

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290870 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.27

(51) Int. Cl. C12N 9/16 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.14

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЛИПАЗО/ЭСТЕРАЗО-ДЕФИЦИТНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(31) 62/915,234

(72) Изобретатель:

(32) 2019.10.15

Фрай Кристофер Карл, Холл Тройи,
Хуан Лихуа, Сандефер Стефани Линн
(US)

(33) US

(86) PCT/US2020/055572

(87) WO 2021/076620 2021.04.22

(74) Представитель:

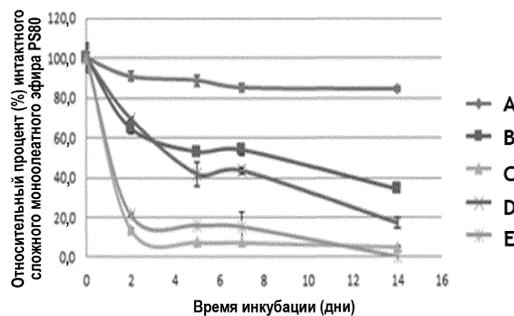
(71) Заявитель:

ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

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

(57) Предложены клеточные линии млекопитающих со сниженной экспрессией и/или активностью липаз/эстераз и способы их получения. Также предложены композиции, содержащие полисорбат и рекомбинантные белки, продуцируемые в указанных клетках млекопитающих, которые обладают улучшенной стабильностью полисорбата.

Приготовление антитела 1 с 0,03% масс./об. PS80 при 37 °С



A1

202290870

202290870

A1

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЛИПАЗО/ЭСТЕРАЗО-ДЕФИЦИТНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

5 Данное изобретение относится к модифицированным клеточным линиям млекопитающих, способам их получения, способам получения рекомбинантных белков в указанных клеточных линиях и композициям, содержащим полученные в клеточных линиях рекомбинантные белки.

Клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (СНО), широко используются в биофармацевтической промышленности для получения 10 рекомбинантных белков, включая терапевтические белки, пептиды и моноклональные антитела (мАт). В процессах производства биопродуктов одновременно продуцируемые белки клетки-хозяина (БКХ, НСР) необходимо удалять или количественно уменьшать, чтобы производить безопасные и эффективные лекарственные препараты, диагностические и/или исследовательские реагенты, содержащие рекомбинантные белки. 15 Для очистки рекомбинантных белков при производстве биопродуктов используется широкий спектр способов очистки. Однако БКХ может быть трудно отделить от рекомбинантных белков, продуцируемых в клетках млекопитающих. Таким образом, БКХ могут создавать серьезные проблемы для получения рекомбинантных белков, в частности, для производства терапевтических биопродуктов. Способы снижения либо экспрессии, 20 либо активности проблемных БКХ в клетках млекопитающих, используемых для производства биопродуктов, могут значительно снизить сложность процессов очистки, необходимых для производства рекомбинантных белков. Использование клеточных линий с пониженным содержанием БКХ часто приводит к получению более стабильных, безопасных и/или более эффективных лекарственных препаратов на основе 25 рекомбинантных белков, диагностических средств и/или диагностических исследовательских реагентов.

При производстве рекомбинантных белковых продуктов полисорбаты часто используются в биомедицинских приготовлениях для повышения стабильности белков во время производства, транспортировки и хранения. Полисорбаты могут улучшить 30 стабильность биопродукта за счет снижения агрегации и образования частиц, в частности, из-за межфазных напряжений и поверхностной адгезии активного компонента. Однако полисорбаты (которые представляют собой сложные полиоксиэтиленсорбитановые эфиры жирных кислот) в присутствии определенных липаз/эстераз могут подвергаться деградации с высвобождением длинноцепочечных жирных кислот. Это может 35 происходить, например, путем гидролиза сложного эфира. Деградация полисорбата может снизить эффективность поверхностно-активного вещества в защите активного

фармацевтического компонента (АФК) и привести к помутнению и образованию частиц в приготовлении с течением времени, что делает продукт несовместимым, ограничивая срок его хранения, а продукты деградации полисорбата могут представлять риск для безопасности пациентов. Уменьшая количество или устраняя клеточные липазы/эстеразы, ответственные за ферментативное расщепление полисорбатных детергентов, можно увеличить срок хранения рекомбинантно полученных приготовлений биопродуктов, содержащих полисорбатные детергенты. Увеличенный срок хранения важен для эффективного снабжения рекомбинантными продуктами, что позволяет сократить количество отходов и создать дистрибьюторские сети.

В публикациях международных заявок на патент WO 2017/053482, WO 2016/138467, WO 2018/039499 и WO 2015/095568 описаны способы снижения экспрессии проблемных БКХ в клетках млекопитающих, включая различные липазы/эстеразы. Однако часто неясно, какие липазы/эстеразы приводят к конкретной проблеме, связанной с деградацией полисорбата. Соответственно, остается большая потребность в модифицированных клетках млекопитающих с дефицитом липазы/эстеразы, которые более эффективно решают проблему остаточной активности липазы/эстеразы клеток млекопитающих в способах получения рекомбинантного белка и в приготовлениях биопродуктов, содержащих полисорбат. В данном изобретении предложены, *среди прочего*, генетически модифицированные клетки-хозяева, которые позволяют производить биопродукты со значительно меньшим количеством белковых примесей клетки-хозяина, разлагающих полисорбат, что приводит к значительному повышению стабильности приготовлений биопродуктов, содержащих полисорбат.

В одном аспекте предложена клетка млекопитающего, которая имеет сниженную экспрессию и/или активность, по меньшей мере, одной эндогенной пальмитоил-протеин тиоэстеразы (PPT) и, по меньшей мере, одного БКХ, выбранного из группы, состоящей из лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы A2 и фосфолипазы D.

В другом аспекте предложен способ снижения деградации полисорбата в белковом приготовлении, который включает этапы:

- (a) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии белка пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 (PPT1);
- (b) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы D3 (PLD3) и/или фосфолипазы A2 (LPLA₂);
- (c) трансфекция клетки полинуклеотидом, кодирующим биопродукт;

(d) выделение белковой фракции, содержащей интересующий белок, из клетки-хозяина;

(e) взаимодействие белковой фракции с хроматографической средой, которая представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А (РА) или другой способ аффинной хроматографии, катионообменную (СЕХ) хроматографию, анионообменную (АЕХ) хроматографию или хроматографию гидрофобного взаимодействия (НИС); и

(f) отбор интересующего белка из среды;

(g) объединение биопродукта со сложным эфиром жирной кислоты; а также

10 (h) необязательно добавление буфера; и

(i) необязательно добавление одного или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

В другом аспекте предложен способ уменьшения агрегации или образования частиц в белковом приготовлении, который включает этапы:

15 (a) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии белка пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 (PPT1);

(b) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы D3 (PLD3) и/или фосфолипазы A2 (LPLA₂);

20 (c) трансфекция клетки полинуклеотидом, кодирующим интересующий биопродукт;

(d) выделение белковой фракции, содержащей интересующий белок, из клетки-хозяина;

(e) взаимодействие белковой фракции с хроматографической средой, которая представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А (РА) или другой способ аффинной хроматографии, катионообменную (СЕХ) хроматографию, анионообменную (АЕХ) хроматографию или хроматографию гидрофобного взаимодействия (НИС); и

(f) отбор интересующего белка из среды; и

30 (g) объединение интересующего белка со сложным эфиром жирной кислоты; а также

(h) необязательно добавление буфера; и

(i) необязательно добавление одного или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

В другом аспекте предложен способ получения стабильного приготовления биопродукта, который включает этапы:

- (a) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии белка пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 (PPT1);
- 5 (b) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы D3 (PLD3) и/или фосфолипазы A2 (LPLA₂);
- (c) трансфекция клетки полинуклеотидом, кодирующим биопродукт;
- (d) выделение белковой фракции, содержащей биопродукт, из клетки-
10 хозяина;
- (e) взаимодействие белковой фракции с хроматографической средой, которая представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А (РА) или другой способ аффинной хроматографии, катионообменную (СЕХ) хроматографию, анионообменную (АЕХ) хроматографию или хроматографию гидрофобного
15 взаимодействия (НИС);
- (f) отбор биопродукта из среды;
- (g) объединение биопродукта со сложным эфиром жирной кислоты;
- (h) необязательно добавление буфера; и
- (i) необязательно добавление одного или более фармацевтически
20 приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

Используемый в контексте данного документа термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая связывает антиген. Варианты реализации антитела включают моноклональное антитело, поликлональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, биспецифическое или
25 полиспецифическое антитело или конъюгированное антитело. Антитела могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA) и любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

Иллюстративное антитело по данному изобретению представляет собой антитело типа иммуноглобулина G (IgG), состоящее из четырех полипептидных цепей: двух
30 тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), которые сшиты посредством межцепочечных дисульфидных связей. Аминоконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей содержит переменную область из около 100-125 или более аминокислот, в первую очередь, отвечающую за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей содержит константную
35 область, в первую очередь отвечающую за эффекторную функцию. Каждая тяжелая цепь

состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи. Изотип IgG можно дополнительно разделить на подклассы (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4).

5 Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями (FR). CDR экспонируются на поверхности белка и являются важными областями антитела для специфичности связывания антигена. Каждая
10 VL и VH состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В данном документе три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». Области CDR содержат
15 большинство остатков, которые обеспечивают специфические взаимодействия с антигеном. Соотнесение аминокислотных остатков к CDR может быть выполнено в соответствии с хорошо известными схемами, в том числе описанными у Kabat (Kabat et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), Chothia (Chothia et al., “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al.,
20 “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), North (North et al., “A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations”, Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) или IMGT (международной базе данных ImMunoGeneTics, доступной на сайте www.imgt.org; см. Lefranc et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

25 Варианты реализации данного изобретения также включают фрагменты антител, включая, но не ограничиваясь ими, Fc-фрагменты или антигенсвязывающие фрагменты, которые, как используется в контексте данного документа, содержат, по меньшей мере, часть антитела, сохраняющую способность специфически взаимодействовать с антигеном или эпитопом антигена, такие как фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv-фрагменты
30 антител, scFab, дисульфид-связанные Fv (sdFv), Fd-фрагмент.

Термин «гидролаза жирных кислот» или «ФАН», используемый в контексте данного документа, предназначен для обозначения любого гидролитического фермента, который расщепляет карбонильную группу с образованием продукта карбоновой кислоты, в котором карбоновая кислота содержит R-группу, которая является липофильной или

иным образом гидрофобной. В некоторых случаях продукт карбоновой кислоты представляет собой жирную кислоту.

Термин «полисорбат» относится к неионогенным поверхностно-активным веществам, которые представляют собой сложные эфиры жирных кислот и полиэтоксиглицированного сорбитана. Примеры полисорбатов, используемых в биомедицинских приготовлениях, включают, но не ограничиваются ими, Полисорбат 80 (PS80), Полисорбат 20 (PS20), Полисорбат 40 (PS40), Полисорбат 60 (PS60), Полисорбат 65 (PS65) или их комбинацию. Концентрация полисорбата в фармацевтических композициях по данному изобретению может составлять от около 0,01% до около 1%, предпочтительно от около 0,01% до около 0,10%, более предпочтительно от около 0,01% до около 0,05%, еще более предпочтительно от около 0,02% до около 0,05% по массе в композиции по данному изобретению.

Термин «липаза/эстераза», используемый в контексте данного документа, предназначен для обозначения группы ферментов клеток млекопитающих, состоящей как из «эстераз», так и из «липаз». «Эстеразы» представляют собой подрод гидролаз жирных кислот, которые расщепляют сложные эфиры жирных кислот на жирные кислоты и спирты. «Липазы» представляют собой подрод эстераз, которые расщепляют липиды (жиры, воски, стеролы, глицериды и фосфолипиды). «Фосфолипазы» представляют собой подрод липаз, которые расщепляют фосфолипиды.

Пальмитоил-протеин тиоэстераза 1 (PPT1) является членом семейства пальмитоил-протеин тиоэстераз и представляет собой лизосомальный фермент, участвующий в катаболизме белков, модифицированных липидами, во время лизосомальной деградации и который отщепляет тиоэфир, образованный из пальмитата жирной кислоты, от остатков цистеина в белках. В одном варианте реализации данного изобретения PPT1 китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В одном варианте реализации данного изобретения PPT1 модифицирована с помощью ZFN в последовательности нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания SEQ ID NO:8. Лизосомная кислая липаза (LAL), также известная как лизосомальная липаза, липаза А, лизосомальная кислота и холестеринэстераза, представляет собой внутриклеточную липазу, которая функционирует в лизосомах. LAL катализирует расщепление эфирной связи холестерина. В одном варианте реализации данного изобретения LAL китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В одном варианте реализации данного изобретения LAL модифицирована с помощью ZFN в последовательности нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания SEQ ID NO:7.

Изоформа липопроteinлипазы X2 (обозначаемая в данном документе как LPL) представляет собой гликозилированный гомодимер, секретируемый паренхиматозными клетками и связанный с эндотелиальными клетками просвета капилляра. В одном варианте реализации данного изобретения LPL китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3. В одном варианте реализации данного изобретения LPL модифицирована с помощью ZFN в последовательности нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания SEQ ID NO:6.

Изоформа X1 лизосомальной фосфолипазы A2 группы XV (обозначаемая в данном документе как LPLA₂) является членом семейства ключевых ферментов, метаболизирующих липиды, и отщепляет жирные кислоты в положении *sn*-2 мембранных фосфолипидов. В одном варианте реализации данного изобретения LPLA₂ китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4. В одном варианте реализации данного изобретения LPLA₂ модифицирована с помощью ZFN в последовательности нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания SEQ ID NO:5.

