

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391826** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.11.14

(51) Int. Cl. *C12N 5/00* (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.01.19

(54) **СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ТИТРА БЕЛКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК**

(31) 63/139,494

(32) 2021.01.20

(33) US

(86) PCT/US2022/012883

(87) WO 2022/159432 2022.07.28

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Смит Реджинальд (US), Николетти

Сара (KR), Шашилов Виктор,

Ван Хунся, У Цзикан, Замамири

Абделькадер (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены способы повышения титра рекомбинантного белка и титра клеток в клеточной культуре с использованием среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, а также среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, которые могут использоваться для производства рекомбинантного белка и клеток с повышенным титром. Среда для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей содержит буфер НЕРЕС, а примеси с пониженным содержанием являются примесями, связанными с НЕРЕС. В определенных аспектах способы и среды улучшают титр белка, рост клеток и/или плотность жизнеспособных клеток.

A1

202391826

202391826

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578531EA/019

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ТИТРА БЕЛКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по заявке США № 63/139494, поданной 20 января 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящие изобретения относятся к способам культивирования клеток для повышения титра и продуцирования рекомбинантных белков. Настоящие изобретения конкретно относятся к способам культивирования клеток для повышения титра с использованием сред с пониженным содержанием примесей и для производства белковых биофармацевтических препаратов, а также к клеткам и клеточным культурам, выращиваемым в соответствии со способами, и белкам, продуцируемым клетками и клеточными культурами.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Биологические агенты, особенно белки и полипептиды, часто разрабатывают в качестве новых биофармацевтических продуктов. Модифицированные клетки, вырабатывающие высокие уровни определенного белка, представляющего интерес, стали критически важными для успешного коммерческого производства таких биофармацевтических продуктов. Контроль и оптимизация условий клеточной культуры варьируются и оказывают большое влияние на уровень и качество терапевтического белка, продуцируемого в культуре клеток.

[0004] Обычно белки производят с помощью клеточной культуры в периодическом процессе или периодическом процессе с подпиткой. Ранние стадии выращивания инокулята после оттаивания флакона включают культивирование клеток в посевной культуре. Обычно клетки выращивают с экспоненциальной скоростью роста, например, в системе посевных биореакторов, для постепенного увеличения размера и/или объема клеточной популяции. После увеличения клеточной массы на нескольких биореакторных стадиях клетки переносят в производственный биореактор с подпиткой, пока клетки еще находятся в стадии экспоненциального роста (log-фаза) (Gambhir, A. et al., 2003, J Bioscience Bioeng 95(4):317-327).

[0005] После переноса в периодическую культуру с подпиткой клетки культивируют в течение определенного периода времени, при этом состав среды контролируют и регулируют, чтобы обеспечить производство представляющего интерес белка или полипептида. После достижения определенного выхода или когда жизнеспособность клеток, накопление отходов или истощение питательных веществ указывают на то, что культивирование следует завершить, полученный белок или полипептид выделяют. За последнее десятилетие были достигнуты значительные успехи в повышении выхода рекомбинантного белка, который в настоящее время достигает титров в несколько граммов на литр. Усовершенствования процессов производства белка, а также инженерии клеточных линий, разработки среды и питательных веществ для клеточных

культур способствовали увеличению выхода белка. Например, схемы оптимизации среды и питательных веществ для клеточных культур включают добавки питательных веществ и разработку химически определенных, бессывороточных сред для поддержания непрерывного роста клеток и оптимальной секреции продукта.

[0006] Однако в данной области все еще существует потребность в среде и методах культивирования клеток, в которых среда обеспечивает здоровый и устойчивый рост и поддержание клеток, а также производство рекомбинантных белков с высоким титром.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном из аспектов предложен способ повышения титра рекомбинантного белка при получении рекомбинантного белка путем культивирования рекомбинантных эукариотических клеток. В определенных вариантах осуществления способ включает (а) обеспечение определенной среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, причем определенная среда для культивирования клеток включает буфер 4-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), и содержит менее около 4000 ppm примеси, связанной с HEPES и имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно общего количества буфера HEPES в среде (4000 мкмоль примеси HEPES МВ 267,07/моль общего HEPES), и менее около 400 ppm примеси, связанной с HEPES и имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно общего количества буфера HEPES в среде (400 мкмоль примеси HEPES МВ 221,06/моль общего HEPES); (b) культивирование указанных рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей; (c) экспрессию представляющего интерес рекомбинантного белка из указанных рекомбинантных эукариотических клеток; и (d) получение более высокого титра рекомбинантного белка в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

[0008] В определенных вариантах осуществления, более высокий титр рекомбинантного белка повышен на по меньшей мере около 5% по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

[0009] В определенных вариантах осуществления, эукариотическая клетка может быть клеткой млекопитающего, клеткой птицы, клеткой насекомого или дрожжевой клеткой. В конкретных вариантах осуществления, эукариотическая клетка может быть клеткой СНО (яичника китайского хомячка). В других вариантах осуществления рекомбинантный белок может быть выбран из Fc-слитого белка, слитого белка Fc-рецептора, белка типа «ловушки», такого как белок-ловушка или мини-белок-ловушка, антитела, фрагмента антитела, или слитого белка ScFv-Fc, или любого другого рекомбинантного белка, включая раскрытые в данной заявке.

[0010] В определенных вариантах осуществления, экспрессия представляющего интерес рекомбинантного белка может происходить во время фазы продукции, фазы роста

или обеих фаз. В других вариантах осуществления, культивирование рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей происходит во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз.

[0011] В других вариантах осуществления, способы повышают производительность клеточной культуры, включая улучшение роста клеток, при этом рост клеток во время культивирования рекомбинантных эукариотических клеток выше, чем рост аналогичных или идентичных рекомбинантных эукариотических клеток в средах без пониженного содержания примесей.

[0012] В других аспектах изобретений предусматривается определенная среда для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей. В определенных вариантах осуществления, среда включает определенную среду для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, причем определенная среда для культивирования клеток включает буфер 4-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES) и содержит менее около 800 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно общего количества буфера HEPES в среде (800 мкмоль примеси HEPES МВ 267,07/моль общего HEPES), и менее около 80 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно общего количества буфера HEPES в среде (80 мкмоль примеси HEPES МВ 221,06/моль общего HEPES).

[0013] В других аспектах изобретений предусматривается способ выбора определенной среды для культивирования клеток для использования в клеточной культуре с целью повышения производительности клеточной культуры. В определенных вариантах осуществления, способ в общем включает: (а) обеспечение определенной среды для культивирования клеток, содержащей буфер 4-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES); (b) анализ определенной среды для культивирования клеток, содержащей буфер HEPES, для определения количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, и количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, присутствующих в указанной определенной среде для культивирования клеток; (с) выбор определенной среды для культивирования клеток, содержащей буфер HEPES, для использования в клеточной культуре, если будет определено, что определенная среда для культивирования клеток, содержащая буфер HEPES, содержит менее около 4000 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно общего количества буфера HEPES в среде (4000 мкмоль примеси HEPES МВ 267,07/моль общего HEPES), и менее около 400 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно общего количества буфера HEPES в среде (400 мкмоль примеси HEPES МВ 221,06/моль общего HEPES); при этом использование определенной среды для культивирования клеток, содержащей буфер HEPES, содержащий менее около 4000 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный

вес (МВ) 267,07, относительно общего количества буфера HEPES в среде (4000 мкмоль примеси HEPES МВ 267,07/моль общего HEPES), и менее около 400 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно общего количества буфера HEPES в среде (400 мкмоль примеси HEPES МВ 221,06/моль общего HEPES), повышает производительность клеточной культуры по сравнению с производительностью клеточной культуры в средах без пониженного содержания связанных с HEPES примесей. В определенных вариантах осуществления повышенная производительность клеточной культуры включает повышенный титр клеточной культуры и/или рост клеток.

[0014] В других аспектах изобретений, предусматривается способ выбора буфера HEPES для использования в клеточной культуре с целью повышения производительности клеточной культуры. В определенных вариантах осуществления, способ в общем включает: (а) обеспечение буфера 4-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES); (b) анализ буфера HEPES для определения количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, и количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, присутствующих в буфере HEPES; (с) выбор буфера HEPES для использования в клеточной культуре, если будет определено, что буфер HEPES содержит менее около 4000 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно общего количества буфера HEPES, которое должно быть использовано с клеточной культурой (4000 мкмоль примеси HEPES МВ 267,07/моль общего HEPES), и менее около 400 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно общего количества буфера HEPES, которое должно быть использовано с клеточной культурой; при этом использование буфера HEPES, содержащего менее около 4000 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно общего количества буфера HEPES, которое должно быть использовано с клеточной культурой (4000 мкмоль примеси HEPES МВ 267,07/моль общего HEPES), и менее около 400 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно общего количества буфера HEPES, которое должно быть использовано с клеточной культурой (400 мкмоль примеси HEPES МВ 221,06/моль общего HEPES), повышает производительность клеточной культуры по сравнению с производительностью клеточной культуры в присутствии буфера HEPES, содержащего более высокие количества указанных примесей. В определенных вариантах осуществления повышенная производительность клеточной культуры включает повышенный титр клеточной культуры и/или рост клеток.

[0015] Другие аспекты изобретений предусматривают клеточные культуры, содержащие (i) по меньшей мере одну рекомбинантную эукариотическую клетку, которая может экспрессировать рекомбинантный белок, и (ii) среду для культивирования клеток, причем клеточную культуру получают способом, включающим стадии: (а) обеспечения определенной среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей,

причем определенная среда для культивирования клеток содержит менее около 4000 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 400 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES; (b) культивирования указанных рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей; (c) экспрессии представляющего интерес рекомбинантного белка из указанных рекомбинантных эукариотических клеток; и (d) получения более высокого титра рекомбинантного белка в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

[0016] Эукариотическая клетка может быть выбрана из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки птицы, клетки насекомого и дрожжевой клетки, может быть выбрана из группы, состоящей из CHO, COS, клеток сетчатки, Vero, CV1, почки, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, A431, CV-1, U937, 3T3, L-клеток, клеток C127, SP2/0, NS-0, клеток ММТ, стволовых клеток, опухолевых клеток и клеточной линии, полученной из вышеназванных клеток. Например, эукариотическая клетка может быть клеткой CHO.

