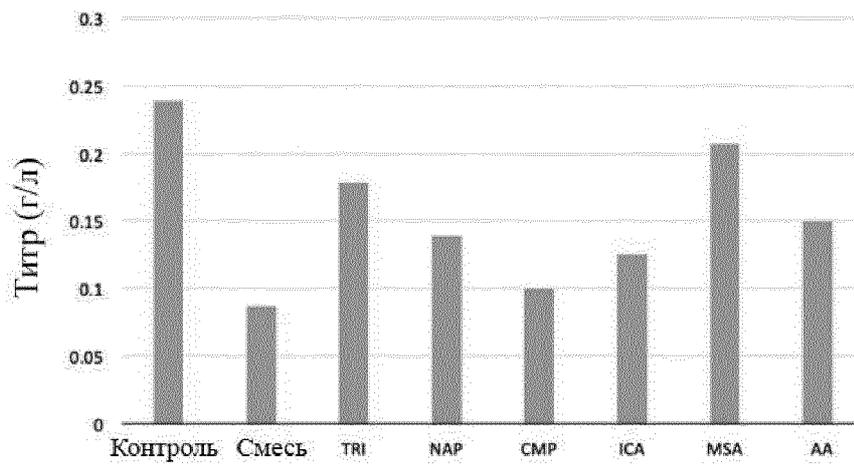
23. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ культивирования клеток включает фазу роста и фазу продуцирования, а стадию (ii) применяют во время фазы роста.

Периодическая культура  
(интегрированное содержание жизнеспособных клеток)



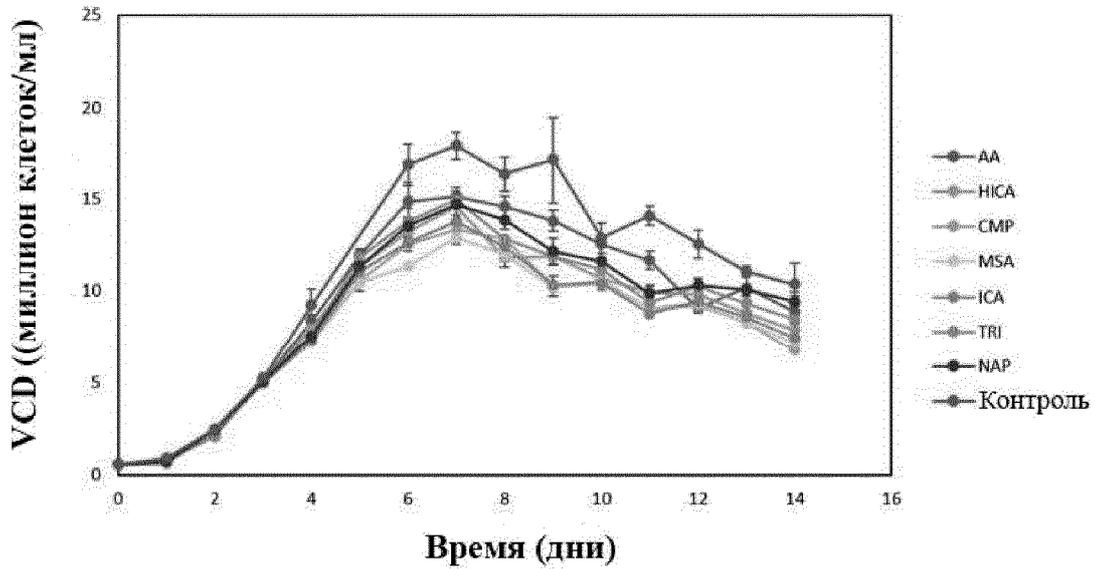
Фиг. 1

Периодическая культура (титр)