PLD3 является членом суперсемейства липид-сигнальных ферментов фосфолипазы D (PLD). Известно, что члены семейства PLD гидролизуют фосфатидилхолин с образованием фосфатидной кислоты и холина. PLD3 представляет собой N-гликозилированный трансмембранный белок типа II, который сохраняет мотивы НКD, которые, как показано, придают фосфодиэфирную гидролитическую активность другим членам семейства PLD (например, PLD1 и PLD2). В одном варианте реализации данного изобретения PLD3 китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9. В одном варианте реализации данного изобретения PLD3 модифицирована с помощью ZFN в последовательности нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания SEQ ID NO:10.

Термины «клетки млекопитающих» и «клетки-хозяева» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к клеткам млекопитающих, которые обычно используются для получения биопродуктов с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), эмбриональные клетки почки человека 293 (HEK 293) и клетки миеломы мыши, включая клетки NS0 и Sp2/0, обычно используются для экспрессии белка. Предпочтительно клетка млекопитающего представляет собой CHO, включая, но не ограничиваясь ими, CHO-K1, CHO pro-3, DUKX-X11, DG44, CHOK1SV или CHOK1SV GS-KO. Родительская клеточная линия также может быть модифицирована путем вставки, нокаута или нокдауна генов, влияющих на критические показатели качества, или других посттрансляционных модификаций полипептида рекомбинантного биопродукта, или экспрессии гена,

кодирующего рекомбинантный биопродукт. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO). В одном варианте реализации данного изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку CHO-K1, клетку CHOK1SV, клетку CHO DG44, клетку CHO DUXB11, клетку CHO-S, нокаутную (по гену глутаминсинтетазы) клетку CHO GS, нокаутную клетку CHOK1SV FUT8, CHOZN или клетку, полученную от CHO. Нокаутная клетка CHO GS (например, клетка GSKO) представляет собой, например, нокаутную клетку CHO-K1SV GS (Lonza Biologics, Inc.). Нокаутная клетка CHO FUT8 представляет собой, например, нокаутную клетку Potelligent[®] CHOK1SV FUT8 (Lonza Biologics, Inc.). В вариантах реализации данного изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку HeLa, MDCK, Sf9, Sf21, Tn5, HT1080, NB324K, FLYRD18, HEK293, HEK293T, HT1080, H9, HepG2, MCF7, Jurkat, NIH3T3, PC12, PER.C6, ВНК (клетку почки новорождённого хомячка), VERO, SP2/0, NS0, YB2/0, Y0, EB66, C127, L-клетку, COS (например, COS1 и COS7), QC1-3, CHOK1, CHOK1SV, Potelligent[™] (CHOK1SV FUT8-KO), нокаутную CHO GS, Xceed[™] (CHOK1SV GS-KO), клетку CHOS, CHO DG44, CHO DXB11 или CHOZN или любые клетки, полученные от них.

Термин «родительская клеточная линия» в контексте данного документа относится к нетрансгенному белковому продукту, который экспрессируется клеткой млекопитающего, обычно используемой для экспрессии сконструированного белка. В некоторых вариантах реализации данного изобретения родительская клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO, HEK293 или NS0. Предпочтительно, родительская клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO, включая, но не ограничиваясь этим, клеточную линию GS-CHO (CHOK1SV или CHOK1SV GS-KO).

Термин «клеточная линия, экспрессирующая продукт» относится к «родительской клеточной линии», в которую встроены один или более генов, кодирующих, по меньшей мере, один биопродукт, и которая способна экспрессировать такой белок или белки. Предпочтительно «клеточная линия, экспрессирующая продукт» экспрессирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Термин «инсерционно-делеционная мутация» относится к вставке или делеции оснований нуклеиновой кислоты в геноме клетки.

Используемый в контексте данного документа термин «биопродукт» относится к представляющим интерес продуктам на основе рекомбинантных белков, полученным из генетически модифицированных клеток млекопитающих с использованием технологий рекомбинантной ДНК. Например, биопродукты могут включать антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, вакцины, факторы роста, цитокины, гормоны, пептиды,

ферменты, слитые белки. Предпочтительно биопродукты полезны в терапевтических, диагностических, промышленных и/или исследовательских целях.

Термин «инактивированный ген» относится к гену, который был изменен таким образом, что он 1) не экспрессирует обнаруживаемые уровни белка, исходно кодируемого неизменным геном дикого типа; и/или 2) белок, кодируемый измененным геном, фенотипически нефункционален по сравнению с белком, исходно кодируемым неизменным геном дикого типа.

Термин «поврежденный ген» относится к гену, который был изменен таким образом, что 1) снижена экспрессия белка, который первоначально кодировался неизменным геном дикого типа, и/или 2) активность белка, кодируемого измененным геном, снижается по сравнению с активностью белка, кодируемого неизменным геном дикого типа.

Термины «белок» и «полипептид» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может быть прерван не аминокислотами. Эти термины также охватывают полимер аминокислоты, который был модифицирован естественным путем или путем искусственного вмешательства; например, вследствие образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или с помощью любых других манипуляций или модификаций, таких как конъюгация с метящим компонентом. Также в данное определение включены, например, белки, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Примеры белков включают, но не ограничиваются ими, антитела, пептиды, ферменты, рецепторы, гормоны, регуляторные факторы, антигены, связывающие агенты, цитокины, слитые Fc-белки (например, Fc-домен IgG, который генетически связан с интересующим пептидом/белком), молекулы иммуноадгезина и т. д.

В одном аспекте данного изобретения предложена клетка млекопитающего, в которой снижена экспрессия и/или активность, по меньшей мере, одной эндогенной пальмитоил-протеин тиоэстеразы (PPT) и, по меньшей мере, одного БКХ, выбранного из группы, состоящей из лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы A2 и фосфолипазы D. В другом аспекте данного изобретения клетка млекопитающего дополнительно модифицируется для экспрессии, по меньшей мере, одного биопrodukта. Биоподукт может представлять собой, например, 1) полипептид, 2) антитело или его фрагмент, включая, но не ограничиваясь этим, его антигенсвязывающий

фрагмент, или 3) белок-белковое слияние, включая, но не ограничиваясь этим, Fc-слитый белок.

В одном аспекте данного изобретения предложена клетка млекопитающего, которая имеет сниженную экспрессию и/или активность эндогенной пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 (PPT1) и, по меньшей мере, одного БКХ, выбранного из группы, состоящей из лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы A2 (LPLA₂) и фосфолипазы D3 (PLD3).

В одном аспекте данного изобретения предложена клетка млекопитающего, имеющая модификацию в кодирующей последовательности полинуклеотида, кодирующего белок лизосомную кислотную липазу (LAL), белок липопротеинлипазу (LPL), белок фосфолипазу A2 (LPLA₂) и белок пальмитоил-протеин тиоэстеразу 1 (PPT1), при этом модификация снижает уровень экспрессии белка LAL, белка LPL, белка LPLA₂ и белка PPT1 в клетке, имеющей модификацию, по сравнению с уровнем экспрессии клетки без какой-либо из указанных модификаций.

В другом аспекте данного изобретения клетка млекопитающего дополнительно модифицируется для экспрессии, по меньшей мере, одного биопродукта. Биопродукт может представлять собой, например, 1) полипептид, 2) антитело или его фрагмент, включая, но не ограничиваясь этим, его антигенсвязывающий фрагмент, или 3) Fc-слитый белок.

В другом аспекте данного изобретения предложена клетка млекопитающего, в которой клеточные гены, кодирующие эндогенную PPT1, и, по меньшей мере, один другой БКХ, расщепляющий полисорбат, выбранный из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, были модифицированы таким образом, что экспрессия и/или активность эндогенной PPT1 и других выбранных БКХ снижены. Предпочтительно активность и/или экспрессия эндогенной PPT1 и, по меньшей мере, одного БКХ, выбранного из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, были существенно уменьшены или полностью устранены. В другом аспекте предложен способ получения клетки млекопитающего, в которой ген, кодирующий эндогенный PPT1, и по меньшей мере один НСР, выбранный из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, были модифицированы таким образом, что экспрессия и/или активность этих БКХ снижены. Предпочтительно активность и/или экспрессия эндогенной PPT1 и, по меньшей мере, одного БКХ, выбранного из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, были существенно уменьшены или полностью устранены. В другом аспекте данного изобретения предложен способ получения рекомбинантного белка в варианте реализации клетки млекопитающего, как описано в

данном документе. Материал, полученный из описанных в данном документе вариантов реализации клеток млекопитающих, не демонстрирует или значительно снижает гидролитическую деградацию полисорбата, и поэтому, по существу, не может быть измерена соответствующая липазная активность (например, с помощью анализа липолитической активности).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения биопродукты, полученные из клеток млекопитающих по данному изобретению, обеспечивают фракции, связывающие белок А, имеющие значительно сниженную деградационную активность полисорбата по сравнению с деградационной активностью полисорбата того же биопродукта, полученного в, по существу, аналогичной клетке без каких-либо модификаций. В некоторых вариантах реализации данного изобретения снижение деградации интактного полисорбата, происходящего из биопродукта, полученного в клеточной линии по данному изобретению, экспрессирующей продукт, по сравнению с деградацией интактного полисорбата, происходящего из того же биопродукта, полученного в соответствующей немодифицированной клеточной линии, экспрессирующей продукт, составляет более около 20%, более около 25%, более около 30%, более около 35%, более около 40%, более около 45%, более около 50%, более около 55%, более около 60%, более около 65%, более около 70%, более около 75% или более около 80%. В некоторых вариантах реализации данного изобретения снижение деградации интактного полисорбата, происходящего из биопродукта, полученного в клеточной линии по данному изобретению, экспрессирующей продукт, по сравнению с деградацией интактного полисорбата, происходящего из того же биопродукта, полученного в соответствующей немодифицированной клеточной линии, экспрессирующей продукт, составляет более 20%, более 25%, более 30%, более 35%, более 40%, более 45%, более 50%, более 55%, более 60%, более 65%, более 70%, более 75% или более 80%.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения снижение деградации интактного полисорбата, происходящего из биопродукта, полученного в клеточной линии по данному изобретению, экспрессирующей продукт, по сравнению с деградацией интактного полисорбата, происходящего из того же биопродукта, полученного в соответствующей немодифицированной клеточной линии, экспрессирующей продукт, составляет от около 20% до около 80%, от около 30% до около 75%, от около 35% до около 70%, от около 40% до около 65% или от около 45% до около 60%.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения снижение деградации интактного полисорбата, происходящего из биопродукта, полученного в клеточной линии

по данному изобретению, экспрессирующей продукт, по сравнению с деградацией интактного полисорбата, происходящего из того же биопродукта, полученного в соответствующей немодифицированной клеточной линии, экспрессирующей продукт, составляет от 20% до 80%, от 30% до 75%, от 35% до 70%, от 40% до 65% и от 45% до 60%.

В одном аспекте данного изобретения способы редактирования генов применяются для нацеливания на ген, кодирующий эндогенную PPT1, и на ген(ы), кодирующий(ие), по меньшей мере, один БКХ, выбранный из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, для редактирования, повреждения и/или инактивации их, например, с помощью модификации, вставки или делеции геномных локусов. В некоторых вариантах реализации данного изобретения один или оба аллеля эндогенного белка клетки-хозяина, PPT1, и, по меньшей мере, одного БКХ, выбранного из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, нокаутированы в геноме модифицированных клеток-хозяев, описанных в данном документе (например, клеток CHO). Например, способы редактирования генов включают, помимо прочего, использование нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), кластерных коротких палиндромных повторов, разделённых регулярными промежутками (CRISPR), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), и мегануклеазных систем.

В одном аспекте данного изобретения предложена рекомбинантно модифицированная клетка млекопитающего, которая содержит модификации в полинуклеотидных последовательностях, кодирующих белок LAL, белок LPL, белок LPLA₂ и эндогенный белок PPT1. В другом аспекте данного изобретения модификация снижает уровень экспрессии белка LAL, белка LPL, белка LPLA₂ и белка PPT1 по сравнению с уровнем экспрессии клетки, не содержащей модификаций, например клетки млекопитающего дикого типа.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения целевой ген БКХ редактируется, повреждается и/или инактивируется путем делеции гена. Используемый в контексте данного документа термин «делеция гена» относится к удалению, по меньшей мере, части последовательности ДНК из гена или вблизи него. В некоторых вариантах реализации данного изобретения последовательность, подвергшаяся делеции гена, содержит экзонную последовательность гена. В некоторых вариантах реализации данного изобретения последовательность, подвергшаяся делеции гена, содержит промотерную последовательность гена. В некоторых вариантах реализации данного изобретения последовательность, подвергшаяся делеции гена, содержит фланкирующую последовательность гена. В некоторых вариантах реализации данного изобретения

последовательность, подвергшаяся делеции гена, содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид целевого БКХ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения часть последовательности целевого гена БКХ удалена из целевого гена БКХ или из области, находящейся относительно близко к целевому гену БКХ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения полная последовательность целевого гена БКХ удалена из хромосомы. В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетка млекопитающего содержит делецию гена вблизи целевого гена БКХ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения целевой ген БКХ редактируется, повреждается и/или инактивируется путем делеции гена, при этом делеция, по меньшей мере, одного нуклеотида или пары нуклеотидных оснований в последовательности гена приводит к нефункциональному генному продукту. В некоторых вариантах реализации данного изобретения целевой ген БКХ редактируется, повреждается и/или инактивируется путем делеции гена, при этом делеция, по меньшей мере, одного нуклеотида последовательности гена приводит к получению генного продукта, который больше не обладает функцией или активностью исходного генного продукта, или является нефункциональным.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения целевой ген БКХ редактируется, повреждается и/или инактивируется путем добавления или замены гена. Используемый в контексте данного документа термин «добавление гена» или «замена гена» относится к изменению последовательности целевого гена БКХ, включая вставку или замену одного или более нуклеотидов или пар нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах реализации данного изобретения изменена интронная последовательность целевого гена БКХ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения изменена экзонная последовательность целевого гена БКХ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения изменена промоторная последовательность целевого гена БКХ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения изменена фланкирующая последовательность целевого гена БКХ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения изменена последовательность, кодирующая сигнальный пептид целевого БКХ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения к последовательности целевого гена БКХ добавляют один нуклеотид или одну пару нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, по меньшей мере, один последовательный нуклеотид или пара нуклеотидных оснований добавляют к последовательности целевого гена БКХ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения целевой ген БКХ инактивируется путем добавления или замены гена, при этом добавление или замена, по меньшей мере, одного нуклеотида или пары

нуклеотидных оснований в последовательности целевого гена БКХ приводит к нефункциональному генному продукту. В некоторых вариантах реализации данного изобретения целевой ген БКХ инактивируется посредством инактивации гена, при этом включение или замена, по меньшей мере, одного нуклеотида в последовательность целевого гена БКХ приводит к получению генного продукта, который больше не имеет функции или активности исходного генного продукта, или является нефункциональным.