[0017] Экспрессия представляющего интерес рекомбинантного белка может происходить во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз. Культивирование рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей может происходить во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз. Рост клеток во время указанного культивирования рекомбинантных эукариотических клеток может быть более высоким, чем рост аналогичных или идентичных рекомбинантных эукариотических клеток в средах без пониженного содержания примесей. Более высокий титр рекомбинантного белка может быть повышен по меньшей мере около на 5% по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

[0018] Рекомбинантный белок может содержать Fc-домен. Рекомбинантный белок может быть антителом, антителом человека, гуманизированным антителом, химерным антителом, моноклональным антителом, мультиспецифическим антителом, биспецифическим антителом, фрагментом антитела, антигенсвязывающим фрагментом антитела, одноцепочечным антителом, диателом, триателом или тетрателом, Fab-фрагментом или F(ab')₂-фрагментом, IgD-антителом, IgE-антителом, IgM-антителом, IgG-антителом, IgG1-антителом, IgG2-антителом, IgG3-антителом или IgG4 антителом. Рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из анти-PD1 антитела, анти-PDL-1 антитела, анти-Dll4 антитела, анти-ANG2 антитела, анти-AngPt13 антитела, анти-PDGFR антитела, анти-Erb3 антитела, анти-PRLR антитела, анти-TNF антитела, анти-EGFR антитела, анти-PCSK9 антитела, анти-GDF8 антитела, анти-GCGR антитела, анти-VEGF

антитела, анти-IL1R антитела, анти-IL4R антитела, анти-IL6R антитела, анти-IL1 антитела, анти-IL2 антитела, анти-IL3 антитела, анти-IL4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL6 антитела, анти-IL7 антитела, анти-RSV антитела, анти-NGF антитела, анти-CD3 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, анти-CD48 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-CD20 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-MUC16 антитела и биспецифического анти-CD3/анти-PSMA антитела. Например, рекомбинантный белок может быть выбран из группы, состоящей из алирокумаба, атолтвивимаба, мафтвивимаба, одесивимаба, одесивимаба-ebgn, касирвивимаба, имдевимаба, цемиплимаба, цемиплимаба-gwlc, дупилумаба, эвинакумаба, эвинакумаба-dgnb, фасинумаба, несвакумаба, тревогрумаба, ринукумаба и сарилумаба.

[0019] Рекомбинантный белок также может быть выбран из группы, состоящей из Fc-слитого белка, слитого белка Fc-рецептора (TRAP), мини-белка-ловушки и слитого белка ScFv-Fc или любого другого рекомбинантного белка.

[0020] Другие аспекты изобретений предусматривают рекомбинантные белки, продуцируемые в клеточной культуре, содержащей (i) по меньшей мере одну рекомбинантную эукариотическую клетку, которая может экспрессировать указанный рекомбинантный белок, и (ii) среду для культивирования клеток, причем рекомбинантный белок продуцируется способом, включающим стадии: (a) обеспечения определенной среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, при этом определенная среда для культивирования клеток содержит менее около 4000 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 400 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES; (b) культивирования указанных рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей; (c) экспрессии представляющего интерес рекомбинантного белка из указанных рекомбинантных эукариотических клеток; и (d) получения более высокого титра рекомбинантного белка в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

[0021] Эукариотическая клетка может быть выбрана из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки птицы, клетки насекомого и дрожжевой клетки, может быть выбрана из группы, состоящей из CHO, COS, клеток сетчатки, Vero, CV1, почки, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, A431, CV-1, U937, 3T3, L-клеток, клеток C127, SP2/0, NS-0, клеток ММТ, стволовых клеток, опухолевых клеток и клеточной линии, полученной из вышеназванных клеток. Например, эукариотическая клетка может быть клеткой CHO.

[0022] Экспрессия представляющего интерес рекомбинантного белка может происходить во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз. Культивирование рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для

культивирования клеток с пониженным содержанием примесей может происходить во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз. Рост клеток во время указанного культивирования рекомбинантных эукариотических клеток может быть более высоким, чем рост аналогичных или идентичных рекомбинантных эукариотических клеток в средах без пониженного содержания примесей. Более высокий титр рекомбинантного белка может быть повышен на по меньшей мере около 5% по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

[0023] Рекомбинантный белок может содержать Fc-домен. Рекомбинантный белок может быть антителом, антителом человека, гуманизированным антителом, химерным антителом, моноклональным антителом, мультиспецифическим антителом, биспецифическим антителом, фрагментом антитела, антигенсвязывающим фрагментом антитела, одноцепочечным антителом, диателом, триателом или тетраателом, Fab-фрагментом или F(ab')₂-фрагментом, IgD-антителом, IgE-антителом, IgM-антителом, IgG-антителом, IgG1-антителом, IgG2-антителом, IgG3-антителом или IgG4 антителом. Рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из анти-PD1 антитела, анти-PDL-1 антитела, анти-Dll4 антитела, анти-ANG2 антитела, анти-AngPt13 антитела, анти-PDGFR антитела, анти-Erb3 антитела, анти-PRLR антитела, анти-TNF антитела, анти-EGFR антитела, анти-PCSK9 антитела, анти-GDF8 антитела, анти-GCGR антитела, анти-VEGF антитела, анти-IL1R антитела, анти-IL4R антитела, анти-IL6R антитела, анти-IL1 антитела, анти-IL2 антитела, анти-IL3 антитела, анти-IL4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL6 антитела, анти-IL7 антитела, анти-RSV антитела, анти-NGF антитела, анти-CD3 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, анти-CD48 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-CD20 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-MUC16 антитела и биспецифического анти-CD3/анти-PSMA антитела. Например, рекомбинантный белок может быть выбран из группы, состоящей из алирокумаба, атоливимаба, мафтивимаба, одесивимаба, одесивимаба-ebgn, касиривимаба, имдевимаба, цемиплимаба, цемиплимаба-gwlc, дупилумаба, эвинакумаба, эвинакумаба-dgnb, фасинумаба, несвакумаба, тревогрумаба, ринукумаба и сарилумаба.

[0024] Рекомбинантный белок также может быть выбран из группы, состоящей из Fc-слитого белка, слитого белка Fc-рецептора (TRAP), мини-белка-ловушки и слитого белка ScFv-Fc, или любого другого рекомбинантного белка.

[0025] Предусматриваются клетки, клеточные культуры, рекомбинантные белки и способы в соответствии с изобретениями.

[0026] Хотя в данной заявке раскрыты многочисленные варианты осуществления, все же другие варианты осуществления настоящих изобретений станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного ниже подробного описания, в котором представлены и описаны иллюстративные варианты осуществления изобретений. Следует понимать, что изобретения могут быть модифицированы в различных аспектах без выхода за пределы сущности и объема настоящих изобретений. Соответственно,

подробное описание должно рассматриваться как иллюстративное по своей природе, а не ограничительное.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0027] **Фиг. 1** иллюстрирует зависимость между связанной с HEPES примесью и титром белка, в соответствии с одним вариантом осуществления изобретений.

[0028] **Фиг. 2А-2В** иллюстрируют отрицательную корреляцию между связанной с HEPES примесью и титром белка, в соответствии с одним вариантом осуществления изобретений. **Фиг. 2А** основана на данных с Участка 1. **Фиг. 2В** основана на данных с Участка 2. На **Фиг. 2А** имеется перекрытие точек данных с правой стороны, которое также изображено на **Фиг. 1** в партиях 1117000128 и 1117000130.

[0029] **Фиг. 3** иллюстрирует зависимость между связанной с HEPES примесью и титром белка, в соответствии с одним вариантом осуществления изобретений, на Участках 1 и 2.

[0030] **Фиг. 4А-4В** иллюстрируют отрицательную корреляцию между связанной с HEPES примесью и титром белка, в соответствии с одним вариантом осуществления изобретений. **Фиг. 4А** основана на данных с Участка 1. **Фиг. 4В** основана на данных с Участка 2. На **Фиг. 4А** имеется два перекрытия точек данных. Первое перекрытие расположено около посередине, как изображено также на **Фиг. 3** в партиях 1117000129 и 1117000138. Второе перекрытие расположено справа, и также изображено на **Фиг. 3** в партиях 1117000128 и 1117000130.

[0031] **Фиг. 5А** иллюстрирует разделение примесей HEPES методом HPLC (жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий).

[0032] **Фиг. 5В** иллюстрирует разделение примесей HEPES путем разделения на колонке со смешанным режимом.

[0033] **Фиг. 6А** представляет собой график ОФ-ЖХ/МС HEPES-[CH₄] (также обозначаемого как «221») из исходного материала HEPES.

[0034] **Фиг. 6В** представляет собой график HPLC-ЖХ/МС HEPES-[CH₄] из исходного материала HEPES.

[0035] **Фиг. 7** показывает МС/МС фрагментирование HEPES-[CH₄] (также обозначаемого как «221») из исходного материала HEPES.

[0036] Следующие примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны ограничивать объем изобретений.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЙ

[0037] В соответствии с аспектами изобретений, было неожиданно обнаружено, что использование среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей повышает производительность клеточной культуры, включая улучшение роста клеток и продуцирование белка клеткой в клеточной культуре, по сравнению со средой для культивирования клеток, не имеющей такого пониженного содержания примесей.

[0038] Более конкретно, было неожиданно обнаружено, что примеси в среде для культивирования клеток, содержащей буфер 4-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновую

кислоту (HEPES), влияют на производительность клеточной культуры. В соответствии с изобретениями, были определены связанные с HEPES примеси, которые влияют, т.е., проявляют сильную отрицательную корреляцию с производительностью клеточной культуры (например, титром белка). В одном варианте осуществления, связанные с HEPES примеси включают связанную с HEPES примесь, имеющую молекулярный вес (МВ) 267,07, связанную с HEPES примесь, имеющую молекулярный вес 221,06, и их комбинации. В определенных вариантах осуществления было обнаружено, что использование среды для культивирования клеток с пониженным количеством таких связанных с HEPES примесей повышает производительность клеточной культуры по сравнению со средой для культивирования клеток, не имеющей такого пониженного количества связанных с HEPES примесей.