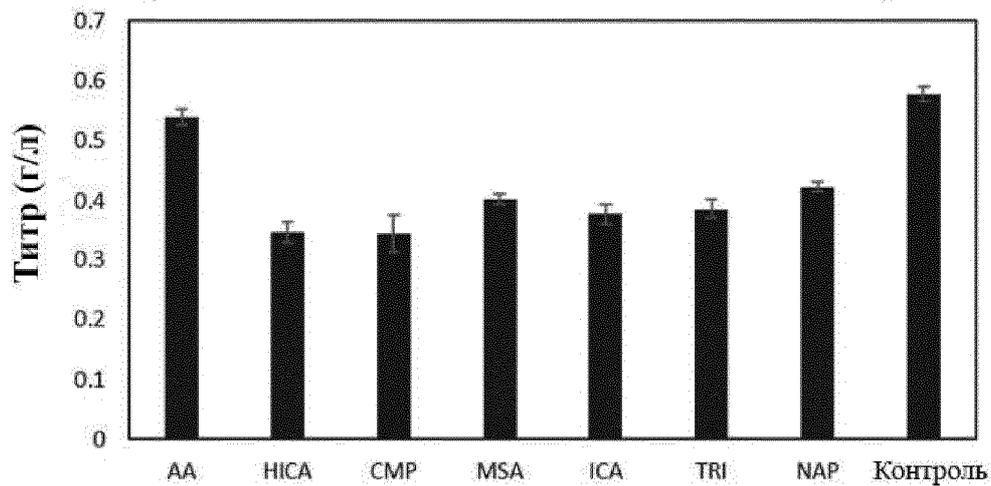
Фиг. 2

Тест методом добавок с подпиткой  
(плотность жизнеспособных клеток)



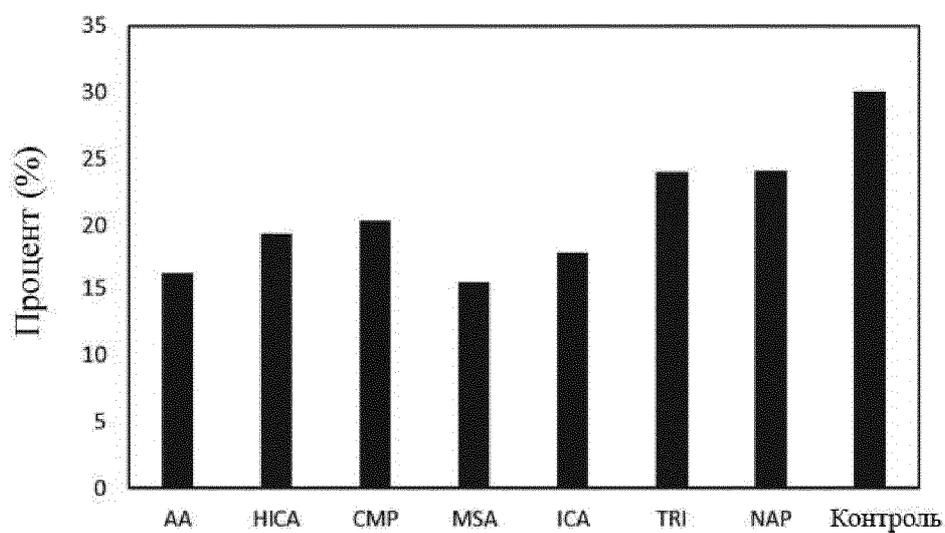
Фиг. 3

Тест методом добавок с подпиткой  
(плотность жизнеспособных клеток)