Как правило, система CRISPR содержит белок каспазы, такой как Cas9, и последовательность РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, называемую направляющей последовательностью, которая комплементарна интересующей последовательности. Каспаза и последовательность РНК образуют комплекс, который идентифицирует последовательность ДНК клетки млекопитающего, и впоследствии нуклеазная активность каспазы позволяет расщеплять цепь ДНК. Изотипы каспаз обладают нуклеазной активностью в отношении одноцепочечной ДНК или двухцепочечной ДНК. Дизайн последовательностей направляющей РНК и расчет количества последовательностей направляющих РНК, используемых в системе CRISPR, позволяют удалить определенный участок гена и/или добавить последовательность ДНК.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения способы по данному изобретению включают редактирование, повреждение и/или инактивацию гена, кодирующего эндогенную PPT1, и гена(ов), кодирующего, по меньшей мере, один БКХ, выбранный из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, с использованием, по меньшей мере, одной системы редактирования генома, выбранной из группы, включающей CRISPR, TALEN, ZFN и мегануклеазную систему.

Как правило, система TALEN содержит одну или более рестрикционных нуклеаз и два или более белковых комплексов, которые позволяют распознавать последовательность ДНК и обеспечивают последующее расщепление двухцепочечной ДНК. Белковый комплекс системы TALEN содержит ряд эффекторов, подобных активаторам транскрипции (TALE), каждый из которых распознает определенный нуклеотид, и домен рестрикционной нуклеазы. Как правило, система TALEN сконструирована таким образом, что два белковых комплекса, каждый из которых содержит TALE и домен рестрикционной нуклеазы, будут индивидуально связываться с последовательностями ДНК таким образом, чтобы обеспечить два домена (по одному от каждого белкового комплекса) рестрикционной нуклеазы с образованием активной нуклеазы и расщеплением определенной последовательности ДНК. Расчет количества белковых комплексов и последовательностей, подлежащих расщеплению в системе TALEN, позволяет удалить определенный участок гена и/или добавить последовательность ДНК.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения способы по данному изобретению включают редактирование, повреждение и/или инактивацию гена, кодирующего эндогенную PPT1, и гена(ов), кодирующего, по меньшей мере, один БКХ, выбранный из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, с использованием системы TALEN.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ получения клетки млекопитающего, в котором клетка млекопитающего имеет пониженный уровень эндогенной PPT1 и пониженный уровень, по меньшей мере, одного БКХ, выбранного из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, включает редактирование, повреждение и/или инактивацию эндогенной PPT1 и, по меньшей мере, одного из других целевых генов БКХ (т.е. LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3) с использованием системы TALEN.

Как правило, система ZFN содержит одну или более рестрикционных нуклеаз и два или более белковых комплексов, которые позволяют распознавать последовательность ДНК и обеспечивают последующее расщепление двухцепочечной ДНК. Белковый комплекс системы ZFN содержит ряд «цинковых пальцев», каждый из которых распознает определенный нуклеотидный кодон, и домен рестрикционной нуклеазы. Как правило, система ZFN сконструирована таким образом, что два белковых комплекса, каждый из которых содержит «цинковые пальцы» и домен рестрикционной нуклеазы, будут индивидуально связываться с последовательностями ДНК таким образом, чтобы обеспечить два домена (по одному от каждого белкового комплекса) рестрикционной нуклеазы с образованием активной нуклеазы и расщеплением определенной последовательности ДНК. Расчет количества белковых комплексов и последовательностей, подлежащих расщеплению в системе ZFN, позволяет удалить определенный участок гена и/или добавить последовательность ДНК.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения способы по данному изобретению включают редактирование, повреждение и/или инактивацию гена, кодирующего эндогенную PPT1, и гена(ов), кодирующего, по меньшей мере, один БКХ, выбранный из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, с использованием системы ZFN.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ получения клетки млекопитающего, в котором клетка млекопитающего имеет пониженный уровень эндогенной PPT1 и пониженный уровень, по меньшей мере, одного БКХ, выбранного из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, включает редактирование, повреждение и/или инактивацию эндогенной PPT1 и, по меньшей мере, одного из других целевых генов БКХ (т.е. LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3) с использованием системы ZFN.

Как правило, мегануклеазная система содержит одну или более мегануклеаз, которые обеспечивают распознавание последовательности ДНК и последующее расщепление двухцепочечной ДНК.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения способы по данному изобретению включают редактирование, повреждение и/или инактивацию гена, кодирующего эндогенную PPT1, и гена(ов), кодирующего, по меньшей мере, один БКХ, выбранный из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, с использованием мегануклеазной системы.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ получения клетки млекопитающего, в котором клетка млекопитающего имеет пониженный уровень эндогенной PPT1 и пониженный уровень, по меньшей мере, одного БКХ, выбранного из группы, состоящей из LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3, включает редактирование, повреждение и/или инактивацию эндогенной PPT1 и, по меньшей мере, одного из других целевых генов БКХ (т.е. LAL, LPL, LPLA₂ и PLD3) с использованием мегануклеазной системы.

Описанные в данном документе модифицированные клетки-хозяева (например, клетки CHO) могут содержать дополнительные геномные модификации для изменения характера гликозилирования антител, продуцируемых в этих клетках. Было продемонстрировано, что измененные модели гликозилирования, такие как сниженное фукозилирование, увеличивают активность антител в виде антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Например, клетки-хозяева с нокаутом обоих аллелей FUT8 (фукозилтрансферазы 8 или α-1,6-фукозилтрансферазы) могут продуцировать антитела с повышенной активностью АЗКЦ (см. патент США № 6946292). В некоторых вариантах реализации модифицированные клетки-хозяева, описанные в данном документе (например, клетки CHO), включают генные модификации, снижающие фукозилирование антител. В некоторых вариантах реализации данного изобретения модифицированные клетки-хозяева, описанные в данном документе (например, клетки CHO), содержат отредактированный, поврежденный и/или инактивированный ген FUT8, например, вследствие модификации, вставки или делеции геномного локуса FUT8. В некоторых вариантах реализации данного изобретения один или оба аллеля FUT8 нокаутированы в геноме модифицированных клеток-хозяев, описанных в данном документе (например, клеток CHO). Антитела, продуцируемые в таких клетках-хозяевах, нокаутных по FUT8, могут иметь повышенную активность АЗКЦ. Другие ферменты, ответственные за гликозилирование, включают GDP-маннозо-4,6-дегидратазу, GDP-кето-6-дезоксиманнозу 3,5-эпимеразу-4,6-редуктазу, GDP-бета-L-фукозопирофосфорилазу, N-

ацетилглюкозаминилтрансферазу III и фукокиназу. В некоторых вариантах реализации данного изобретения модифицированные клетки-хозяева, описанные в данном документе (например, клетки CHO), могут содержать инактивированный ген, кодирующий один или более из этих ферментов. В одном варианте реализации данного изобретения FUT8 китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

Описанные в данном документе модифицированные клетки-хозяева (например, клетки CHO) могут также содержать дополнительные геномные модификации, влияющие на стабильность рекомбинантных белков, которые они экспрессируют. Например, катепсин D (CatD) был определен как БКХ CHO, участвующий в деградации Fc-слитых рекомбинантных белков (см. Robert, F., et al. "Degradation of an Fc-Fusion Recombinant Protein by Host Cell Proteases: Identification of a CHO Cathepsin D Protease." *Biotechnology and Bioengineering* 2009, 104(6), 1132-1141). В некоторых вариантах реализации данного изобретения модифицированные клетки-хозяева, описанные в данном документе (например, клетки CHO), содержат отредактированный, поврежденный и/или инактивированный ген CatD, например, вследствие модификации, вставки или делеции геномного локуса CatD. В некоторых вариантах реализации данного изобретения один или оба аллеля CatD нокаутированы в геноме модифицированных клеток-хозяев, описанных в данном документе (например, клеток CHO). Рекомбинантные белки, продуцируемые в таких нокаутных клетках-хозяевах, могут подвергаться меньшей деградации во время получения. В одном варианте реализации данного изобретения CatD китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12. В одном варианте реализации данного изобретения CatD модифицирован с помощью ZFN в последовательности нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания SEQ ID NO:13.

Описанные в данном документе модифицированные клетки-хозяева (например, клетки CHO) могут также содержать дополнительные геномные модификации, влияющие на гетерогенность рекомбинантных белков, которые они экспрессируют. Например, карбоксипептидаза D (CpD) способна отщеплять C-концевой лизин от изоформ моноклональных антител IgG1, IgG2 и IgG4 (см. публикацию Международной заявки на патент WO 2017/053482). Это может привести к вариантам, которые отличаются зарядами, что усложнит стратегии контроля продукции. В некоторых вариантах реализации данного изобретения модифицированные клетки-хозяева, описанные в данном документе (например, клетки CHO), содержат отредактированный, поврежденный и/или инактивированный ген CpD, например, вследствие модификации, вставки или делеции геномного локуса CpD. В некоторых вариантах реализации данного изобретения один или оба аллеля CpD нокаутированы в геноме модифицированных клеток-хозяев, описанных в

данном документе (например, клеток CHO). Рекombинантные белки, продуцируемые в таких нокаутных клетках-хозяевах, могут иметь уменьшенную гетерогенность варианта заряда. В одном варианте реализации данного изобретения CpD китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. В одном варианте реализации данного изобретения CpD модифицирована с помощью ZFN в последовательности нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания SEQ ID NO:15.

Описанные в данном документе модифицированные клетки-хозяева (например, клетки CHO) могут также содержать дополнительные геномные модификации, которые влияют на последующие процессы, используемые при производстве рекомбинантных белков. Например, фосфолипаза В-подобный фермент 2 (PLBL2) и пероксиредоксин-1 (PRDX1) представляют собой БКХ, которые были определены как примеси в рекомбинантных белках, продуцируемых в клетках CHO после хроматографии с захватом белка (см. WO 2016/138467 и Doneanu, C.; et al. "Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry." *mAbs* 2012, 4(1), 24-44). В некоторых вариантах реализации данного изобретения модифицированные клетки-хозяева, описанные в данном документе (например, клетки CHO), содержат отредактированный, поврежденный и/или инактивированный ген или гены, кодирующие один или оба белка в группе, состоящей из PLBL2 и PRDX1, например, вследствие модификации, вставки или делеции геномного локуса или локусов. В некоторых вариантах реализации данного изобретения один или оба аллеля гена или генов, кодирующих один или оба белка в группе, состоящей из PLBL2 и PRDX1, нокаутированы в геноме модифицированных клеток-хозяев, описанных в данном документе (например, клеток CHO). Рекombинантные белки, полученные в таких нокаутных клетках-хозяевах, могут иметь меньшую контаминацию БКХ по сравнению с диким типом и могут потребовать меньшего количества последующих стадий очистки. В одном варианте реализации данного изобретения PLBL2 китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16. В одном варианте реализации данного изобретения PLBL2 модифицирована с помощью ZFN в последовательности нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания SEQ ID NO:17. В одном варианте реализации данного изобретения PRDX1 китайского хомячка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18. В одном варианте реализации данного изобретения PRDX1 модифицирована с помощью ZFN в последовательности нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания SEQ ID NO:19.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой танезумаб (см., например, WO 2004/058184).

5 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой лебрикизумаб (см., например, WO 2005/062967).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой мирикизумаб (см., например, WO 2014/137962).

10 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой соланезумаб (см., например, WO 2001/62801).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой донанемаб (см., например, WO 2012/021469).

15 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой заготенемаб (см., например, WO 2016/137811).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой рамуцирумаб (см., например, WO 2003/075840).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой галканезумаб (см., например, WO 2011/156324).

25 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой иксекизумаб (см., например, WO 2007/070750).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой дулаглутид (см., например, WO 2005/000892).

30 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой нецитумумаб (см., например, WO 2005/090407).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой оларатумаб (см., например, WO 2006/138729).

5 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой цетуксимаб.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой мАт против ангиопоэтина 2 (см., например, WO
10 2015/179166).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой инсулин-Fc-слитый белок (см., например, WO 2016/178905).