[0039] Используемые в данном документе заголовки разделов приведены исключительно в организационных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие описываемый предмет изобретения. Способы и методики, описанные в данном документе, обычно выполняют в соответствии с обычными методами, известными в данной области техники и описанными в различных общих и более специальных источниках, которые упоминаются и обсуждаются в данном описании, если не указано иное. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), и Julio E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998), и Dieffenbach and Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995).

Определения

[0040] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, общепринятые для специалистов в той области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы в практике настоящих изобретений, далее описаны конкретные способы и материалы.

[0041] Термин «около» в контексте численных значений и диапазонов относится к значениям или диапазонам, которые приближаются или близки к указанным значениям или диапазонам таким образом, чтобы изобретения могли осуществляться должным образом, например, иметь желаемую скорость, количество, уровень, увеличение, уменьшение или степень выражения, концентрацию или время, как понятно из приведенного в данном документе описания. Таким образом, данный термин охватывает значения, выходящие за пределы тех, которые просто являются результатом систематической ошибки.

[0042] Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются

взаимозаменяемо в данном описании и относится к молекуле, содержащей два или больше аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидной связью. Пептиды, полипептиды и белки могут также включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и АДФ-рибозилирование. Пептиды, полипептиды и белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на белковой основе. Пептиды, полипептиды и белки включают, в числе прочего, антитела и химерные или слитые белки. Пептиды, полипептиды и белки продуцируются рекомбинантными клеточными линиями животных с использованием методов клеточных культур.

[0043] Термин «гетерологичная полинуклеотидная последовательность», используемый в данном документе, относится к полимерам нуклеиновых кислот, кодирующим белки, представляющие интерес, такие как химерные белки (как молекулы-ловушки), антитела или участки антител (например, VH, VL, CDR3), которые продуцируются как биофармацевтические лекарственные субстанции. Гетерологичная полинуклеотидная последовательность может быть получена методами генной инженерии (например, как последовательность, кодирующая химерный белок, или оптимизированная по кодонам последовательность, лишенная интронов последовательность и т.д.) и введена в клетку, где она может находиться в виде эписомы или быть интегрированной в геном клетки. Гетерологичная полинуклеотидная последовательность может быть естественно встречающейся последовательностью, которую вводят в эктопический участок в геноме клетки-продуцента. Гетерологичная полипептидная последовательность может быть естественно встречающейся последовательностью из другого организма, такой как последовательность, кодирующая человеческий ортолог.

[0044] «Антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно разделены на области гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с областями, являющимися более консервативными, которые называются каркасными участками (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антитела, приготовленные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными средствами, например, антитела, выделенные из

клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, способный связываться с несколькими различными эпитопами. Биспецифические антитела описаны в общем в публикации патентной заявки США № 2010/0331527.

[0045] Термин «антигенсвязывающий участок» антитела (или «фрагмент антитела»), относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий участок» антитела, включают (i) фрагмент Fab, представляющий собой моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 241:544-546), который состоит из домена VH, (vi) выделенный CDR, и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием единой белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием моновалентных молекул. Термин «антитело» также охватывает другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела (см., например, Holliger et al. (1993) *PNAS USA* 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

[0046] Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий участок может быть частью более крупной иммуноадгезивной молекулы, образованной путем ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или участка антитела с одним или более другими белками или пептидами. Примеры таких иммуноадгезивных молекул включают использование коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) и использование цистеинового остатка, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Участки антитела, такие как фрагменты Fab и F(ab')₂, могут быть получены из цельных антител с использованием обычных методик, таких как гидролиз цельных антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, участки антител и иммуноадгезивные молекулы могут быть получены с использованием стандартных методик рекомбинантных ДНК, общеизвестных в данной области техники (см. Sambrook et al., 1989).

[0047] Подразумевается, что термин «антитело человека» включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретениям могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, внесенные путем неспецифического или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или путем соматической

мутации *in vivo*), например, в CDR, особенно, CDR3. Однако, термин «антитело человека», используемый в данном документе, не подразумевает включения антител, в которых последовательности CDR, полученные от зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мыши, были привиты к каркасным последовательностям человека.

[0048] Термин «рекомбинантное антитело человека», используемый в данном документе, подразумевает включение всех антител человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, например, антител, экспрессированных с помощью рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антител, выделенных из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, антител, выделенных из животного (например, мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антител, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В определенных вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные антитела человека подвергают *in vitro* мутагенезу (или, при использовании животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из и родственны последовательностям VH и VL зародышевой линии человека, могут в естественных условиях не входить в репертуар антител зародышевой линии человека *in vivo*.

[0049] «Fc-слитые белки» включают часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-участок молекулы иммуноглобулина, которые в природе не встречаются вместе. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными участками полученных из антител полипептидов (включая Fc-домен) было описано, например, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., «Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins», в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, страницы 10.19.1-10.19.11, 1992. «Слитые белки Fc-рецептора» включают один или более внеклеточных доменов рецептора, сопряженного с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления включает шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, Fc-слитый белок содержит две или более отдельных рецепторных цепей, которые связываются с одним или более лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, содержащую Fc, такую как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RACp, слитую с внеклеточной областью IL-

1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6927044), или ловушка VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитым с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159).

[0050] Дополнительно, включены мини-ловушки, которые представляют собой белки-ловушки, использующие мультимеризующий компонент (МС) вместо Fc-участка, и раскрыты в патентах США №№ 7279159 и 7087411.

[0051] Также включены производные, компоненты, домены, цепи и фрагменты вышеперечисленного.

[0052] Все числовые пределы и диапазоны, указанные в настоящем документе, включают все числа или значения, приближенные к или расположенные между числовыми значениями, определяющими диапазон или предел. Диапазоны и пределы, описанные в данном документе, однозначно обозначают и устанавливают все целые, десятичные и дробные значения, определяемые и охватываемые диапазоном или пределом. Таким образом, перечисление диапазонов значений в данном документе должно просто служить сокращенным методом ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в указанный диапазон, если иное не оговорено в данном документе, и каждое отдельное значение включено в описание изобретения, как если бы оно было индивидуально указано в данном документе.

Среда для культивирования клеток

[0053] В одном аспекте, настоящие изобретения предусматривают среду для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей. В определенных вариантах осуществления, среда для культивирования клеток включает буфер 4-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), и имеет пониженное содержание связанных с HEPES примесей. В определенных вариантах осуществления, среда для культивирования клеток может быть химически определенной средой для культивирования клеток, как описано в данном документе.

[0054] Более конкретно, в соответствии с изобретениями, среда для культивирования клеток включает менее около 4000 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток (4000 мкмоль примеси HEPES МВ 267,07/моль общего HEPES), и менее чем 400 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток (400 мкмоль примеси HEPES МВ 221,06/моль общего HEPES).

[0055] При большинстве биологических значений pH HEPES представляет собой цвиттерионный буферный агент сульфоновой кислоты и обычно эффективен в качестве буфера при pH от 6,8 до 8,2. HEPES широко используется в клеточных культурах, отчасти благодаря своей способности поддерживать физиологический pH несмотря на изменения концентрации углекислого газа, по сравнению с бикарбонатными буферами. Концентрация буфера для клеточных культур обычно находится в диапазоне от 10 до 25

мМ. Буферный раствор HEPES может быть приготовлен любым из нескольких способов. Например, свободную кислоту HEPES можно добавить к воде, затем титровать примерно полумолярным эквивалентом гидроксида натрия или гидроксида калия до желаемого уровня pH, причем простая таблица смешивания для приготовления 0,05 М HEPES/NaOH была опубликована. Альтернативно, эквимолярные концентрации свободной кислоты HEPES и натриевой соли HEPES могут быть смешаны в приблизительно равных объемах, после чего проводят обратное титрование любым из растворов до соответствующего pH. Другие формы HEPES включают калиевую соль HEPES и геминатриевую соль HEPES. Любой пригодный буфер HEPES может быть использован в связи с настоящими изобретениями, такой как буфер HEPES с пониженным содержанием примесей, описанный в данном документе.

[0056] Термины «среда для культивирования клеток» и «культуральная среда» относятся к питательному раствору, используемому для выращивания клеток, например, эукариотических клеток, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как углеводный источник энергии, незаменимые (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и заменимые (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин) аминокислоты, микроэлементы, источники энергии, липиды, витамины и т.д. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например, сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые обеспечивают сырьевые материалы, поддерживающие рост клеток. Среда может содержать дрожжевые или соевые экстракты вместо экстрактов животного происхождения. Химически определенная среда относится к среде для культивирования клеток, в которой все химические компоненты известны (т.е. имеют известную химическую структуру). Химически определенная среда не содержит никаких компонентов животного происхождения, таких как пептоны, полученные из сыворотки или животных материалов. В одном варианте осуществления, среда представляет собой химически определенную среду.

[0057] Среда может также содержать компоненты, которые усиливают рост и/или выживаемость выше минимального уровня, включая гормоны и факторы роста. Среда предпочтительно составлена таким образом, чтобы уровень pH и концентрация соли были оптимальными для выживания и пролиферации клеток.

[0058] В определенных аспектах, среда для культивирования клеток может быть бессывороточной. «Бессывороточная» относится к среде для культивирования клеток, которая не содержит животных сывороток, таких как сыворотка плода коровы. Бессывороточная среда может содержать ≤ 16 г/л гидролизатов, таких как соевый гидролизат. Настоящие изобретения также предусматривают химически определенные среды с пониженным содержанием примесей, которые не только являются бессывороточными, но также не содержат гидролизатов. «Не содержащая гидролизатов» относится к средам для культивирования клеток, которые не содержат гидролизатов

экзогенного белка, таких как гидролизаты животного или растительного белка, таких как, например, пептоны, триптоны и т.п.