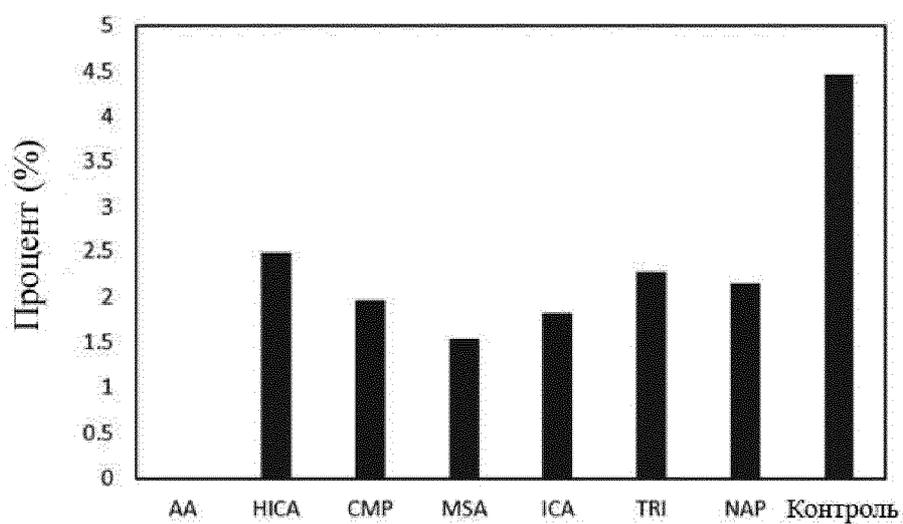
Фиг. 4

## Профиль гликозилирования (G1F)

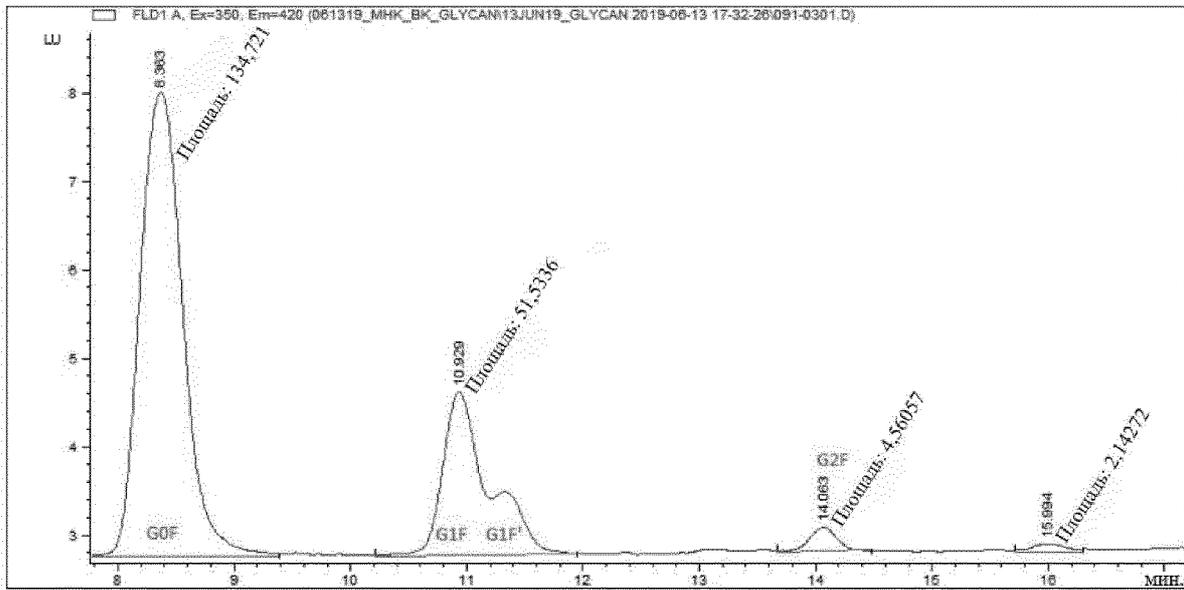


Фиг. 5

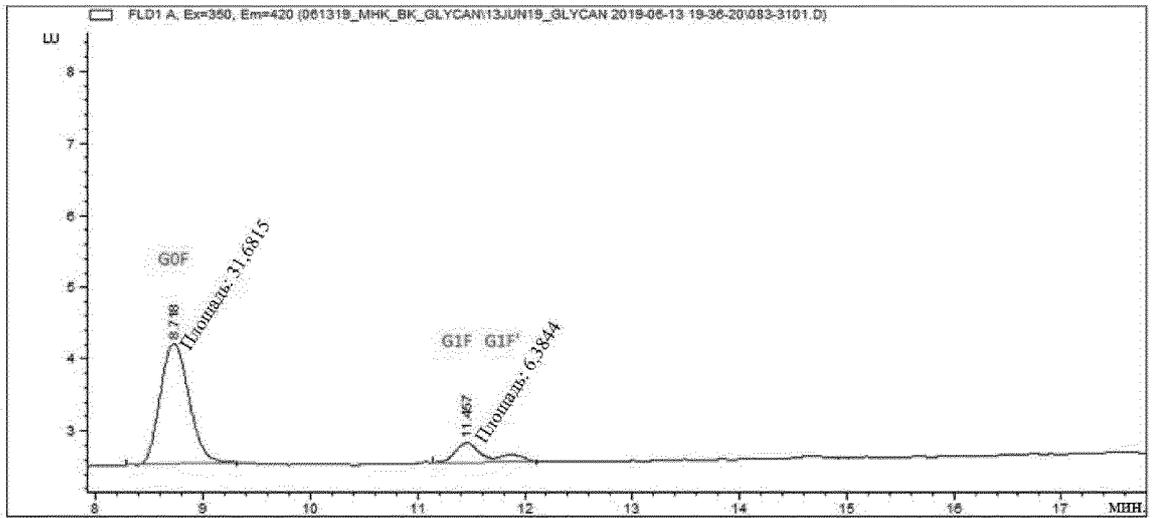
## Профиль гликозилирования (G2F)