15 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело-агонист против CD200R (см., например, WO 2020/055943).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой мАт против эпирегулина/трансформирующего фактора роста альфа (эпирегулина/TGF α) (см., например, WO 2012/138510).
20

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против ангиопоэтин-подобного белка 3/8 (ANGPTL 3/8) (см., например, WO 2020/131264).
25

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело-агонист против В-лимфоцитарного и Т-лимфоцитарного аттенуатора (см., например, WO 2018/213113).
30

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против лигандов хемокинового рецептора CXС 1/2 (CXCR1/2) (см., например, WO 2014/149733).

35 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок,

который представляет собой агонист фактора роста/дифференцировки 15 (GDF15) (см., например, WO 2019/195091).

5 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против интерлейкина 33 (IL-33) (см., например, WO 2018/081075).

10 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против полипептида-38, активирующего аденилатциклазу гипофиза (PACAP38) (см., например, WO 2019/067293).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело-агонист против белка запрограммированной

15 клеточной смерти 1 (PD-1) (см., например, WO 2017/025016).
В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой мАт против пироглутамат-Абета (pGlu-Abeta, также называемого N3pG Abeta) (см., например, WO 2012/021469).

20 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой биспецифическое антитело против фактор некроза опухоли альфа/интерлейкина 23 (TNF α /IL-23) (см., например, WO 2019/027780).

25 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против альфа-синуклеина (см., например, WO 2020/123330).

30 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело-агонист против кластера дифференцировки 226 (CD226) (см., например, WO 2020/023312).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против переносчика монокарбоксилата 1 (MCT1) (см., например, WO 2019/136300).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой нейтрализующее антитело против коронавируса-2, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2).

5 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против Fc-гамма-рецептора IIВ (FcγRIIВ или FcγRIIВ).

10 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против интерлейкина 34 (IL-34).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против кластера дифференцировки 19 (CD19).

15 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой антитело против триггерного рецептора, экспрессируемого на миелоидных клетках-2 (TREM2).

20 В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, который представляет собой аналог релаксина.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки млекопитающих по данному изобретению (например, клетки CHO) кодируют рекомбинантный белок, выбранный из группы, состоящей из танезумаба, лебрикизумаба, мирикизумаба, соланезумаба, донанемаба, заготенемаба, рамуцирумаба, галканезумаба, иксекизумаба, дулаглутида, нецитумумаба, оларатумаба, цетуксимаба, мАт против ангиопоэтина 2, инсулин-Fc-слитого белка, антитела-агониста против CD200R, мАт против эпирегулина/TGFα, антитела против ANGPTL 3/8, антитела-агониста против BTLA, антитела против лигандов CXCR1/2, агониста GDF15, антитела против IL-33, антитела против PACAP38, антитела-агониста против PD-1, рGlu-Abeta, также называемом мАт против N3pG Abeta, биспецифического антитела против TNFα/IL-23, антитела против альфа-синуклеина, антитела-агониста CD226, антитела против MCT1, нейтрализующего антитела против SARS-CoV-2, антитела против FcγRIIВ, антитела против IL-34, антитела против CD19, антитела против TREM2 и аналога релаксина.

25

30

В одном варианте реализации данного изобретения также предложена фармацевтическая композиция, содержащая полисорбат и биопродукт, выбранный из группы, состоящей из танезумаба, лебрикизумаба, мирикизумаба, соланезумаба, донанемаба, заготенемаба, рамуцирумаба, галканезумаба, иксекизумаба, дулаглутида, нецитумумаба, оларатумаба, цетуксимаба, мАт против ангиопоэтина 2, инсулин-Fc-слитого белка, антитела-агониста против CD200R, мАт против эпирегулина/TGF α , антитела против ANGPTL 3/8, антитела-агониста против BTLA, антитела против лигандов CXCR1/2, агониста GDF15, антитела против IL-33, антитела против PACAP38, антитела-агониста против PD-1, pGlu-Abeta, также называемом мАт против N3pG Abeta, биспецифических антител против TNF α /IL-23, антитела против альфа-синуклеина, антитела-агониста CD226, антитела против MCT1, нейтрализующего антитела против SARS-CoV-2, антитела против Fc γ RIIB, антитела против IL-34, антитела против CD19, антитела против TREM2 и аналога релаксина, при этом биопродукт продуцируется рекомбинантными клетками млекопитающих по данному изобретению. В различных вариантах реализации данного изобретения полисорбат представляет собой полисорбат 80 (PS80), полисорбат 20 (PS20), полисорбат 40 (PS40), полисорбат 60 (PS60), полисорбат 65 (PS65) или их комбинацию. Концентрация полисорбата в фармацевтических композициях по данному изобретению может составлять от около 0,01% до около 1%, предпочтительно от около 0,01% до около 0,10%, более предпочтительно от около 0,01% до около 0,05%, еще более предпочтительно от около 0,02% до около 0,05% по массе/объему (масс./об.) в композиции по данному изобретению. В других вариантах реализации данного изобретения фармацевтические композиции по данному изобретению дополнительно содержат один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. Фармацевтические композиции, содержащие биопродукты, полученные с использованием клеточных линий по данному изобретению, могут быть дополнительно приготовлены способами, хорошо известными в данной области техники (например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.).

30

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: График, изображающий температурно-зависимую деградацию сложного моноолеатного эфира PS80 в присутствии PPT1 с течением времени, который демонстрирует, что PPT1 со временем расщепляет PS80 в зависимости от температуры.

35

Фиг. 2: График, изображающий деградацию сложного моноолеатного эфира PS80 с течением времени в приготовленных образцах мАт: контроль (А) и добавленные отдельно (В) LAL – 1 част./млн, (С) LPL – 1 част./млн, (D) PPT1 – 1 част./млн, и (Е) LPLA₂ – 0,1 част./млн, который демонстрирует, что сложный моноолеатный эфир PS80, присутствующий в приготовлении, деградирует со временем в большей степени в присутствии этих белков, чем в контрольном приготовлении мАт.

Фиг. 3: График, демонстрирующий деградацию сложного моноолеатного эфира PS80 с течением времени в контрольном образце (А) и в присутствии 0,25 Ед./мл PLD4 (В), 2,5 Ед./мл PLD4 (D), 0,25 Ед./мл PLD7 (С) и 2,5 Ед./мл PLD7 (Е). Эти данные качественно демонстрируют способность членов семейства PLD разрушать PS80 с течением времени.

Не ограничивая объем данного изобретения, следующие приготовления и примеры предложены для специалистов в данной области техники в качестве способов получения и применения описанных в данном документе способов и композиций.

Примеры

Пример 1 – Характеристика Гидролитической Активности PPT1 в Отношении Полисорбата

5

Анализ Деградаци Полисорбата с Помощью Жидкостной Хроматографии с Масс-Спектрометрией (ЖХ-МС) – Основной Способ А

Анализы ЖХ-МС выполняются на UPLC Waters ACQUITY (класс I), оснащенном масс-спектрометром Waters SYNAPT[®] G2-Si; колонка: Agilent PLRP-S 2,1 × 50 мм, 1000 Å, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза: А – 0,05 % трифторуксусной кислоты (ТФУ, TFA) в воде, В – 0,04 % ТФУ в ацетонитриле. Готовят стандартные растворы с 2% PS80 и 10 мМ цитратным буфером, получая 0,001, 0,002, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05% растворы PS80. Стандартные кривые приготовленных растворов PS80 в 10 мМ цитратном буфере получают для количественного определения интактного PS80 в образцах с помощью хроматограмм экстрагированных ионов ЖХ-МС для полисорбата моноолеата. Используя стандартные кривые, рассчитывают относительный процент (%) интактного PS80 в виде сложного моноолеатного эфира для каждого образца в течении времени по отношению ко времени = ноль.

Пример 1а – Дегградация Полисорбата 80 в Присутствии PPT1

Образцы полисорбата 80 (PS80) и PPT1 готовят следующим образом: 0,5 мл 0,02% масс./об. PS80 в 10 мМ цитратном буфере (рН 6) смешивают с 5,6 мкл 0,3 мг/мл раствора PPT1 (полученного путем рекомбинантной экспрессии) и образцы хранят при 4, 15, 25 и 35 °С в течение всего периода исследования. Образцы (50 мкл) этих растворов отбирают через определенные промежутки времени и смешивают с 5 мкл 5% муравьиной кислоты в воде для анализа ЖХ-МС. Процент оставшегося интактного PS80 в виде сложного моноолеатного эфира отслеживают с помощью ЖХ-МС в течении времени с использованием основного способа А. Эти данные представлены на Фиг. 1 и демонстрируют, что PS80 деградирует посредством PPT1 с течением времени в зависимости от температуры.

Пример 1b – Дегградация Полисорбата 80 в Образцах Приготовлений мАт с Добавлением LAL, LPL, PPT1 и LPLA₂

К образцам приготовленного мАт (Антитело 1, 100 мг/мл в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, рН 5,0, с 0,03% масс./об. PS80) добавляют отдельно 1 част./млн LAL,

LPL и PPT1 и 0,1 част./млн LPLA₂ (полученных путем рекомбинантной экспрессии). Образцы инкубируют при 37 °С в течение всего периода исследования. Каждый образец разбавляют 20 мМ натрий-ацетатным буфером в соотношении 1:2, а затем анализируют с помощью ЖХ-МС с использованием основного способа А. Процент оставшегося интактного PS80 в виде сложного моноолеатного эфира с течением времени представлен в Таблице 1 и на Фиг. 2.

Таблица 1: Относительный Процент (%) Интактного PS80 в Образцах Антитела 1 с Добавлением LAL, LPL, PPT1 и LPLA₂ по Сравнению с Процентом Интактного PS80 в Нулевой Момент Времени

	Остаток сложного моноолеатного эфира PS80 (средний относительный процент (%) ± стандартное отклонение) после:				
	0 дней	2 дней	5 дней	7 дней	14 дней
Контрольное Антитело 1	100	90,7 ± 2,3	88,7 ± 2,9	85,1 ± 2,0	84,2 ± 1,3
Антитело 1 с добавлением LAL, 1 част./млн	100	64,6 ± 2,2	52,9 ± 2,2	53,9 ± 2,9	34,1 ± 0,1
Антитело 1 с добавлением LPL, 1 част./млн	100	13,9 ± 1,0	7,6 ± 0,4	7,5 ± 0,5	5,2 ± 0,3
Антитело 1 с добавлением PPT1, 1 част./млн	100	69,5 ± 0,7	41,6 ± 6,2	43,5 ± 1,6	17,1 ± 2,8
Антитело 1 с добавлением LPLA ₂ , 0,1 част./млн	100	21,1 ± 0,6	16,0 ± 0,9	15,3 ± 7,7	0,2 ± 0,0

Примечание. Все результаты в Таблице 1 представляют n=2

Эти данные демонстрируют, что сложный моноолеатный эфир PS80, присутствующий в приготовлении, со временем деградирует в большей степени в присутствии данных белков, чем в контрольном приготовлении мАт.

Совместно данные в этом примере демонстрируют способность этих белков (LAL, LPL, PPT1 и LPLA₂) подвергать деградации PS80 в растворе с течением времени.

Пример 2. Идентификация PPT1 в Приготовлении Fc-Слитого Белка

Две отдельные партии культур Fc-слитого белка (Fc-слитый белок 1) подвергают хроматографии на основе белка А. Аликвоты (25 мкл) основного потока белка А

смешивают с 1М буфером Трис-НСl, рН 8 (5 мкл), водой, очищенной системой Barnstead (172 мкл), стандартной смесью белка (0,8 мкл) и 2,5 мг/мл бычьего г-трипсина (2 мкл). Образцы инкубируют при 37 °С в течение 16 часов. Образцы смешивают с 2 мкл раствора дитиотреитола (ДТТ, DTT) с концентрацией 50 мг/мл, а затем нагревают при 90° °С в течение 10 мин. Образцы центрифугируют при 10 000 g в течение 2 минут и супернатанты переносят во флаконы. Затем образцы подкисляют 5% ТФУ в Н₂О (5 мкл) и анализируют с помощью ЖХ-МС. Анализ ЖХ-МС выполняется на UPLC Waters ACQUITY, оснащенном масс-спектрометром ThermoFisher Q Exactive™ Plus; колонка: Waters UPLC CSH C18, 2,1 × 50 мм, размер частиц 1,7 мкм; подвижная фаза: А – 0,10% муравьиной кислоты (МК) в воде, В – 0,10% МК в ацетонитриле, колонка погружена в ледяную воду. В этом эксперименте PPT1 идентифицируют в образцах Fc-Слитого Белка 1 после очистки белка А с помощью нецелевого протеомного (DDA) анализа при 0,5 ± 0,1 част./млн (n=2).

15 Пример 3. Получение Модифицированной Рекомбинантной Клеточной линии CHO с нокаутированными генами LPLA₂, LAL, LPL и PPT1

Если не указано иное, используемые среды для культивирования клеток относятся к бессывороточным средам для культивирования клеток, с добавлением 8 мМ глутамин. Кроме того, если не указано иное, используемые клетки млекопитающих представляют собой клеточную линию CHO с дефицитом глутаминсинтазы (GS-CHO).

Модификация клеточных линий достигается за счет использования изготовленных на заказ реагентов нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), разработанных для того, чтобы быть специфичными для каждого целевого гена БКХ, поставляемых Sigma Aldrich (CompoZr[®] Custom Zinc Finger Nuclease, Каталожный № CSTZFN, Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури). Последовательности нуклеиновых кислот области связывания/разрезания ZFN для LPLA₂, LPL, LAL и PPT1 приведены в Таблице 2.