[0059] «Базовая среда» представляет собой исходную среду (например, присутствующую в системе посевных ферментеров и/или в день 0 производства клеточной культуры), в которой размножаются клетки, содержащую все необходимые питательные вещества, включая базовую смесь аминокислот. Различные рецепты (т.е. составы) базовых сред могут быть приготовлены или приобретены коммерчески доступными партиями. Аналогично, «базовая питательная среда» содержит смеси дополнительных питательных веществ, которые обычно потребляются во время производства культуры и используются в стратегии питания (для так называемой культуры «периодического процесса с подпиткой»). Разновидности базовых питательных сред являются коммерчески доступными. «Питание» включает добавления по графику или добавления к среде через регулярные промежутки времени, например, в соответствии с протоколом, включая систему культуры с непрерывным питанием, как в хемостате (см. C. Altamirano et al., *Biotechnol Prog.* 2001 November-December; 17(6):1032-41), или в соответствии с периодическим процессом с подпиткой (Y. M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* 2010 September-October; 26(5): 1400-10). Например, культуру можно подпитывать один раз в день, раз в два дня, раз в три дня, или когда концентрация конкретного компонента среды, за которым ведется наблюдение, выходит за пределы желаемого диапазона.

[0060] Без намерения устанавливать ограничения, изобретения могут быть реализованы на практике с любой одной или более из множества базовых сред или их комбинациями. Базовые среды общеизвестны в данной области техники и включают, в частности, среду MEME Игла (минимальную эссенциальную среду) (Eagle, *Science*, 1955, 112(3168):501-504), среду F12 Хэма (Ham, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1965, 53:288-293), среду F-12 К, среду Дульбекко, модифицированную по Дульбекко среду Игла (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1952 August; 38(8): 747-752), DMEM/среду F12 Хэма 1:1, среду Тройэлла Т8, среды А2 (Holmes and Wolf, *Biophys. Biochem. Cytol.*, 1961, 10:389-401), среды Веймауса (Waymouth) (Davidson and Waymouth, *Biochem. J.*, 1945, 39(2):188-199), среды Уильямса (William's et al., *Exp. Cell Res.*, 1971, 69:105 et seq.), RPMI 1640 (Moore et al., *J. Amer. Med. Assoc.*, 1967, 199:519-524), среды MCDB 104/110 (Bettger et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1981, 78(9):5588-5592), среды Ventrex HL-1, альбумино-глобулиновые среды (Orr et al., *Appl. Microbiol.*, 1973, 25(1):49-54), среду RPMI-1640, среду RPMI-1641, модифицированную по Искову среду Дульбекко, среду 5 А МакКоя, среду L-15 Лейбовица и бессывороточные среды, такие как серия EX-CELL™ 300 (JRH Biosciences, Lenexa, Kans.), среды протамин-цинк-инсулин (Weiss et al., 1974, патент США № 4072565), среды биотин-фолат (Cartaya, 1978, US Re30985), среды трансферрин-жирная кислота (Baker, 1982, патент США № 4560655), среды трансферрин-EGF (Hasegawa, 1982, патент США № 4615977; Chessebeuf, 1984, патент США № 4786599), и другие сочетания сред (см. Inlow, патент США № 6048728; Drapeau, патент США № 7294484; Mather, патент США № 5122469; Furukawa, патент США № 5976833; Chen, патент США № 6180401;

Chen, патент США № 5856179; Etcheverry, патент США № 5705364; Etcheverry, патент США № 7666416; Ryll, патент США № 6528286; Singh, патент США № 6924124; Luan, патент США № 7429491; и т.п.).

[0061] В определенных вариантах осуществления, среда для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей по изобретениям включает базовую среду, содержащую все необходимые питательные вещества для жизнеспособной клеточной культуры и буфер HEPES. Буфер HEPES может быть компонентом базовой среды, или он может быть добавлен к среде для культивирования клеток. В соответствии с аспектами изобретений, среда для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей содержит менее около 4000 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток (4000 мкмоль примеси HEPES МВ 267,07/моль общего HEPES), и менее чем 400 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток (400 мкмоль примеси HEPES МВ 221,06/моль общего HEPES).

[0062] В качестве примера, количество связанной с HEPES примеси относительно количества присутствующего буфера HEPES обычно относится к относительному содержанию примеси, нормированному по HEPES в среде. Например, относительные количества могут быть определены с использованием стандартных аналитических методик, таких как ВЭЖХ, ЖХ-МС и т.д., где относительное количество (Примесь, ppm)=Площадь пика (Примесь)/Площадь пика (HEPES+Димер HEPES+Аддукты HEPES) X 1000000.

[0063] В определенных вариантах осуществления, среда содержит менее около 4000 ppm, менее около 3500 ppm, менее около 3200 ppm, менее около 3000 ppm, менее около 2900 ppm, менее около 2500 ppm, менее около 2200 ppm, менее около 2000 ppm, менее около 1800 ppm, менее около 1500 ppm, менее около 1200 ppm, менее около 1000 ppm, менее около 800 ppm и т.д. связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток. Другими словами, менее около 4000 мкмоль, менее около 3500 мкмоль, менее около 3200 мкмоль, менее около 3000 мкмоль, менее около 2900 мкмоль, менее около 2500 мкмоль, менее около 2200 мкмоль, менее около 2000 мкмоль, менее около 1800 мкмоль, менее около 1500 мкмоль, менее около 1200 мкмоль, менее около 1000 мкмоль, менее около 800 мкмоль и т.д. примеси HEPES, имеющей МВ 267,07, на моль общего HEPES. В определенных вариантах осуществления, среда содержит менее около 500 ppm, менее около 450 ppm, менее около 400 ppm, менее около 390 ppm, менее около 370 ppm, менее около 350 ppm, менее около 320 ppm, менее около 300 ppm, менее около 250 ppm, менее около 200 ppm, менее около 150 ppm, менее около 100 ppm, менее около 80 ppm, менее около 75 ppm, менее около 70 ppm и т.д. связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток. Другими словами, менее около

500 мкмоль, менее около 450 мкмоль, менее около 400 мкмоль, менее около 390 мкмоль, менее около 370 мкмоль, менее около 350 мкмоль, менее около 320 мкмоль, менее около 300 мкмоль, менее около 250 мкмоль, менее около 200 мкмоль, менее около 150 мкмоль, менее около 100 мкмоль, менее около 80 мкмоль, менее около 75 мкмоль, менее около 70 мкмоль и т.д. примеси HEPES, имеющей МВ 221,06, на моль общего HEPES.

[0064] В определенных вариантах осуществления, среда содержит менее около 4000 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток (4000 мкмоль примеси HEPES МВ 267,07/моль общего HEPES), и менее чем 400 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток (400 мкмоль примеси HEPES МВ 221,06/моль общего HEPES). В других вариантах осуществления, среда содержит менее около 3900 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток, и менее чем 390 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток. В других вариантах осуществления, среда содержит менее около 800 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток, и менее чем 80 ppm связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно количества буфера HEPES, присутствующего в среде для культивирования клеток. При использовании в данном документе, 1 ppm примеси HEPES=1 мкмоль примеси HEPES/моль общего HEPES.

[0065] В других вариантах осуществления, сам буфер HEPES имеет пониженное содержание связанных с HEPES примесей, как описано в данном документе. Например, буфер HEPES может содержать менее около 4000 ppm, менее около 3500 ppm, менее около 3200 ppm, менее около 3000 ppm, менее около 2900 ppm, менее около 2500 ppm, менее около 2200 ppm, менее около 2000 ppm, менее около 1800 ppm, менее около 1500 ppm, менее около 1200 ppm, менее около 1000 ppm, менее около 800 ppm и т.д. связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, относительно общего количества буфера HEPES, которое должно быть использовано с клеточной культурой (например, в средах). Другими словами, менее около 4000 мкмоль, менее около 3500 мкмоль, менее около 3200 мкмоль, менее около 3000 мкмоль, менее около 2900 мкмоль, менее около 2500 мкмоль, менее около 2200 мкмоль, менее около 2000 мкмоль, менее около 1800 мкмоль, менее около 1500 мкмоль, менее около 1200 мкмоль, менее около 1000 мкмоль, менее около 800 мкмоль и т.д. примеси HEPES, имеющей МВ 267,07, на моль общего HEPES. В определенных вариантах осуществления, среда содержит менее около 500 ppm, менее около 450 ppm, менее около 400 ppm, менее около 390 ppm, менее около 370 ppm, менее около 350 ppm, менее около 320 ppm, менее около 300 ppm, менее

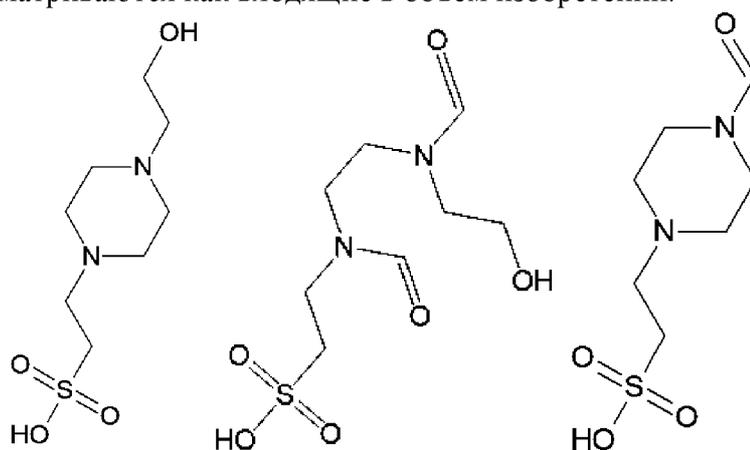
около 250 ppm, менее около 200 ppm, менее около 150 ppm, менее около 100 ppm, менее около 80 ppm, менее около 75 ppm, менее около 70 ppm и т.д. связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, относительно общего количества буфера HEPES, которое должно быть использовано с клеточной культурой (например, в средах). Другими словами, менее около 500 мкмоль, менее около 450 мкмоль, менее около 400 мкмоль, менее около 390 мкмоль, менее около 370 мкмоль, менее около 350 мкмоль, менее около 320 мкмоль, менее около 300 мкмоль, менее около 250 мкмоль, менее около 200 мкмоль, менее около 150 мкмоль, менее около 100 мкмоль, менее около 80 мкмоль, менее около 75 мкмоль, менее около 70 мкмоль и т.д. примеси HEPES, имеющей МВ 221,06, на моль общего HEPES.