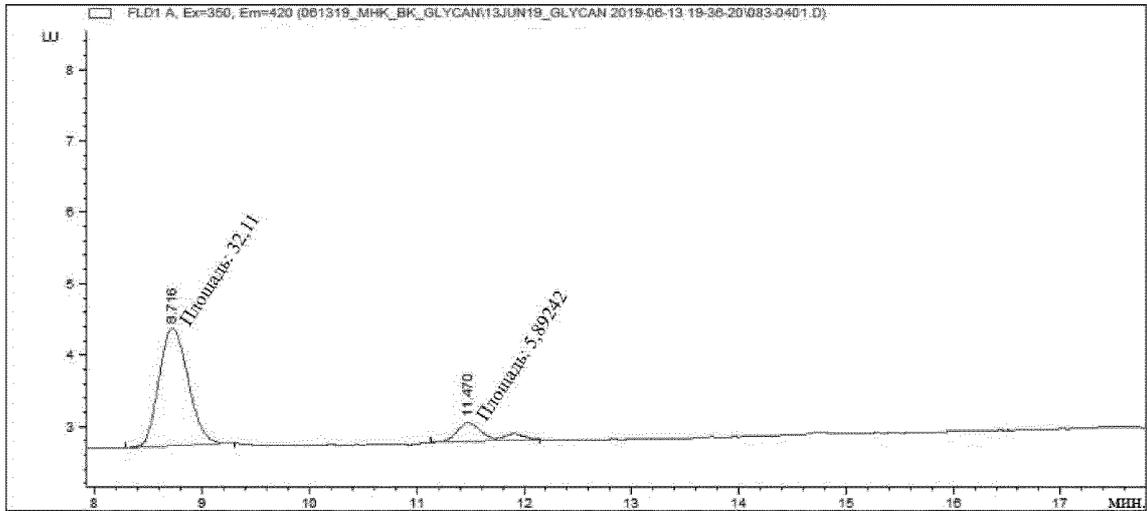
Фиг. 6



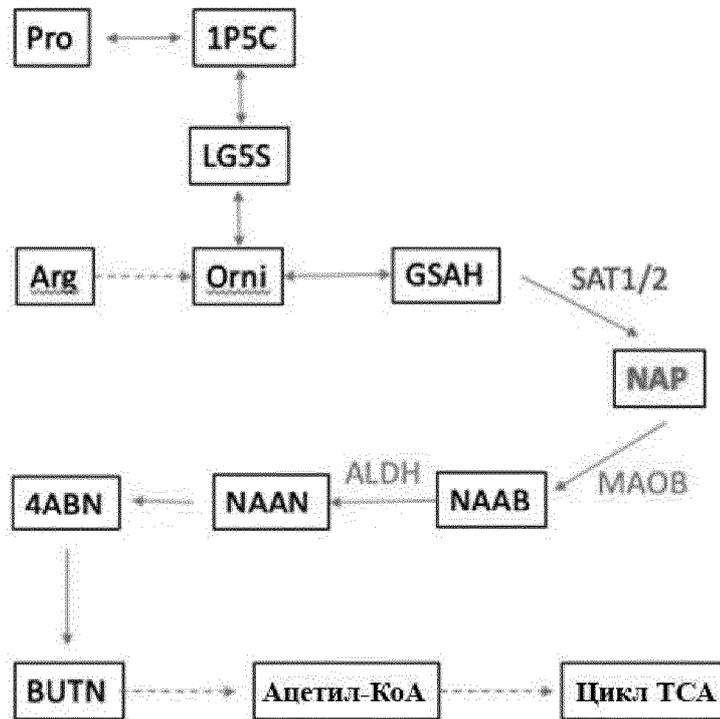
Фиг. 7



Фиг. 8

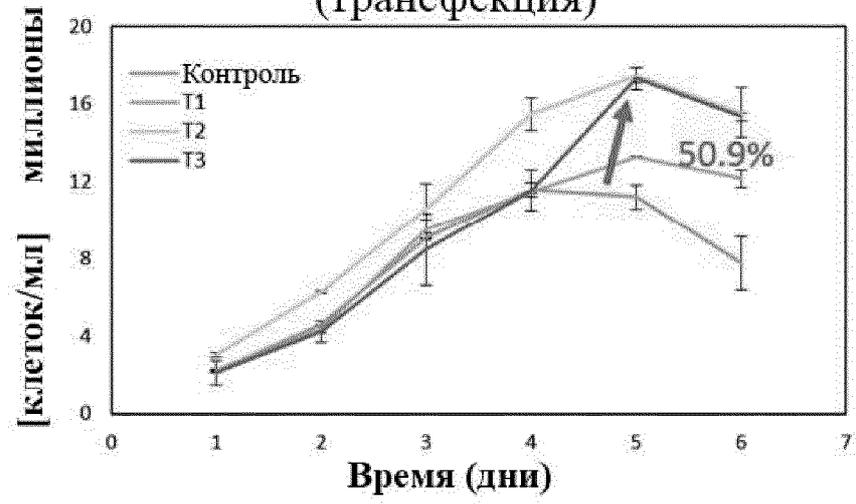


Фиг. 9



Фиг. 10

Плотность жизнеспособных клеток  
(трансфекция)



Фиг. 11