30

35

Таблица 2: Области связывания/разрезания ZFN для LPLA₂, LPL, LAL и PPT1.

SEQ ID NO:	Целевой ген БКХ:	Область связывания/разрезания последовательности нуклеиновой кислоты (область разрезания последовательности представлена строчными буквами и курсивом):	Область связывания/разрезания в экзоне:
5	LPLA ₂	TGGATCGCCATCACCTCA <i>cttgtc</i> GCGC GACCCAGCTCCGGAG	1
6	LPL	AGCAAAGCCCTGCTCCTGG <i>tggtc</i> CTG GGAGTGTGGCTCCAG	1
7	LAL	TACTGGGGATACCCGAGT <i>gagga</i> GCA TATGATCCAGAC	2
8	PPT1	CGCCTTCGCTGACACCGC <i>tggtg</i> ATCT GGcATGGGATGGGTA	1

Приготовление Клеток для Повреждения Генов – Основной Способ В

Флаконы с клетками оттаивали на водяной бане при температуре 36 °С до тех пор, пока не останется только кусочек льда. Клетки высевали в культуральную среду для культивирования клеток во встряхиваемой колбе. Культуру родительской клеточной линии пересевали в среду для культивирования клеток, поддерживали и проводили пассажирование по 3-дневному/4-дневному графику. Культуры клеток высевали при плотности посева $0,2 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в 30 мл соответствующей поддерживающей среды, как указано выше. В день трансфекции клетки подсчитывали и отбирали соответствующий объем клеток.

Трансфекция с помощью ZFN и Восстановление Смешанной Культуры – Основной Способ С

Трансфекции с помощью ZFN осуществляли с использованием технологии Nucleofector™ и связанного с ней набора V cGMP Nucleofector™ (Каталожный № VGA-1003, Лонца, Базель, Швейцария). Краткое описание, достаточное количество клеток для одной реакции для нуклеофекции ($2 - 4,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток) отбирают путем центрифугирования. После полного удаления супернатанта осадок клеток суспендировали в 100 мкл раствора V Nucleofector™ с добавлением добавки в соответствии с протоколом производителя. Суспендированные клетки осторожно перемешивали путем ресуспендирования и переносили во флакон, содержащий аликвоту мРНК ZFN [часть

специального набора ZFN, разработанного Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури)]. Затем смесь клеток/мРНК переносили в кювету диаметром 2 мм, входящую в комплект Nucleofector™, кювету вставляли в устройство Nucleofector™ и проводили электропорацию клеток. После электропорации клетки выдерживали при комнатной температуре в кювете в течение 30-60 секунд, а затем с помощью стерильной пипетки переносили в лунку маркированного 6-луночного планшета (Falcon, каталожный № 351146, Corning, Durham, NC), содержащего 3 мл среды для культивирования клеток. Трансфицированные клетки выдерживали в 6-луночном планшете, статично, во влажной камере в течение 1-4 дней при 36 °С, 6% CO₂, после чего их переносили в среду культивирования клеток для культивирования во встряхиваемой колбе, 36 °С, 6% CO₂, встряхивание 125 об./мин, до тех пор пока жизнеспособность составит >90%. Как только клетки полностью восстанавливаются после трансфекции (что измеряется по жизнеспособности в культуре во встряхиваемых колбах), основную культуру сортируют по отдельным клеткам с использованием технологии FACS.

Трансфекции с помощью ZFN для каждого целевого БКХ можно проводить один раз перед сортировкой отдельных клеток. Альтернативно, трансфекции с помощью ZFN для любого конкретного целевого БКХ можно проводить два раза с полным восстановлением клеток до проведения второй трансфекции с помощью ZFN. Более чем один раунд трансфекции с помощью ZFN может увеличить количество клеток, содержащих биаллельные мутации в соответствующем целевом гене БКХ, что делает скрининг более эффективным.

Обнаружение ZFN-Опосредованных Модификаций Последовательности Целевого БКХ в Смешанных Культур – Основной Способ D

Через два-семь дней после трансфекции клетки из частично или полностью восстановленных смешанных ZFN-культур отбирали для оценки активности трансфицирующей ZFN. Анализ Surveyor® Mutation Detection Assay (MDA) (Transgenomic Inc., Омаха, Небраска) использовали для определения эффективности процедуры с использованием ZFN в создании модификаций в целевом сайте гена БКХ в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, область связывания ZFN подвергают ПЦР-амплификации с использованием праймеров, входящих в состав набора CompoZr® Custom Zinc Finger Nuclease (Sigma, Сент-Луис, Миссури). Затем продукты ПЦР денатурировали и повторно гибридизовали. Эндонуклеаза Cel-I (Surveyor Nuclease S), входящая в состав набора MDA, используется для обнаружения «пузырьков» несоответствия ДНК, полученных в результате гибридизации продуктов ПЦР, состоящих из нативной

последовательности или последовательности дикого типа и тех, которые содержат инсерционно-делеционные мутации, поскольку Cel-I будет распознавать эти «пузырьки» несоответствия и расщеплять ДНК. После расщепления Cel-I продукты разделяли в 2% или 4% агарозном геле в TBE (Reliant Gel, Lonza, Базель, Швейцария). При отсутствии «пузырьков» несоответствия ДНК расщепление ДНК не произойдет, и будет присутствовать только одна полоса, представляющая продукт ПЦР. Если произошло какое-либо негомологичное соединение концов (NHEJ), отражающее активность ZFN, продукты расщепления будут наблюдаться на геле в виде двух (или более) полос. Только те смешанные ZFN-культуры, которые демонстрируют положительный ответ в MDA, подвергаются дальнейшему процессу для сортировки отдельных клеток.

Сортировка Отдельных Клеток с Помощью Способа Сортировки Клеток с Активированной Флуоресценцией – Основной Способ Е

Восстановленная смешанная культура сортируется с помощью технологии сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Протоколы и способы клонирования отдельных клеток хорошо известны в данной области техники. Для клонирования использовали установку для сортировки клеток (MoFlo™ XDP, Beckman Coulter) для идентификации и сортировки отдельных жизнеспособных клеток путем измерения лазерной дифракции в направлениях прямого и бокового рассеяния в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники (см., например, Krebs, L., et al. (2015) “Statistical verification that one round of fluorescence-activated cell sorting (FACS) can effectively generate a clonally-derived cell line.” BioProcess J 13(4): 6-19).

Клетки сортируют в 96-луночные микротитровальные планшеты (Falcon, каталожный номер 35-3075), содержащие среду для сортировки, не содержащую животных компонентов (среда для клонирования Ex-Cell CHO, SAFC C6366) + 20% кондиционированной среды для культивирования клеток + феноловый красный (Sigma P0290)). Для приготовления кондиционированной среды для культивирования клеток родительские клетки высевали с плотностью 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в среду для культивирования клеток без глутамина и инкубировали во встряхиваемой колбе при 36°C, 6% CO₂, 125 об./мин в течение 20 - 24 ч. Культуру центрифугировали для удаления клеток и кондиционированную среду фильтровали через стерильный фильтр 0,22 мкм. Через семь-десять дней после сортировки отдельных клеток все планшеты заполняли средой для культивирования клеток 50 мкл на лунку. На 14-15 день после сортировки отдельных клеток планшеты анализировали на наличие клонального роста. Рост определяют путем визуализации сортировочных планшетов с помощью устройства для

визуализации CloneSelect (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния) или вручную с помощью зеркала и/или путем наблюдения за изменением цвета среды с красного на оранжевый/желтый.

5 Скрининг Клонально-Полученных Клеточных Линий на ZFN-Опосредованные Модификации Последовательности Целевого Гена БКХ – Основной Способ F

Клонально-полученные клеточные линии (CDCL) отбирают из 96-луночных планшетов, происходящие из восстановленной смешанной ZFN-культуры, когда они становятся видимой колонией, и переносят в глубокие 96-луночные планшеты (Greiner, 10 Каталожный № 780271), содержащие среду для культивирования клеток. Клонально-полученные клеточные линии объединяют в планшеты с глубокими лунками, содержащие 150 мкл среды для культивирования клеток. Культуры поддерживают в среде для культивирования клеток в статических условиях по 3-дневному/4-дневному графику подпитки/пассажиования до завершения скрининга и характеристики.

15 Клонально-полученные клеточные линии (CDCL) проверяют на наличие инсерционно-делеционных мутаций с помощью MDA Surveyor[®]. Геномную ДНК выделяют из каждой клеточной линии с использованием набора для очистки геномной ДНК Promega Wizard[®] SV 96 (каталожный номер A2371, Promega, Мэдисон, Висконсин) в соответствии с протоколом производителя. ZFN-ПЦР-реакции проводят с использованием 20 ДНК-полимеразы Phusion[®] High-Fidelity (New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс) в соответствии с протоколом производителя. Продукты расщепления MDA разделяют в 2% агарозных гелях в TBE. Клеточные линии, которые были идентифицированы как положительные в MDA, характеризуются либо с помощью основного способа G, либо с помощью основного способа H.

25

Характеристика Вставок в CDCL с использованием ОТ-ПЦР – Основной Способ G:

CDCL характеризуются путем секвенирования ZFN-продуктов ПЦР с использованием ОТ-ПЦР реакции целевого гена. Тотальную РНК выделяют из каждой потенциальной нокаутной клеточной линии с использованием набора RNeasy Micro Kit 30 (Qiagen, Каталожный № 74004, Джермантаун, Мэриленд), согласно протоколу производителя. Реакции обратной транскрипции проводят с использованием системы синтеза первой нити SuperScript[™] III для ОТ-ПЦР (каталожный номер 18080-051, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) в соответствии с протоколом производителя, после чего проводят реакции ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Phusion[®] High-Fidelity (New 35 England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс) в соответствии с протоколом производителя.

Продукты ОТ-ПЦР разделяются в 1% агарозных гелях в буфере TAE, определяя клеточные линии с измененными продуктами ОТ-ПЦР. Линия клеток, выбранная для дальнейшего использования, не содержит продукта ОТ-ПЦР и не содержит целевого белка БКХ по данным ЖХ-МС.

5

Характеристика Вставок в CDCL с использованием Секвенирования Следующего Поколения (NGS) – Основной Способ Н:

MDA-положительные CDCL объединяют в 96-луночные планшеты с глубокими лунками для дальнейшего поддержания. При объединении те клеточные линии, которые демонстрируют «ненормальные» результаты ПЦР и/или MDA, характеризуются с использованием секвенирования следующего поколения (NGS), предоставленного GENEWIZ. Линии клеток, содержащие приемлемые биаллельные инсерционно-делеционные мутации в локусе целевого гена БКХ, оценивают с помощью ЖХ-МС, перенося вперед клеточную линию, не содержащую целевой белок БКХ.

15

Масштабирование и Банкирование Нокаутных Клеточных Линий – Основной Способ I:

Те CDCL, которые на основе первоначальной работы по скринингу/характеристике требуют дальнейшей оценки, масштабируются из 96-луночных планшетов с глубокими лунками (ПГЛ) во встряхиваемые колбы, и создаются исследовательские банки клеток (ИБК). Из ПГЛ клетки из соответствующих лунок переносят в лунку с соответствующей меткой в 6-луночном планшете, содержащем 3 мл среды для культивирования клеток. Для масштабирования CDCL выдерживают в 6-луночном планшете, статично, во влажной камере в течение 3–4 дней при 36 °С, 6% CO₂, после чего их переносят для культивирования во встряхиваемых колбах, содержащих 15 мл среды для культивирования клеток, 36 °С, 6% CO₂, встряхивание при 125 об./мин. Культуры во встряхиваемых колбах пассажируют, по меньшей мере, один раз, чтобы создать подходящую клеточную массу для банка. Для каждой клеточной линии получают 3–10 флаконов для ИБК с 10–13 × 10⁶ жизнеспособных клеток на флакон в растворителе для заморозки (90 : 10 среда для культивирования клеток : ДМСО). Флаконы помещают в пенопластовый штатив «сэндвич» при температуре -80 °С не менее чем на 24 часа, чтобы обеспечить замораживание клеток с контролируемой скоростью. После того, как флаконы полностью замерзнут, их хранят при температуре -80°С.

30

Пример 3а – LPLA₂-нокаутная клеточная линия CHO

Клетки CHO подготавливали к повреждению гена в соответствии с основным способом В. Затем клетки подвергали однократной трансфекции с помощью ZFN и восстановлению смешанной культуры в соответствии с основным способом С. Используя основной способ D, выявляли модификации последовательности в смешанной культуре.

5 Смешанные культуры, демонстрирующие положительный ответ в MDA, подвергали дальнейшему процессу для сортировки отдельных клеток в соответствии с основным способом Е. Клонально-полученные из них клеточные линии подвергали скринингу на наличие модификаций последовательности целевого гена БКХ в соответствии с основным способом F. Вставки характеризовали в соответствии с основным способом G, и выбирали

10 клеточную линию, которая не содержит обнаруживаемых количеств белка LPLA₂ с помощью ЖХ-МС. ИБК генерировали в соответствии с основным способом I, чтобы получить LPLA₂-нокаутную клеточную линию CHO.