[0066] Более конкретно, в соответствии с аспектами изобретений, связанные с HEPES примеси имеют химические формулы и молекулярный вес (МВ), указанные в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

| Предположительное обозначение | Формула | <i>m/z</i> (отрицательный) |
|-------------------------------|----------------|----------------------------|
| HEPES+[O2]-[H2] | C8 H16 N2 O6 S | 267,07 |
| HEPES-[CH4] | C7 H14 N2 O4 S | 221,06 |

[0067] Без намерения ограничиваться теорией, на основании химической формулы и молекулярного веса (МВ) для связанных с HEPES примесей предлагаются следующие химические структуры. Однако изобретения не ограничиваются представлением таких предложенных химических структур, и другие химические структуры, соответствующие химическим формулам и молекулярному весу (МВ) связанных с HEPES примесей, предусматриваются как входящие в объем изобретений.



HEPES HEPES+[O2]-[H2] HEPES-[CH4]

[0068] Среда для культивирования клеток может также подаваться периодически (как в так называемых культурах «периодического процесса с подпиткой»), с добавлением или без добавления дополнительных ингредиентов, таких как полиамины или повышенные концентрации таких компонентов, как аминокислоты, соли, сахара,

витамины, гормоны, факторы роста, буферы, антибиотики, липиды, микроэлементы и т.п., в зависимости от потребностей культивируемых клеток или желательных параметров клеточной культуры.

[0069] В некоторых аспектах среда клеточной культуры может быть обеднена аминокислотами в процессе производства рекомбинантного белка, когда дополнительное добавление аминокислот не проводится, или среда клеточной культуры могут быть «не обедненной», когда обеспечивается добавление расходуемых аминокислот (как описано ниже).

[0070] В одном варианте осуществления, среда дополнительно содержит 100 ± 15 мкМ орнитина, или 300 ± 45 мкМ орнитина, или 600 ± 90 мкМ орнитина, или даже 900 ± 135 мкМ орнитина. В другом варианте осуществления, среда содержит по меньшей мере около 5 ± 1 мг/л орнитина.HCl, или по меньшей мере около 10 ± 2 мг/л орнитина.HCl, $15 \pm 2,25$ мг/л орнитина.HCl, или по меньшей мере около $50 \pm 7,5$ мг/л орнитина.HCl, или по меньшей мере около 100 ± 15 мг/л орнитина.HCl, или по меньшей мере около $150 \pm 22,5$ мг/л орнитина.HCl.

[0071] Необязательно, в среду с добавками может быть добавлен путресцин. Путресцин был включен в очень низких концентрациях в качестве компонента в некоторые составы сред для культивирования клеток; см., например, WO 2005/028626, в котором описывается $0,02$ - $0,08$ мг/л путресцина; патент США № 5426699 ($0,08$ мг/л); патент США № RE30985 ($0,16$ мг/л); патент США № 5811299 ($0,27$ мг/л); патент США № 5122469 ($0,5635$ мг/л); патент США № 5063157 (1 мг/л); WO 2008/154014 (~ 100 – 82 М – ~ 1000 мкМ); патентная заявка США № 2007/0212770 ($0,5$ - 30 мг/л полиамина; 2 мг/л путресцина; 2 мг/л путресцина+ 2 мг/л орнитина; 2 мг/л путресцина+ 10 мг/л орнитина).

[0072] В некоторых вариантах осуществления, в среду для культивирования клеток дополнительно добавляют комбинацию орнитина и путресцина, при этом путресцин может присутствовать в концентрации по меньшей мере от 150 до 720 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, в среды дополнительно добавляют путресцин в концентрации около 170 - 230 мкМ. В одном варианте осуществления, среда содержит 200 ± 30 мкМ путресцина в дополнение к $\geq 90 \pm 15$ мкМ орнитина. В одном варианте осуществления, среда содержит $\leq 30 \pm 4,5$ мг/л путресцина.2HCl в дополнение к $\leq 15 \pm 2,25$ мг/л орнитина. В другом варианте осуществления, среда содержит $\geq 30 \pm 4,5$ мг/л путресцина.2HCl в дополнение к $\geq 15 \pm 2,25$ мг/л орнитина.HCl (см. международную публикацию № WO2014/144198A1, опубликованную 18 сентября 2014 г.).

[0073] В других вариантах осуществления, орнитин присутствует в среде в концентрации в диапазоне от $0,09 \pm 0,014$ mM до $0,9 \pm 0,14$ mM, такой как $0,09 \pm 0,014$ mM, $0,3 \pm 0,05$ mM, $0,6 \pm 0,09$ mM или $0,9 \pm 0,14$ mM орнитина. В некоторых вариантах осуществления, среда также содержит по меньшей мере $0,20 \pm 0,03$ mM путресцина. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный путресцин присутствует в концентрации в диапазоне от $0,20 \pm 0,03$ mM до $0,714 \pm 0,11$ mM, такой как $0,20 \pm 0,03$ mM, $0,35 \pm 0,06$, или $0,714 \pm 0,11$ mM путресцина.

[0074] В других вариантах осуществления, в среду может быть добавлен таурин в концентрации (выраженной в миллимолях на литр) по меньшей мере около 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мМ.

[0075] В культуральную среду могут быть добавлены различные другие добавки, и определение дополнительных подходящих условий находится в компетенции специалиста в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, в среду добавляют смесь аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина, лизина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, валина, аргинина, гистидина, аспарагина, глутамин, аланина, изолейцина, лейцина, метионина, тирозина и триптофана, чтобы она была неистощенной, или по мере необходимости в дополнительных питательных веществах.

[0076] В одном варианте осуществления, в среды дополнительно добавляют около 170-175 мкМ нуклеозидов. В одном варианте осуществления, среды содержат производные пурина в совокупной концентрации по меньшей мере 40 мкМ, по меньшей мере 45 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 55 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ, по меньшей мере 65 мкМ, по меньшей мере 70 мкМ, по меньшей мере 75 мкМ, по меньшей мере 80 мкМ, по меньшей мере 85 мкМ, по меньшей мере 90 мкМ, по меньшей мере 95 мкМ, по меньшей мере 100 мкМ или по меньшей мере 105 мкМ. В одном варианте осуществления, среды содержат около 100-110 мкМ производных пурина. Производные пурина включают гипоксантин и нуклеозиды аденозин и гуанозин. В одном варианте осуществления, среды содержат производные пиримидина в совокупной концентрации по меньшей мере 30 мкМ, по меньшей мере 35 мкМ, по меньшей мере 40 мкМ, по меньшей мере 45 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 55 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ или по меньшей мере 65 мкМ. В одном варианте осуществления, среды содержат около 65-75 мкМ производных пиримидина. Производные пиримидина включают нуклеозиды тимидин, уридин и цитидин. В одном конкретном варианте осуществления, среды содержат аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

[0077] В дополнение к включению любых вышеперечисленных добавок, в одном варианте осуществления, в среды дополнительно добавляют микромолярные количества жирных кислот (или производных жирных кислот) и токоферол. В одном варианте осуществления, жирные кислоты включают любую одну или более из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, тиоктовой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, декановой кислоты, додекановой кислоты, гексановой кислоты, лигноцереновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты. В одном варианте осуществления, среды содержат токоферол, линолевую кислоту и тиоктовую кислоту.

[0078] В одном варианте осуществления, в среды также может быть дополнительно добавлена смесь витаминов, которая включает другие питательные вещества и

незаменимые питательные вещества, в совокупной концентрации по меньшей мере около 700 мкМ или по меньшей мере около 2 мМ. В одном варианте осуществления, смесь витаминов содержит что-то одно или более из D-биотина, холинхлорида, фолиевой кислоты, миоинозита, ниацинамида, пиридоксина HCl, D-пантотеновой кислоты (гемикальциевой соли), рибофлавина, тиамин HCl, витамина B12 и т.п. В одном варианте осуществления, смесь витаминов включает все из D-биотина, холинхлорида, фолиевой кислоты, миоинозита, ниацинамида, пиридоксина HCl, D-пантотеновой кислоты (гемикальциевой соли), рибофлавина, тиамин HCl и витамина B12.

[0079] Различные варианты осуществления сред с пониженным содержанием примесей по изобретениям включают любые комбинации вышеописанных вариантов осуществления, включая химически определенные среды, буфер HEPES, плюс, помимо прочего (a) аминокислоты; (b) необязательно, нуклеозиды; (c) соли двухвалентных катионов; (d) жирные кислоты и токоферол; и (e) витамины.

[0080] В конкретном варианте осуществления, среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей могут быть химически определенными, и могут содержать: буфер HEPES, смеси аминокислот, как описано в данном документе, CaCl₂ 2H₂O; KCl; MgSO₄; NaCl; Na₂HPO₄ или другие фосфатные соли; пируват; D-биотин; холинхлорид; фолиевую кислоту; миоинозит; ниацинамид; пиридоксин HCl; D-пантотеновую кислоту; рибофлавин; тиамин HCl; витамин B12; п-аминобензойную кислоту; этаноламин HCl; полоксамер 188; DL-α-токоферолфосфат; линолевую кислоту; Na₂SeO₃; тиоктовую кислоту; и глюкозу; и необязательно аденозин; гуанозин; цитидин; уридин; тимидин; и гипоксантин 2Na.

[0081] В одном варианте осуществления, исходная осмолярность сред по изобретениям составляет 200-500, 250-400, 275-350 или около 300 мОсм. Во время роста клеток в средах по изобретениям, и в частности, после любой подпитки в соответствии с протоколом культуры с подпиткой, осмолярность культуры может возрастать до около 350, 400, 450, 500 или до около 550 мОсм.

[0082] В некоторых вариантах осуществления, когда осмолярность среды составляет менее около 300, осмолярность может быть доведена до около 300 добавлением одной или более солей сверх указанного количества. В одном варианте осуществления, осмолярность повышают до желательного уровня путем прибавления одного или более осмолитов, выбранных из хлорида натрия, хлорида калия, соли магния, соли кальция, соли аминокислоты, соли жирной кислоты, бикарбоната натрия, карбоната натрия, карбоната калия, хелатирующего агента, представляющего собой соль, сахара (например, галактозы, глюкозы, сахарозы, фруктозы, фукозы и т.д.), и их комбинации. В одном варианте осуществления осмолит добавляют сверх его концентрации в компоненте, уже присутствующем в определенной среде (например, сахар добавляют сверх концентрации, указанной для компонента сахара).