Пример 3b – LPLA₂ / LPL-нокаутная клеточная линия CHO

15 LPLA₂-нокаутные клетки CHO из Примера 3a получали для повреждения гена в соответствии с основным способом В. Затем клетки подвергали двум трансфекциям с помощью ZFN и восстановлению смешанной культуры в соответствии с основным способом С. Используя основной способ D, выявляли модификации последовательности в смешанной культуре. Смешанные культуры, демонстрирующие положительный ответ в

20 MDA, подвергали дальнейшему процессу для сортировки отдельных клеток в соответствии с основным способом Е. Клонально-полученные из них клеточные линии подвергали скринингу на наличие модификаций последовательности целевого гена БКХ в соответствии с основным способом F. Вставки характеризовали в соответствии с основным способом H, и выбирали клеточную линию, которая не содержит

25 обнаруживаемых количеств белка LPL с помощью ЖХ-МС. ИБК генерировали в соответствии с основным способом I, чтобы получить LPLA₂ / LPL-нокаутную клеточную линию CHO.

Пример 3c – LPLA₂ / LPL / LAL-нокаутная клеточная линия CHO

30 LPLA₂ / LPL-нокаутные клетки CHO из Примера 3b получали для повреждения гена в соответствии с основным способом В. Затем клетки подвергали двум трансфекциям с помощью ZFN и восстановлению смешанной культуры в соответствии с основным способом С. Используя основной способ D, выявляли модификации последовательности в смешанной культуре. Смешанные культуры, демонстрирующие положительный ответ в

35 MDA, подвергали дальнейшему процессу для сортировки отдельных клеток в

соответствии с основным способом Е. Клонально-полученные из них клеточные линии подвергали скринингу на наличие модификаций последовательности целевого гена БКХ в соответствии с основным способом F. Вставки характеризовали в соответствии с основным способом H, и выбирали клеточную линию, которая не содержит обнаруживаемых количеств белка LAL с помощью ЖХ-МС. ИБК генерировали в соответствии с основным способом I, чтобы получить LPLA₂ / LPL / LAL-нокаутную клеточную линию CHO.

Пример 3d – LPLA₂ / LPL / LAL / PPT1-нокаутная клеточная линия CHO

10 LPLA₂ / LPL / LAL-нокаутные клетки CHO из Примера 3с получали для повреждения гена в соответствии с основным способом B. Затем клетки подвергали двум трансфекциям с помощью ZFN и восстановлению смешанной культуры в соответствии с основным способом C. Используя основной способ D, выявляли модификации последовательности в смешанной культуре. Смешанные культуры, демонстрирующие

15 положительный ответ в MDA, подвергали дальнейшему процессу для сортировки отдельных клеток в соответствии с основным способом E. Клонально-полученные из них клеточные линии подвергали скринингу на наличие модификаций последовательности целевого гена БКХ в соответствии с основным способом F. Вставки характеризовали в соответствии с основным способом H, однако ни одна из клеточных линий не содержала биаллельных мутаций в целевой области PPT1. Клеточные линии, содержащие моно- или биаллельные инсерционно-делеционные мутации, оценивали с помощью ЖХ-МС, перенося вперед клеточную линию, которая не содержала обнаруживаемых количеств

20 белка PPT1 по оценке ЖХ-МС. ИБК генерировали в соответствии с основным способом I, чтобы получить LPLA₂ / LPL / LAL / PPT1-нокаутную клеточную линию CHO.

25 Пример 4 – Сравнение Стабильности Полисорбата в Приготовлениях мАт, Экспрессированных в LPLA₂/LPL/LAL/PPT1-нокаутной клеточной линии CHO по Сравнению с Контролем

30 Fc-слитый белок (Fc-слитый белок 1) и антитело (антитело 2) получают из продукта, который экспрессируется клеточными линиями CHO с нокаутированными генами LPLA₂, LPL, LAL и PPT1 (называемые «липазо/эстеразо-нокаутная клеточная линия»), а также продукта, экспрессируемого клеточными линиями CHO без нокаутов генов LPLA₂, LPL, LAL или PPT1 в качестве контроля. Fc-слитый белок 1 подвергали процессу хроматографии на основе белка А, инактивации вирусов при низком значении

35 рН, анионообменной хроматографии (АЕХ), катионообменной (СЕХ) хроматографии и

концентрирования с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF) перед приготовлением образца с 0,02% PS80. Антитело 2 подвергали процессу хроматографии на основе белка А, инактивации вирусов при низком значении рН, СЕХ хроматографии и TFF концентрирования перед приготовлением образца с 0,02% PS80. Приготовленные образцы Fc-слитого белка 1 и антитела 2 хранят при 25 °С на протяжении всего исследования и используют непосредственно для анализа ЖХ-МС с использованием основного способа А для отслеживания процентного содержания оставшегося интактного PS80 в виде сложного моноолеатного эфира в течении времени. Результаты представлены в Таблице 3 и демонстрируют, что PS80 в Fc-слитом белке 1 и антителе 2, полученном с использованием нокаутной клеточной линии, более стабильны, чем контрольные образцы.

Таблица 3: Относительный Процент (%) Интактного PS80 в Образцах Антитела 2 и Fc-Слитого Белка 1 по сравнению с Процентом Интактного PS80 в Нулевой Момент Времени

Образец:	Остаток сложного моноолеатного эфира PS80 (средний относительный процент (%) ± стандартное отклонение) после:			
	0 недель при 25 °С	2 недель при 25 °С	4 недель при 25 °С	8 недель при 25 °С
Антитело 2 из липазо/эстеразнокаутной клеточной линии	100	83 ± 3	77 ± 2	69 ± 1
Контрольное Антитело 2	100	35 ± 8	24 ± 5	15 ± 4
Fc-слитый белок 1 из липазо/эстеразнокаутной клеточной линии	100	104 ± 5	113 ± 6	93 ± 4
Контрольный Fc-слитый белок 1	100	68 ± 4	54 ± 4	33 ± 7

Примечание. Все результаты представляют n=3

Пример 5. Идентификация PLD3 в Приготовлении Моноклонального Антитела
 Образцы, содержащие 1 мг антитела 3, которые подвергали процессу захвата белка А, инактивации вирусов при низком значении рН, анионообменной (АЕХ) хроматографии

и концентрирования с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF) до концентрации 150 мг/мл, смешивали с буфером Трис-НСl (1 М, рН 8, 5 мкл) и водой до достижения объема 195 мкл. Каждый раствор подвергали воздействию 5 мкл стандартной смеси трипсина и белка (20 мкл 2,5 мг/мл бычьего г-трипсина, 20 мкл стандартной смеси белка и 60 мкл воды) при 37 °С в течение ночи. Каждый образец смешивали с 1,4-дителиотреитолом (ДТТ, 50 мг/мл, 2 мкл) и нагревали до 90 °С в течение 10 мин, при этом наблюдалось образование белого осадка. Затем образцы центрифугировали при 13000 g в течение 2 мин и супернатант переносили во флакон для ВЭЖХ. Образцы подкисляя 5 мкл 10% муравьиной кислоты в воде перед анализом ЖХ-МС, по существу, как описано для

10 Примера 2. В этом эксперименте PLD3 определяют в образцах Антитела 3 при 17 ± 6 нг/мг (n=2) Антитела 3.

15 Пример 6 – Характеристика Гидролитической Активности PLD4 и PLD7 в Отношении Полисорбата

PLD4 и PLD7, как и PLD3, являются членами семейства фосфолипазы D. Гидролитическую активность PLD4 и PLD7 оценивают таким же образом, как описано в Примере 1. Образцы, содержащие 0,02% PS80, инкубируют с 0,25 и 2,5 единицами на миллилитр (Ед./мл) PLD4 и PLD7 при 35 °С, а процент оставшегося интактного PS80 в виде сложного моноолеатного эфира определяют с помощью ЖХ-МС в течении времени с использованием основного способа А. После 35 ч инкубации при данных условиях PS80 гидролизуеться >30% и >80% в присутствии 2,5 Ед./мл PLD4 и PLD7 соответственно. Эти данные представлены на Фиг. 3 и качественно демонстрируют способность членов семейства PLD разрушать PS80 с течением времени.

Список последовательностей

Последовательность SEQ ID NO:1 – Пальмитоил-протеин тиоэстераза 1 (PPT1) китайского хомячка

5 MASPGSRWLLAVSLLPWCCAAWSLGHLPNPPSLTPLVIWHGMGDSCCNPISMGAIKKMV
 EKEIPGIYVLSLEIGKNMMEDVENSFFLNVNSQVMMVCQILEKDPKLQQGYNAIGFSQG
 GQFLRAVAQRCPSPRMINLISVGGQHQGVFGLPRCPGESSHVCDFIRKMINAGAYSKVV
 QLRLVQAQYWHDPKEDVYRNHSIFLADINQERCVNETYKKNLMALNKFVMVKFLNDS
 10 IVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQESTLYTEDRLGLKQMDKAGKLVFLAKEGDHLQLS
 KEWFNAYIIPFLK

Последовательность SEQ ID NO:2 – Лизосомная кислая липаза (LAL) китайского хомячка

MQILGLVVCLFLSVLLSGRPTGSIPHDPEANMNVTEMIRYWGYPSEEHMIQTEDGYILG
 VHRIPHGRKNHSHKGPVYVYLQHGFLADSSNWVTNSDNSSLGFILADAGFDVWLGNS
 15 RGNTWSLKHRTLSISQDEFWAFSDEMAKYDLPASIYYIVNKTGQEQVYYVGHSGQTTI
 GFIAFSQIPELAKKIKMFFALAPVVFLNFALSPVIKISKWPEVIIEDLFGHKQFFPQSAKLL
 WLSTHVCNRVVLKCLCTNVFFLICGFNEKNL NESRVNVYTSHPAGTSVQNLRHWGQI
 AKHHMFQAFDWGSKAKNYFHYNQTCPPVYDLKDMLVPTALWSGDHDLADPSDVNI
 LLTQIPNLVYHKRLPDWEHLDFLWGLDAPWRMYNEIVNLLRKYQ

20

Последовательность SEQ ID NO:3 – Изоформа X2 липопротеинлипазы (LPL) китайского хомячка

MESKALLLVALGVWLQSLTASQGXAADGGRDFTDIESKFALRTPDDTAEDNCHLIPGI
 AESVSNCHFVNHSSKTFVVIHGWTVTGMYESWVPKLVAAALYKREPDSNVIVVDWLYRA
 25 QQHYVVSAGYTKLVGNDVARFINWMEEFNYPLDNVHLLGYSLGAHAAGVAGSLTNK
 KVNRTGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYP
 NGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLEENPSKAYRCNSKE
 AFEKGLCLSCRKNRCNNGVYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTE
 SDKQLNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSFLLIYTEVDIGELLMMLKWKSDS
 30 YFSWSDWWSSPGFVIEKIRVKAGETQKKVIFCAREKVSHLQK GKDSA VFKCHDKSLK
 KSG

Последовательность SEQ ID NO:4 – Изоформа X1 лизосомальной фосфолипазы A2 группы XV (LPLA₂) китайского хомячка

MDRHHLTCRATQLRSGLLVPLLLMMLADLALS VQRHPPVVLVPGDLGNQLEAKLDKP
 KVVHYLCSKRTDSYFTLWLNLELLLPVIIDCWIDNIRLVYNRTSRATQFPDGV DVRVPGF
 GETFSLEFLDPSKRTVGSYFHTMVESLVGWGYTRGEDLRGAPYDWRRAPNENGPYFLA
 LREMIEMYQMYGGPVVLVAHSMGNMYTLYFLQRQPQAWKDKYIHAFISLGAPWGG
 5 VAKTLRVLASGDNNRIPVIGPLKIREQQRSAVSTSWLLPYNHTWSHDKVFVHTPTTNYT
 LRDYHQFFQDIRFEDGWFMRQDTEGLVEAMMPPGVELHCLYGTGVPTPDSFYYESFPD
 RDPKICFGDGDGTVNLESVLQCQAWQSRQEHKVS LQELPGSEHIEMLANATTLAYLKR
 VLFEP

- 10 Последовательность SEQ ID NO:5 – Последовательность нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания ZFN для LPLA₂

TGGATCGCCATCACCTCACTTGTCGCGCGACCCAGCTCCGGAG

- 15 Последовательность SEQ ID NO:6 – Последовательность нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания ZFN для LPL

AGCAAAGCCCTGCTCCTGGTGGCTCTGGGAGTGTGGCTCCAG

- 20 Последовательность SEQ ID NO:7 – Последовательность нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания ZFN для LAL

TACTGGGGGATACCCGAGTGAGGAGCATATGATCCAGAC

- 25 Последовательность SEQ ID NO:8 – Последовательность нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания ZFN для PPT1

CGCCTTCGCTGACACCGCTGGTGATCTGGCATGGGATGGGTA

- 30 Последовательность SEQ ID NO:9 – Фосфолипаза D3 (PLD3) китайского хомячка

MKPKL MYQELKVPVEEPAGELPVNEIEAWKAAEKKARWVLLVLILAVVGFGALMTQL
 FLWEYGDLHLFGPNQRPAPCYDPCEAVLVESIPEGLEFPNATTSNPSTSQAWLGLLAGA
 HSSLDIASFYWTLTNNDTHTQEPSAQQGEEILQQLQALAPRGV KVRIVSKPNGPLADL
 35 QSLLQSGAQVRMVD MQKLTHGVLHTKFWVVDQTHFYLG SANMDWRSLTQVKELGVV
 MYNC SCLARDLTKIFEAYWFLGQAGSSIPSTWPRPFDTRYNQETPMEICLNGTPALAYL
 ASAPPPLCPSGRTPDLKALLSVVDSARSFIYIAVMNYLPTMEF SHPRRFWPAIDDGLRRA
 AYERGVKVRLLVSCWGHSEPSMRSFLLSLAALRDNH THSDIQVKLFV VPADEAQARIPY
 ARVNH NKYMVTERAVYIGTSNWSGSYFTETAGTSLLVTQNGHDGLRSQLEDVFLRDW

- 35 NSLYSHNLDTAADSVGNACRLL

Последовательность SEQ ID NO:10 – Последовательность нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания ZFN для PLD3

GCCCCCTGCTATGACCCCTGCGAGTAAGTGGCAGGGGAG

5

Последовательность SEQ ID NO:11 – Фукозилтрансфераза 8 (FUT8) китайского хомячка

MRAWTGSWRWIMLILFAWGTLFLYIGGHLVRDNDHPDHSSRELSKILAKLERLKQQNE
DLRRMAESLRIPEGPIDQGTATGRVVRVLEEQLVKAKEQIENYKKQARNDLGKDHEILRR
RIENGAKELWFFLQSELKKLKKLEGNELQRHADEILLDLGHHERSIMTDLYYLSQTDGA

10

GEWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVYCFMIA
YGTQRTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGLSTGHWSGEVKDKNVQVVELP
IVDSLHPRPPYLPLAVPEDLADRLLRVHGDPAVWWVSQFVKYLIRPQPWLEREIEETK
KLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQLLERRMKVDKKRVYLATD
DPSLLKEAKTKYSNYEFISDNSISWSAGLHNRYTENSLRGVILDIHFLSQADFLVCTFSSQ
15 VCRVAYEIMQTLHPDASANFHSLDDIYYFGGQNAHNQIAVYPHQPRTKKEIPMEPGDIIG
VAGNHWNGYSKGVNRKLGKTGLYPSYKVREKIETVKYPTYPEAEK

Последовательность SEQ ID NO:12 – Катепсин D (CatD) китайского хомячка

MQTLGILLAVGLLAASASAVIRIPLRKFTSIRRTMTEVGGSVEDLILKGPITKYSNQSPA
20 ETKGPVSELLKNYLDAQYYGEIGIGTPPQCFTVVFDTGSSNLWVPSIHCLLDIACWIHH
KYNNGKSSTFVKNGTSFDIHYGSGSLSGYLSQDTVSVPCKSEQPGGLKVEKQIFGEAIKQ
PGITFIAAKFDGILGMGYPSISVNNVVPVFDNLMQKLVKKNIFSFFLNDRDPTGQPGGEL
MLGGIDSKYYEGELSYLNVTRKAYWQVHMDQLDVANGLTLCKGGCEAIVDTGTSLLV
GPVDEVKELQKAIGAVPLIQGEYMIPCEKVSSLPSVTLKLGKDYELSPSKYVLKVSQG
25 GKTICLSGFMGMDIPPSGPLWILGDVFIGTYTTFDRDNNRVGFAKAATL

Последовательность SEQ ID NO:13 – Последовательность нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания ZFN для CatD

CAGTGTCAGAGTTGCTCAAAAACCTACCTGGATGTGAGTGAT

30

Последовательность SEQ ID NO:14 – Карбоксипептидаза D (CpD) китайского хомячка

AGPLLPGRPQVKLVGNMHGDETVSRQVLVYLAHELASGYRRGDPRLVRLNITDVYLL
PSLNPDGFERSREGDCGLGDSGSPXAPRRGRDLNRSFPDQFSTGKPPSLDEVPEVRALID
WIRKNKFVLSGNLHGGSVVASYPFDDSPDHMATGIYSKTSDDDEVFRYLAKAYASNHPI
35 MKTGEPHCPGDEDETFKDGITNGAHWYDVEGGMQDYNVWANCFEITLELSCCKYPP

ASQLRQEWENNRESLITLIEKVHIGIKGFVKDSVTGAGLENATISVAGINHNITTGRFGDF
 HRLLIPGIYNLTA VSTGYMPLTIHNIRVKEGPATEMDFSLRPTVTSKVPDSTEAVATPGTV
 AVPNIPPGTSSSHQPIQPKDFHHHHFPDMEIFLRRFANEYPNITRLYSLGKSVESRELYVM
 EISDNPGVHEPGEPEFKYIGNMHGNEVVGRELLLNIEYLCKNFGTDPEVTDLVRSTRIH
 5 LMPSPMPDGYEKSQEGDSVSVVGRNNSNNFDLNRNFPDQFVTITDPTQPETIAVMSWIK
 SYPFVLSANLHGGSLVVNYPFDDNEQG VATYSKSPDDAVFQQIALSYSRENSQMFQGRP
 CKDMSILNEYFLHGITNGASWYNVPGGMQDWNYLQTNCFEVTIELGCVKYPFEKELPK
 YWEQNRRLSIQFMKQVHQGVKGFVLDATDGRGILNATLSVAEINHPVTTYKAGDYWR
 LLVPGTYKITASARGYNPVTKNVTVRSEGAIQVNFTLVRSSTDANNESKKGKGASTSTD
 10 DSSDPTTKEFEALIKHLSAENGLGFM LSSSSDLALYRYHSYKDLSEFLRGLVMNYPHIT
 NLTTLGQSAEYRHIWSLEISNKNPVSEPEEPKIRFVAGIHGNAPVGTCELLALAEFLCLNY
 KKNPVVTQLVDRTRIVIVPSLNPDGRERAQEKECTSKIGQTNARGKDLDTDFTSNASQPE
 TKAIENLIQKQDFSLSIALDGGSVLVTYPYDKPVQTVENKETLKHLSLYANNHPSMH
 MGQPSCPKNKSDENIPGGVMRGAEWHSGLGSMKDYSVTYGHCP EITVYTSCCYFPSAAQ
 15 LPALWAENKRSLLSMLVEVHKGVHGLVKDKTGKPIKAVIVLNDGIKVHTKEGGYFHV
 LLAPGVHNINIAIEGYQQQHSQVFVHHDAASSVLIVFDTDNRIFGLPRELVTVSGATM
 SALILTACIIWCICSIKSNRHKDG FHLRQH HDEYEDEIRMMSTGSKKSLLSHEFQDETD
 EEETLYSSKH

20 Последовательность SEQ ID NO:15 – Последовательность нуклеиновой кислоты области
 связывания/разрезания ZFN для CpD

GTCAGTGGAGTCAAGAGAACTGTATGTGATGGAGATATC

25 Последовательность SEQ ID NO:16 – Фосфолипаза В-подобный фермент 2 (PLBL2)
 китайского хомячка

MAAPMDRSPGGRAVRALRLALALASL TEVLLNCPAGALPTQGPGRRRQNLDPPVSRVR
 SVLLDAASGQLRLVDGIHPYAVAWANLTNAIRETGWAYLDLGTNGSYNDSLQAYAAG
 VVEASVSEELIYMHWMTMVNYCGPF EYEVGYCEKLSFLEINLEWMQREMELSQDSP
 YWHQVRLTLLQLKGL EDSYEGRLTFPTGRFTIKPLGFLLLQIAGDLEDLEQALNKTSTKL
 30 SLGSGSCSAIKLLPGARDLLVAHNTWNSYQNMLRIKKYQLQFRQGPQEA YPLIAGNNL
 VFSSYPGTIFSGDDFYILG SGLVTLETTIGNKNPALWKYVQPQGCVLEWIRNIVANRLAL
 DGATWADIFKQFN SGTYNQWMIVDYKAFIPNGPSPGSRVLTILEQIPGMVVVADKTED
 LYKTTYWASYNIPFFEIVFNASGLQDLVAQYGDWFSYTKNPRAQIFQRDQSLVEDMNS
 MVRLIRYNNFLHDPLSLCEACIPKPN AENAISARSDLN PANGSYPFQALYQRPHGGIDVK
 35 VTSFSLAKRMSMLAASGPTWDQLPPFQWSLSPFRSMLHMGQPD LWTFSPI SVPWD

Последовательность SEQ ID NO:17 – Последовательность нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания ZFN для PLBL2

CGGTTCCCTGCTCCGCTATCATCAAGTTGCTGCCAGGCGCACG

5

Последовательность SEQ ID NO:18 – Пероксиредоксин-1 (PRDX1) китайского хомячка

MSSGNAKIGYPAPNFKATAVMPDGQFRDICLEYRGKYVVFFFYPLDFTFVCPTETIAFS

DRAEEFKKLNQVIGASVDSHFCHLAWINTPKKQGGLGPMNIPLVSDPKRTIAQDYGVL

KADEGISFRGLFIIDDKGILRQITINDLPVGRSVDEILRLVQAFQFTDKHGEVCPAGWKPG

10 SDTIKPDVQKSKEYFSKQK

Последовательность SEQ ID NO:19 – Последовательность нуклеиновой кислоты области связывания/разрезания ZFN для PRDX1

CCTGCCCCCAACTTCAAAGCCACAGCTGTTATGCCAGATGGAC

15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированная рекомбинантная клетка млекопитающего, имеющая пониженную экспрессию и/или пониженную активность, по меньшей мере, одного эндогенного белка клетки-хозяина (БКХ), пальмитоил-протеин тиоэстеразы, и, по меньшей мере, одного другого эндогенного БКХ, выбранного из группы, состоящей из липопротеинлипазы, лизосомной кислой липазы, фосфолипазы D и фосфолипазы A2.
5
2. Клетка по п. 1, содержащая нарушенный или инактивированный ген, кодирующий БКХ - пальмитоил-протеин тиоэстеразу, и, по меньшей мере, один поврежденный или инактивированный ген, кодирующий БКХ, выбранный из группы, состоящей из белка лизосомной кислой липазы, белка липопротеинлипазы, фосфолипазы D, и белка фосфолипазы A2.
10
3. Клетка по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что пальмитоил-протеин тиоэстераза представляет собой PPT1 и, по меньшей мере, один инактивированный ген, кодирующий БКХ, выбран из группы, состоящей из LAL, LPL, PLD3 и LPLA₂.
15
4. Клетка по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что клетка содержит модификацию кодирующей последовательности полинуклеотида, кодирующего белок лизосомной кислой липазы (LAL), белок липопротеинлипазы (LPL), белок фосфолипазы A2 (LPLA₂) и белок пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 (PPT1).
20
5. Клетка по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что клетка содержит модификацию кодирующей последовательности полинуклеотида, кодирующего белок лизосомной кислой липазы (LAL), белок липопротеинлипазы (LPL), белок фосфолипазы A2 (LPLA₂) и белок пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 (PPT1), при этом модификация снижает уровень экспрессии белка LAL, белка LPL, белка LPLA₂ и белка PPT1 в клетке, имеющей модификацию, по сравнению с уровнем экспрессии в клетке без какой-либо из указанных модификаций.
25
6. Клетка по любому из пп. 4-5, отличающаяся тем, что клетка не экспрессирует обнаруживаемые уровни белка LAL, белка LPL, белка LPLA₂ и белка PPT1.
7. Клетка по любому из пп. 4-6, отличающаяся тем, что модификация включает вставку или делецию нуклеотида в экзоне 1 или 2 кодирующей последовательности полинуклеотида, кодирующего конкретный белок.
30
8. Клетка по любому из пп. 4-7, отличающаяся тем, что модификация включает:

- а) вставку или делецию нуклеотида в экзоне 1 кодирующих последовательностей полинуклеотидов, кодирующих белки LPL, LPLA₂ и PPT1, и
- б) вставку или делецию нуклеотида в экзоне 2 кодирующей последовательности полинуклеотида, кодирующего белок LAL.
- 5
9. Клетка по п. 8, отличающаяся тем, что белок PPT1 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO:1.
10. Клетка по п. 9, отличающаяся тем, что модификация включает вставку или делецию нуклеотида в последовательности SEQ ID NO:8.
- 10
11. Клетка по п. 8, отличающаяся тем, что белок LAL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO:2.
12. Клетка по п. 11, отличающаяся тем, что модификация включает вставку или делецию нуклеотида в последовательности SEQ ID NO:7.
- 15
13. Клетка по п. 8, отличающаяся тем, что белок LPL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO:3.
14. Клетка по п. 13, отличающаяся тем, что модификация включает вставку или делецию нуклеотида в последовательности SEQ ID NO:6.
- 20
15. Клетка по п. 8, отличающаяся тем, что белок LPLA₂ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO:4.
16. Клетка по п. 15, отличающаяся тем, что модификация включает вставку или делецию нуклеотида в последовательности SEQ ID NO:5.
- 25
17. Клетка по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что модификация включает вставку или делецию нуклеотида в экзоне 2, экзоне 3 или экзоне 4 кодирующей последовательности полинуклеотида, кодирующего белок из списка, состоящего из: PPT1, LAL, LPL и LPLA₂.
- 30
18. Клетка по любому из пп. 1-17, дополнительно содержащая полинуклеотид, кодирующий один или более биопродуктов.
19. Клетка по п. 18, отличающаяся тем, что биопродукт выбран из группы, состоящей из антитела, тяжелой цепи антитела, легкой цепи антитела, антигенсвязывающего фрагмента, антигенсвязывающего белка, белок-белкового слияние и Fc-слитого белка.
- 35

20. Клетка по любому из пп. 4-19, отличающаяся тем, что клетка продуцирует фракцию, связывающую А-белок, имеющую значительно сниженную деградационную активность полисорбата по сравнению с деградационной активностью полисорбата в клетке без каких-либо модификаций.
- 5 21. Клетка по п. 20, отличающаяся тем, что снижение деградации интактного полисорбата составляет более 30%.
22. Клетка по п. 20, отличающаяся тем, что снижение деградации интактного полисорбата составляет более 30%.
- 10 23. Клетка по любому из пп. 1-22, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку CHO.
24. Клетка по п. 23, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку CHO-K1, клетку CHO-K1SV, клетку CHO DG44, клетку CHO DUXB11, клетку CHO-S, нокаутную (по гену глутаминсинтетазы) клетку CHO GS, нокаутную клетку CHO-K1SV FUT8, CHOZN или клетку, полученную от CHO.
- 15 25. Способ получения биопродукта, включающий этапы:
- (a) получение образца, содержащего биопродукт и множество белков клетки-хозяина, из клетки-хозяина, модифицированной для получения сниженных уровней PPT1 по сравнению с немодифицированной клеткой; и
- (b) подвергание образца, по меньшей мере, одному этапу очистки для
- 20 удаления, по меньшей мере, одного белка клетки-хозяина.
26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что множество белков клетки-хозяина (a) не содержит обнаруживаемого количества белка PPT1; и (b) не содержит обнаруживаемого количества, по меньшей мере, еще одной другой липазы или эстеразы.
- 25 27. Способ по п. 25 или п. 26, отличающийся тем, что клетка-хозяин содержит:
- a) модификацию кодирующей последовательности полинуклеотида, кодирующего белок PPT1; и
- b) модификацию кодирующей последовательности полинуклеотида, кодирующего гидролазу жирных кислот, выбранную из группы, состоящей из
- 30 лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы A2 (LPLA₂), фосфолипазы D3 (PLD3) или их комбинации.
28. Способ по любому из пп. 25-27, отличающийся тем, что этап очистки представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А (РА) или другой способ аффинной хроматографии, катионообменную (СЕХ) хроматографию,

анионообменную (АЕХ) хроматографию или хроматографию гидрофобного взаимодействия (НІС).