[0083] Все описанные выше варианты осуществления сред, а также любые другие среды, содержащие пониженное количество связанных с HEPES примесей, как описано в

данном документе, называются средами с пониженным содержанием примесей или средами с пониженным содержанием связанных с HEPES примесей. И наоборот, среды, содержащие связанные с HEPES примеси в количестве, превышающем указанные в данном документе уровни, далее называются средами без пониженного содержания примесей или средами без пониженного содержания связанных с HEPES примесей. В некоторых вариантах осуществления, среды без пониженного содержания примесей содержат те же самые базовые среды и добавки, что и среды с пониженным содержанием примесей, за исключением присутствия примесей, описанных в данном документе.

Культура клеток

[0084] В одном аспекте изобретения предусматривают клеточную культуру, включающую клеточную линию, экспрессирующую представляющий интерес рекомбинантный белок в среде с пониженным содержанием примесей, как описано в данном документе. Примеры клеточных линий, которые обычно используются для продуцирования рекомбинантных белков, включают, помимо прочего, первичные клетки, клетки BSC, клетки HeLa, клетки HepG2, клетки LLC-MK, клетки CV-1, клетки COS, клетки VERO, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки CRFK, клетки RAF, клетки RK, клетки TCMK-1, клетки LLCPK, клетки PK15, клетки LLC-RK, клетки MDOK, клетки ВНК, клетки ВНК-21, клетки CHO, клетки CHO-K1, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки 3T3, клетки 293, клетки Per.C6 и клетки куриного эмбриона. В одном варианте осуществления, клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO или один или больше из нескольких специфических вариантов клеток CHO, оптимизированных для крупномасштабного производства белка, например, CHO-K1.

[0085] Другой аспект изобретений относится к способам культивирования клеток с использованием среды с пониженным содержанием примесей, как описано в данном документе, причем использование таких сред усиливает рост рекомбинантных эукариотических клеток, в то же время повышая титр одного или более представляющих интерес рекомбинантных белков, продуцируемых такими клетками, и поддерживая жизнеспособность клеток, в частности, путем использования в производственной культуре и/или системе посевных ферментеров, по сравнению с культивированием таких клеток в средах без пониженного содержания примесей.

[0086] В некоторых аспектах, титр рекомбинантного белка повышается по сравнению с клетками, выращиваемыми в средах без пониженного содержания примесей. В некоторых вариантах осуществления, титр белка, полученного от клеточной культуры в средах с пониженным содержанием примесей по изобретениям, имеет значение на по меньшей мере около 4%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 6%, по меньшей мере около 7%, по меньшей мере около 8%, по меньшей мере около 9%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 11%, по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18%, по меньшей мере около 19%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 21%, по

меньшей мере около 22% больше, по меньшей мере около 23% больше, по меньшей мере около 24% больше, по меньшей мере около 25% больше, по меньшей мере около 26% больше, по меньшей мере около 27% больше, по меньшей мере около 28% больше, по меньшей мере около 29% больше, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35% больше, по меньшей мере около 40% больше, или по меньшей мере около 50% больше, чем титр белка (выход) от клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей. В некоторых вариантах осуществления, титр белка, полученного от клеточной культуры в средах с пониженным содержанием примесей по изобретениям, больше, чем показатели для аналогичных или идентичных клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей.

[0087] В некоторых аспектах, рост клеток (например, скорость удвоения), плотность жизнеспособных клеток, жизнеспособность клеток, и их комбинации, повышаются по сравнению с клетками, выращиваемыми в средах без пониженного содержания примесей.

[0088] В некоторых вариантах осуществления, скорость удвоения жизнеспособных клеток в средах с пониженным содержанием примесей по изобретениям имеет значение на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 21%, по меньшей мере 22%, по меньшей мере 23%, по меньшей мере 24%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 26%, по меньшей мере 27%, по меньшей мере 28%, по меньшей мере 29%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, или по меньшей мере в 3 раза больше, чем скорость удвоения клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей. В некоторых вариантах осуществления, скорость удвоения жизнеспособных клеток в средах с пониженным содержанием примесей по изобретениям имеет значение на около 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, или 30% больше, чем скорость удвоения жизнеспособных клеток в средах без пониженного содержания примесей.

[0089] В некоторых вариантах осуществления, время удвоения активно делящихся клеток млекопитающего составляет менее 30 часов, менее 29 часов, менее 28 часов, менее 27 часов, менее 26 часов, менее 25 часов, менее 24 часов, менее 23 часов, менее 22 часов, менее 21 часов, менее 20 часов, менее 19 часов, или менее 18 часов в средах с пониженным содержанием примесей. В некоторых вариантах осуществления, время удвоения активно растущих клеток млекопитающего составляет менее 28 часов в средах с пониженным содержанием примесей. В некоторых вариантах осуществления, время удвоения клеток млекопитающего составляет около 27 ± 1 часов, около 26 ± 1 часов, около

25±1 часов, около 24±1 часов, около 23±1 часов, около 22±1 часов, или около 21±1 часов в средах с пониженным содержанием примесей. В некоторых вариантах осуществления, время удвоения активно делящихся клеток млекопитающего составляет около 24±1 часов в средах с пониженным содержанием примесей. В некоторых вариантах осуществления, время удвоения активно делящихся клеток, культивируемых в средах с пониженным содержанием примесей, имеет значение на по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19%, по меньшей мере 20%, или по меньшей мере 25% меньше, чем время удвоения активно делящихся клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей.

[0090] Что касается жизнеспособности клеток, то клетки, выращиваемые в средах с пониженным содержанием примесей, демонстрируют жизнеспособность на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 100%, или в по меньшей мере 3 раза больше, чем жизнеспособность клеток, выращиваемых в средах без пониженного содержания примесей.

[0091] В производственном сосуде для культивирования или биореакторе базовая культуральная среда и клетки подаются в сосуд для культивирования после посевной культуры или фазы роста. В определенных вариантах осуществления, клеточный супернатант или клеточный лизат собирают после производственной культуры. В других вариантах осуществления представляющий интерес полипептид или белок выделяют из культуральной среды или клеточного лизата, или используют какие-либо другие способы, в зависимости от местонахождения представляющего интерес белка, используя методы, хорошо известные в данной области техники.

[0092] «Клеточная линия» относится к клетке или клеткам, которые получены из определенной линии путем последовательного пассажа или субкультивирования клеток. Термин «клетки» используется взаимозаменяемо с «клеточной популяцией».

[0093] Термин «клетка» включает любую клетку, которая пригодна для экспрессии последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки эукариот, такие как клетки животных, не являющихся людьми, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки птиц, клетки насекомых, дрожжевые клетки или клеточные слияния, такие как, например, гибридомы или квадромы. В определенных вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления, клетку выбирают из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клеток сетчатки, Vero, CV1, почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцитов, например, клеток Jurkat (Т-лимфоциты) или Дауди (В-лимфоциты),

A431 (эпидермальных), CV-1, U937, 3T3, L-клеток, клеток C127, SP2/0, NS-0, клеток ММТ, стволовых клеток, опухолевых клеток и клеточных линий, полученных из вышеуказанных клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетка включает один или более вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6®). В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку СНО. В других вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку СНО К1.

[0094] В фазе продукции рекомбинантного белка, «клеточная культура периодического процесса с подпиткой» или «периодическая культура с подпиткой» относится к периодической культуре, в которой животные клетки и культуральную среду сначала помещают в емкость для культивирования, и дополнительные питательные вещества для культуры медленно подают, непрерывно или дискретными порциями, в культуру во время культивирования, с периодическим сбором клеток и/или продуктов до окончания культивации или без такого сбора. Культура с подпиткой включает «полунепрерывную периодическую культуру с подпиткой», в которой цельную культуру (которая может включать клетки и среду) периодически удаляют и заменяют свежей средой. Культура с подпиткой отличается от простой «периодической культуры», поскольку в периодической культуре все компоненты для культивирования клеток (включая животные клетки и все питательные вещества для культуры) подаются в емкость для культивирования в начале процесса культивирования. Культура с подпиткой может дополнительно отличаться от перфузионного культивирования тем, что супернатант не удаляют из емкости для культивирования во время процесса, в то время как при перфузионном культивировании клетки удерживаются в культуре с помощью, например, фильтрации, и культуральная среда непрерывно или время от времени подается и удаляется из емкости для культивирования. Однако, во время периодического процесса с подпиткой клеточной культуры предусматривается отбор образцов для тестирования. Периодический процесс с подпиткой продолжается до тех пор, пока не будет определено, что достигнут максимум рабочего объема и/или производства белка.

[0095] Фраза «непрерывная клеточная культура» при использовании в данном документе относится к методике, используемой для непрерывного роста клеток, обычно в определенной фазе роста. Например, если требуется постоянная подача клеток или производство конкретного полипептида или белка, представляющего интерес, клеточная культура может нуждаться в поддержании в определенной фазе роста. Таким образом, условия должны постоянно контролироваться и соответствующим образом корректироваться, для поддержания клеток в этой конкретной фазе.

[0096] Один аспект изобретений относится к посевной культуре, в которой популяция клеток размножается для производства белка и сбора урожая в производственной культуре. В определенных вариантах осуществления, среда для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей может быть использована с посевными клеточными культурами, как описано далее в данном документе.

[0097] Другой аспект изобретений относится к производственной культуре, в которой вырабатывается и собирается белок. Перед фазой продукции обычно наблюдается фаза роста (также известная как посевная серия или посевная культура), когда все компоненты для культивирования клеток подаются в емкость для культивирования в начале процесса культивирования, затем популяция клеток наращивается до готовности к производственному масштабу. Таким образом, емкость для культивирования инокулируется клетками при плотности посева, подходящей для начальной фазы роста клеток, в зависимости от исходной клеточной линии. В некоторых аспектах, среда для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей может быть использована с посевной клеточной культурой для дальнейшего улучшения или повышения продуктивности клеток на последующей фазе продукции. В других вариантах осуществления, среда для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей может быть использована с производственной клеточной культурой, как описано далее в данном документе.