29. Способ снижения деградации полисорбата в белковом приготовлении, включающий этапы:

5 (а) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии белка пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 (PPT1);

(b) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы D3 (PLD3) и/или фосфолипазы A2 (LPLA).₂);

10 (с) трансфекция клетки полинуклеотидом, кодирующим биопродукт;

(d) выделение белковой фракции, содержащей интересующий белок, из клетки-хозяина;

(е) взаимодействие белковой фракции с хроматографической средой, которая представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А (РА) или другой способ аффинной хроматографии, катионообменную (СЕХ) хроматографию, анионообменную (АЕХ) хроматографию или хроматографию гидрофобного взаимодействия (НІС); и

15 (f) отбор интересующего белка из среды;

(g) объединение биопродукта со сложным эфиром жирной кислоты; а также

20 (h) необязательно добавление буфера; и

(i) необязательно добавление одного или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

30. Способ уменьшения агрегации или образования частиц в белковом приготовлении, включающий этапы:

25 (а) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии белка пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 (PPT1);

(b) модификация клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы D3 (PLD3) и/или фосфолипазы A2 (LPLA).₂);

30 (с) трансфекция клетки полинуклеотидом, кодирующим интересующий биопродукт;

(d) выделение белковой фракции, содержащей интересующий белок, из клетки-хозяина;

(e) взаимодействие белковой фракции с хроматографической средой, которая представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А (РА) или другой способ аффинной хроматографии, катионообменную (СЕХ) хроматографию, анионообменную (АЕХ) хроматографию или хроматографию гидрофобного взаимодействия (НИС); и

(f) отбор интересующего белка из среды; и

(g) объединение интересующего белка со сложным эфиром жирной кислоты; а также

(h) необязательно добавление буфера; и

(i) необязательно добавление одного или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

31. Способ получения стабильного приготовления биопродукта, включающий:

(a) модификацию клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии белка пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 (PPT1);

(b) модификацию клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии лизосомной кислой липазы (LAL), липопротеинлипазы (LPL), фосфолипазы D3 (PLD3) и/или фосфолипазы A2 (LPLA₂);

(c) трансфекцию клетки полинуклеотидом, кодирующим биопродукт;

(d) выделение белковой фракции, содержащей биопродукт, из клетки-хозяина;

(e) взаимодействие белковой фракции с хроматографической средой, которая представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А (РА) или другой способ аффинной хроматографии, катионообменную (СЕХ) хроматографию, анионообменную (АЕХ) хроматографию или хроматографию гидрофобного взаимодействия (НИС);

(f) отбор биопродукта из среды;

(g) объединение биопродукта со сложным эфиром жирной кислоты;

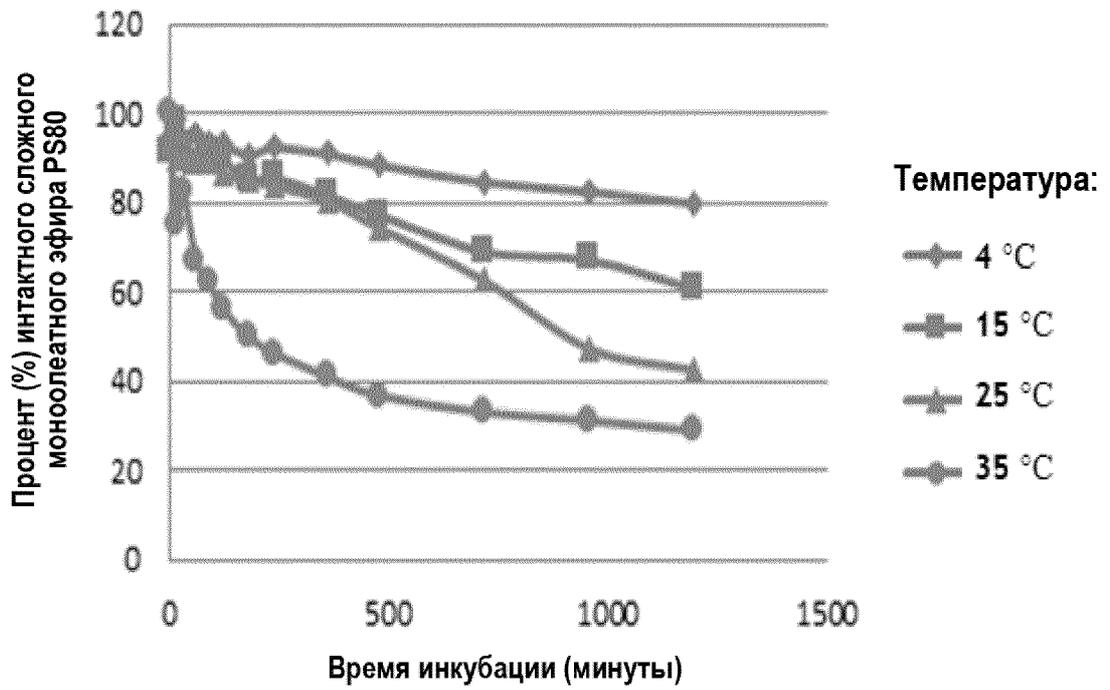
(h) необязательно добавление буфера; и

(i) необязательно добавление одного или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

32. Способ по любому из пп. 29-31, отличающийся тем, что этап модификации клетки-хозяина для снижения или устранения экспрессии PPT1 включает вставку или делецию, по меньшей мере, одного нуклеотида в экзоне 2, экзоне 3 или экзоне 4 полинуклеотида, кодирующего белок PPT1.

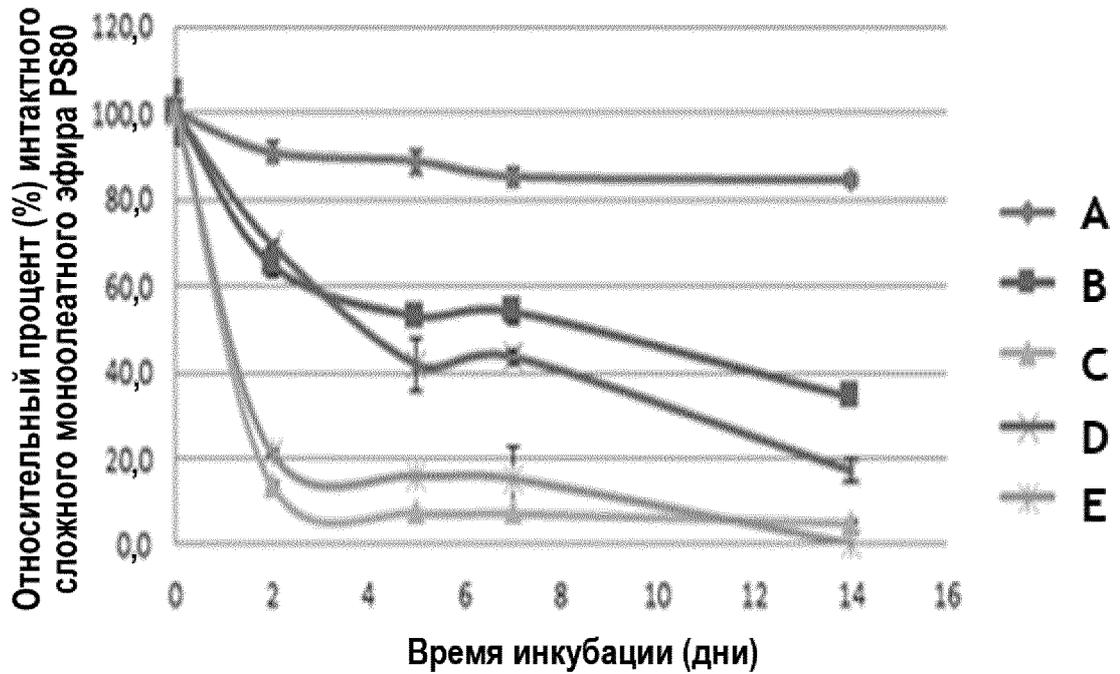
33. Способ по любому из пп. 29-32, отличающийся тем, что полинуклеотид, кодирующий белок PPT1, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO:1.
34. Способ по любому из пп. 29-33, отличающийся тем, что экспрессия и/или активность любой из фосфолипаз, продуцируемых клеткой, снижены.
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что сниженную экспрессию и/или активность определяют путем анализа на липолитическую активность.
36. Фармацевтическая композиция, содержащая полисорбат и биопродукт, продуцируемый клеткой млекопитающего, по любому из пп. 1-24.
37. Фармацевтическая композиция, содержащая полисорбат и биопродукт, полученный способом по любому из пп. 29-35.
38. Фармацевтическая композиция по п. 37, отличающаяся тем, что биопродукт выбран из группы, состоящей из танезумаба, лебрикизумаба, мирикизумаба, соланезумаба, донанемаба, заготенемаба, рамуцизумаба, галканезумаба, иксекизумаба, дулаглутида, нецитумумаба, оларатумаба, цетуксимаба, мАт против ангиопоэтина 2, инсулин-Fc-слитого белка, антитела-агониста против CD200R, мАт против эпирегулина/TGF α , антитела против ANGPTL 3/8, антитела-агониста против BTLA, антитела против лигандов CXCR1/2, агониста GDF15, антитела против IL-33, антитела против PACAP38, антитела-агониста против PD-1, pGlu-Abeta, также называемом мАт против N3pG Abeta, биспецифического антитела против TNF α /IL-23, антитела против альфа-синуклеина, антитела-агониста CD226, антитела против MCT1, нейтрализующего антитела против SARS-CoV-2, антитела против Fc γ RIIB, антитела против IL-34, антитела против CD19, антитела против TREM2 и аналога релаксина, при этом биопродукт продуцируется рекомбинантными клетками млекопитающих по данному изобретению.
39. Антитело, полученное способом по любому из пп. 29-35.

Полисорбат 80, Деградация в присутствии PPT1

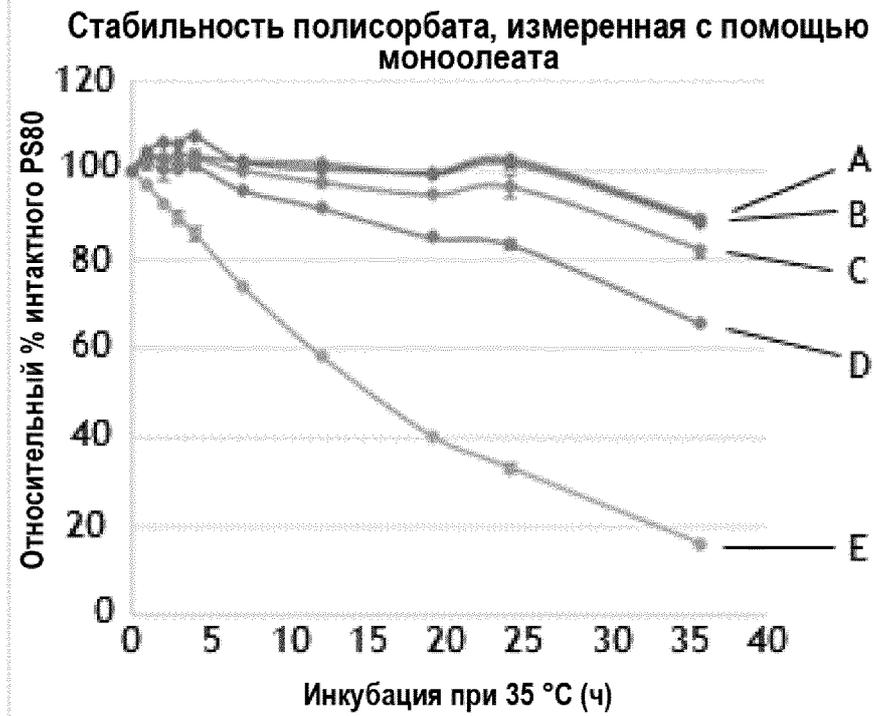


Фиг. 1

Приготовление антитела 1 с 0,03% масс./об. PS80 при 37 °С



Фиг. 2



Фиг. 3