[0098] Емкости для культивирования включают, без ограничения, луночные планшеты, Т-колбы, колбы для встряхивания, сосуды с мешалкой, роллерные колбы, полые волокна, эрлифтные биореакторы и т.п. Пригодная емкость для культивирования клеток представляет собой биореактор. Биореактор относится к любой емкости для культивирования, которая изготовлена или сконструирована для регулирования или контроля условий окружающей среды. Такие емкости для культивирования хорошо известны в данной области техники.

[0099] Биореакторные процессы и системы были разработаны для оптимизации газообмена, обеспечения достаточной подачи кислорода для поддержания роста и продуктивности клеток, а также для удаления CO₂. Поддержание эффективности газообмена является важным критерием для обеспечения успешного масштабирования клеточных культур и производства белков. Такие системы хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00100] В одном варианте осуществления, среду добавляют с некоторыми интервалами во время культивирования клеток в соответствии с технологией процесса с подпиткой. Культивирование по методу периодического процесса с подпиткой общеизвестно в данной области техники и используется для оптимизации производства белка (см. Y. M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* 2010 September-October; 26(5): 1400-10). Периодические процессы с подпиткой обычно используются в фазе продукции.

[00101] Дополнительное питание может осуществляться для включения дополнительных питательных веществ, таких как витамины, аминокислоты и другие питательные вещества, как описано выше, с некоторыми промежутками времени каждый день или каждые 2-3 дня на протяжении времени существования производственной культуры. Дополнительное питание может осуществляться (среды с добавками, содержащими питательные вещества, прибавляют) по меньшей мере 2 раза или по меньшей мере 8 раз на всем протяжении производственной культуры для культур

продолжительностью 2 недели или более. В другом варианте осуществления, дополнительное питание может осуществляться каждый день в течение всего периода культивирования. Также предусматриваются альтернативные графики подпитки культуры.

[00102] Также может производиться дополнительное добавление аминокислот для получения необедненной среды, при этом истощенные аминокислоты определяются в соответствии с методами, известными в данной области техники и описанными в данном документе. При использовании этого режима дополнительные аминокислоты пополняют или добавляют через некоторые промежутки времени, предпочтительно с частотой каждый день или каждые 2-3 дня, в течение всего периода производственной культуры, в зависимости от определения истощения аминокислот. В одном варианте осуществления смесь дополнительных аминокислот для поддержания необедненной среды для культивирования клеток добавляют в культуру в день или в примерно день 1, в день или в примерно день 2, в день или в примерно день 3, в день или в примерно день 4, в день или в примерно день 5, в день или в примерно день 6, в день или в примерно день 7, в день или в примерно день 8, в день или в примерно день 9, в день или в примерно день 10, в день или в примерно день 11, в день или в примерно день 12, в день или в примерно день 13 и в день или в примерно день 14, для культур продолжительностью 2 недели или более. Также предусматриваются альтернативные графики подпитки культуры.

[00103] Эукариотические клетки, такие как клетки СНО, могут культивироваться в мелкомасштабных культурах, таких как в контейнерах на 125 мл, содержащих около 25 мл сред, в контейнерах на 250 мл, содержащих около 50-100 мл сред, в контейнерах на 500 мл, содержащих около 100-200 мл сред. Альтернативно, культуры могут быть крупномасштабными, такими как, например, контейнеры на 1000 мл, содержащие около от 300 до 1000 мл сред, контейнеры на 3000 мл, содержащие около от 500 до 3000 мл сред, контейнеры на 8000 мл, содержащие около от 2000 до 8000 мл сред, и контейнеры на 15000 мл, содержащие около от 4000 до 15000 мл сред. Культуры для производств могут содержать 10000 л сред или больше. Крупномасштабные клеточные культуры, такие как для клинического производства белковых терапевтических средств, обычно поддерживаются на протяжении дней, или даже недель, пока клетки продуцируют желательный белок (белки). На протяжении этого времени культура может подпитываться концентрированной питательной средой, содержащей такие компоненты, как питательные вещества и аминокислоты, которые расходуются в процессе культивирования. Концентрированная питательная среда может быть основана на любых составах сред для культивирования клеток. Такая концентрированная питательная среда может содержать большую часть компонентов среды для культивирования клеток, например, в около 5-кратной, 6-кратной, 7-кратной, 8-кратной, 9-кратной, 10-кратной, 12-кратной, 14-кратной, 16-кратной, 20-кратной, 30-кратной, 50-кратной, 100-кратной, 200-кратной, 400-кратной, 600-кратной, 800-кратной или даже около 1000-кратной концентрации от их нормально используемого количества. Концентрированные питательные среды часто используются в

процессах культур с подпиткой.

[00104] В некоторых вариантах осуществления, в клеточную культуру могут быть дополнительно введены «добавки для применения в месте их использования», также известные как добавки, ингредиенты для применения в месте их использования, или химикаты для применения в месте их использования, в ходе процесса роста клеток или продуцирования белка. Добавки для применения в месте их использования включают любое что-то одно или более из фактора роста или других белков, буфера, источника энергии, соли, аминокислоты, металла и хелатирующего агента. Другие белки включают трансферрин и альбумин. Факторы роста, которые включают цитокины и хемокины, общеизвестны в данной области техники и, как известно, стимулируют рост клеток или, в некоторых случаях, клеточную дифференцировку. Фактор роста обычно представляет собой белок (например, инсулин), малый пептид или стероид гормон, такой как эстроген, ДГЭА, тестостерон и т.п. В некоторых случаях, фактор роста может быть неприродным химикатом, который способствует клеточной пролиферации или продукции белка, таким как, например, тетрагидрофолат (THF), метотрексат и т.п. Неограничивающие примеры белковых и пептидных факторов роста включают ангиопоэтины, костные морфогенетические белки (КМБ), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста и дифференцировки-9 (GDF9), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста из гепатомы (HDGF), инсулин, инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор, стимулирующий миграцию, миостатин (GDF-8), фактор роста нервов (NGF) и другие нейротрофины, фактор роста тромбоцитов (PDGF), тромбопоэтин (TPO), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), агонисты сигнального пути wnt, плацентарный фактор роста (PIGF), фетальный бычий соматотропин (FBS), интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 и т.п. В одном варианте осуществления, в среды для культивирования клеток добавляют инсулиновый фактор роста для применения в качестве добавки на месте его использования. В одном варианте осуществления, концентрация инсулина в средах, т.е., количество инсулина в средах для культивирования клеток после добавления, составляет от около 0,1 мкМ до 10 мкМ.

[00105] Буферы являются общеизвестными в данной области техники. Настоящие изобретения не ограничены каким-либо конкретным буфером или буферами, и любой специалист в данной области техники может выбрать соответствующий буфер или буферную систему для использования с конкретной клеточной линией, продуцирующей определенный белок. В одном варианте осуществления, буфер для добавления на месте его использования представляет собой NaHCO_3 . В другом варианте осуществления, буфер представляет собой HEPES. В других вариантах осуществления, буфер для добавления на

месте его использования содержит как NaHCO_3 , так и HEPES. В вариантах осуществления, когда буфер включает HEPES, буфер HEPES содержит пониженные количества связанных с HEPES примесей, как описано в данном документе.

[00106] Источники энергии для использования в качестве добавок на месте их использования в клеточной культуре также хорошо известны в данной области техники. Без ограничений, в одном варианте осуществления, источником энергии для добавления на месте его использования является глюкоза. Учитывая конкретные и специфические требования конкретной клеточной линии и производимого белка, в одном варианте реализации глюкоза может быть добавлена в среды в концентрации около от 1 до 20 мМ. В некоторых случаях, глюкоза может быть добавлена с высокими уровнями - 20 г/л или выше.

[00107] Хелатирующие агенты, аналогично, хорошо известны в области клеточных культур и продуцирования белков. Тетранатрия ЭДТА дегидратированный и цитрат являются двумя обычными хелатирующими агентами, используемыми в данной области техники, хотя другие хелатирующие агенты могут использоваться в практике настоящих изобретений. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент для добавления на месте его использования представляет собой тетранатрия ЭДТА дигидрат. В одном варианте осуществления, хелатирующий агент для добавления на месте его использования представляет собой цитрат, такой как $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.

[00108] В одном варианте осуществления, среда для культивирования клеток может быть дополнительно дополнена одной или более аминокислотами для добавления на месте их использования в качестве источника энергии, такой как, например, глутамин. В одном варианте осуществления, среды для культивирования клеток дополняют глутамином для добавления на месте его использования, с конечной концентрацией от около 1 мМ до 13 мМ.

[00109] Другие добавки для применения на месте их использования включают одну или более различных солей металлов, таких как соли железа, никеля, цинка и меди. В одном варианте осуществления, среды для культивирования клеток дополняют чем-либо одним или более из сульфата меди, сульфата цинка, хлорида железа(3) и сульфата никеля.

Продуцирование белка

[00110] В дополнение к средам с пониженным содержанием примесей и способам культивирования клеток в таких средах, настоящие изобретения предусматривают способы повышения производительности клеточной культуры, включая повышение титра рекомбинантного белка в производстве рекомбинантного белка путем культивирования рекомбинантных эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные эукариотические клетки содержат стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок. В других вариантах осуществления, способы по изобретениям обеспечивают улучшенный рост клеток (например, скорость удвоения), плотность жизнеспособных клеток, жизнеспособность клеток, и их комбинации.

[00111] В некоторых вариантах осуществления, способы по изобретениям включают обеспечение среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей по изобретениям, культивирование рекомбинантных эукариотических клеток в указанной среде; экспрессию представляющего интерес рекомбинантного белка из рекомбинантных эукариотических клеток и получение более высокого титра рекомбинантного белка из рекомбинантных эукариотических клеток, культивируемых в среде с пониженным содержанием примесей по сравнению с аналогичными или идентичными рекомбинантными эукариотическими клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

[00112] В некоторых вариантах осуществления, выход продукции белка или титр, который может быть выражен в граммах белкового продукта на литр культуральной среды, из клеток, культивируемых в среде с пониженным содержанием примесей, составляет по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 1 г/л, по меньшей мере 1,2 г/л, по меньшей мере 1,4 г/л, по меньшей мере 1,6 г/л, по меньшей мере 1,8 г/л, по меньшей мере 2 г/л, по меньшей мере 2,5 г/л, по меньшей мере 3 г/л, at least, 3,5 г/л, по меньшей мере 4 г/л, по меньшей мере 4,5 г/л, по меньшей мере 5 г/л, по меньшей мере 5,5 г/л, по меньшей мере 6 г/л, по меньшей мере 6,5 г/л, по меньшей мере 7 г/л, по меньшей мере 7,5 г/л, по меньшей мере 8 г/л, по меньшей мере 8,5 г/л, по меньшей мере 9 г/л, по меньшей мере 9,5 г/л, по меньшей мере 10 г/л, по меньшей мере 15 г/л или по меньшей мере 20 г/л.

[00113] В некоторых вариантах осуществления, титр белка, полученного из клеток, культивируемых в среде с пониженным содержанием примесей, имеет значение на по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 4%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 6%, по меньшей мере около 7%, по меньшей мере около 8%, по меньшей мере около 9%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 11%, по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18%, по меньшей мере около 19%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 21%, по меньшей мере около 22%, по меньшей мере около 23% больше, по меньшей мере около 24% больше, по меньшей мере около 25% больше, по меньшей мере около 26% больше, по меньшей мере около 27% больше, по меньшей мере около 28% больше или по меньшей мере около 29% больше, чем титр белка (выход) из аналогичных или идентичных клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей.

[00114] В некоторых вариантах осуществления, титр (выход) белка клеток млекопитающего, культивируемых в среде с пониженным содержанием примесей, описанных в данном документе, имеет значение на по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 0,5 г/л, по меньшей мере 1 г/л, по меньшей мере 1,2 г/л, по меньшей мере 1,4 г/л, по меньшей мере 1,6 г/л, по меньшей мере 1,8 г/л, по меньшей мере 2 г/л, по меньшей мере 2,5 г/л больше, чем титр белка аналогичных или идентичных клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей.

[00115] Способы по изобретениям полезны для улучшения производства белка в процессах с использованием клеточных культур. Клеточные линии, используемые в изобретениях, могут быть генетически модифицированы для экспрессии рекомбинантного белка, представляющего коммерческий или научный интерес. Генетическая модификация клеточной линии включает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток молекулой рекомбинантного полинуклеотида, или иное изменение (например, путем гомологичной рекомбинации и активации гена или слияния рекомбинантной клетки с нереккомбинантной клеткой), вызывающее экспрессию клеткой-хозяином желательного рекомбинантного полипептида. Способы и векторы для генетической модификации клеток или клеточных линий с целью экспрессии полипептида, представляющего интерес, хорошо известны специалистам в данной области техники; например, различные методики проиллюстрированы в *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, и ежеквартальные обновления); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R. J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69. Широкое разнообразие клеточных линий, пригодных для выращивания в культуре, доступно от Американской коллекции типовых культур (Манассас, штат Вирджиния) и коммерческих поставщиков.

[00116] В некоторых вариантах осуществления, белковый продукт (белок, представляющий интерес) представляет собой антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')₂, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

[00117] В некоторых вариантах осуществления, антитело выбирают из группы, состоящей из антитела против белка программируемой гибели клеток 1 (например, анти-PD1 антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0203579A1), антитела против лиганда белка программируемой гибели клеток 1 (например, анти-PD-L1 антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0203580A1), анти-DP4 антитела, антитела против ангиопоэтина-2 (например, анти-ANG2 антитела как описано в патенте США № 9402898), антитела против ангиопоэтин-подобного белка 3 (например, анти-AngPt13 антитела, как описано в патенте США № 9018356), антитела против рецептора тромбоцитарного фактора роста (например, анти-PDGFR антитела, как

описано в патенте США № 9265827), анти-Erb3 антитела, антитела против пролактинового рецептора (например, анти-PRLR антитела, как описано в патенте США № 9302015), антитела против компонента 5 комплемента (например, анти-C5 антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0313194A1), анти-TNF антитела, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, анти-EGFR антитела, как описано в патенте США № 9132192 или анти-EGFRvIII антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0259423A1), антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексин-9 (например, анти-PCSK9 антитела, как описано в патенте США № 8062640 или в публикации патентной заявки США № US2014/0044730A1), антитела против фактора роста и дифференцировки-8 (например, анти-GDF8 антитела, также известного как антитело против миостатина, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагон (например, анти-GCGR антитела, как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), анти-VEGF антитела, анти-IL1R антитела, антитела против рецептора интерлейкина 4 (например, анти-IL4R антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2014/0271681A1 или патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела против рецептора интерлейкина 6 (например, анти-IL6R антитела, как описано в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), анти-IL1 антитела, анти-IL2 антитела, анти-IL3 антитела, анти-IL4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL6 антитела, анти-IL7 антитела, против интерлейкина 33 (например, анти-IL33 антитела, как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0271658A1 или US2014/0271642A1), антитела против респираторного синцитиального вируса (например, анти-RSV антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2014/0271653A1), антитела против кластера дифференцировки 3 (например, анти-CD3 антитела, как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1, и в заявке США № 62/222605), против кластера дифференцировки 20 (например, анти-CD20 антитела, как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1, и в патенте США № 7879984), анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, антитела против кластера дифференцировки 48 (например, анти-CD48 антитела, как описано в патенте США № 9228014), анти-Fel d1 антитела (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела против вируса ближневосточного респираторного синдрома (например, анти-MERS антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0337029A1), антитела против вируса Эбола (например, как описано в публикации патентной заявки США № US2016/0215040), антитела против вируса Зика, антитела против гена активации лимфоцитов 3 (например, анти-LAG3 антитела, или анти-CD223 антитела), антитела против фактора роста нервов (например, анти-NGF антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2016/0017029 и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела против активина А. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело выбирают из группы, состоящей из биспецифического анти-CD3×анти-CD20

антитела (как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела против CD3×муцина 16 (например, биспецифического анти-CD3×анти-Muc16 антитела), и биспецифического антитела против CD3×простат-специфического мембранного антигена (например, биспецифического анти-CD3×анти-PSMA антитела).

[00118] В некоторых вариантах осуществления, белок, представляющий интерес, выбирают из группы, состоящей из алирокумаба, атоливимаба, мафтивимаба, одесивимаба, одесивимаба-ebgn, касиривимаба, имдевимаба, цемиплимаба, цемиплимаба-gwlc, дупилумаба, эвинакумаба, эвинакумаба-dgnb, фасинумаба, несвакумаба, тревогрумаба, ринукумаба и сарилумаба.

[00119] В некоторых вариантах осуществления, белок, представляющий интерес, представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления, Fc-слитый белок представляет собой слитый белок Fc-рецептора, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, сопряженных с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, Fc-фрагмент включает шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок Fc-рецептора содержит две или больше разных цепей рецептора, которые связываются с одним лигандом или с различными лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, белок-ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6927044), или белок-ловушка VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 VEGF-рецептора Flt1, слитый с Ig-доменом 3 VEGF-рецептора Flk1, слитым с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления, Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или более из одного или более антигенсвязывающих доменов, таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи антитела, сопряженного с Fc-фрагментом.

[00120] Дополнительно, включены мини-ловушки, которые представляют собой белки-ловушки, использующие мультимеризующий компонент (МС) вместо Fc-участка, и раскрыты в патентах США №№ 7279159 и 7087411.

[00121] Также включены производные, компоненты, домены, цепи и фрагменты вышеперечисленного.

[00122] Настоящие изобретения не ограничены каким-либо конкретным типом клеток для продуцирования рекомбинантного белка. Примеры типов клеток, пригодных для продуцирования рекомбинантного белка, включают клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки птиц, бактериальные клетки и дрожжевые клетки. Клетки могут быть стволовыми клетками или рекомбинантными клетками, трансформированными вектором для экспрессии рекомбинантного гена, или клетками, трансфицированными вирусом для

продуцирования вирусных продуктов. Клетки могут содержать рекомбинантный гетерологичный полинуклеотидный конструкт, который кодирует белок, представляющий интерес. Этот конструкт может быть эписомой или он может быть элементом, который физически интегрирован в геном клетки. Клетки могут также продуцировать белок, представляющий интерес, без кодирования такого белка в гетерологичном полипептидном конструкте. Другими словами, клетка может естественным образом кодировать представляющий интерес белок, как, например, В-клетка, вырабатывающая антитело. Клетки могут также быть первичными клетками, такими как клетки куриного эмбриона, или первичными клеточными линиями.

[00123] Примеры пригодных клеток включают CHO, COS, клетки сетчатки, Vero, CV1, почку, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцит, A431, CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, клетки ММТ, стволовые клетки, опухолевые клетки и клеточные линии, полученные из вышеназванных клеток. В различных вариантах осуществления, клеточная линия является производной от клеток CHO, такой как мутантные линии CHO-K1, CHO DUX B-11, CHO DG-44, Veggie-CHO, GS-CHO, S-CHO или CHO Iес.

[00124] Фаза продукции может проводиться в любом масштабе культуры, от колб-шейкеров или одноразовых биореакторов типа wave bag, до однолитровых биореакторов и крупномасштабных промышленных биореакторов. Аналогично, фаза расширения в системе посевных ферментеров может проводиться в любом масштабе культуры, от колб-шейкеров или одноразовых биореакторов wave bag, до однолитровых биореакторов и биореакторов большего размера. Крупномасштабный процесс может проводиться в объеме от около 100 литров до 20000 литров или больше. Для контроля производства белка можно использовать одно или более из нескольких средств, таких как температурный сдвиг или химическая индукция. Фаза роста может протекать при более высокой температуре, чем фаза продукции. Например, фаза роста может протекать при первой температуре около 35-38 °С, и фаза продукции может протекать при второй температуре около 29-37 °С, необязательно, около 30-36°С или около 30-34 °С. Кроме того, химические индукторы продуцирования белка, такие как кофеин, бутират, тамоксифен, эстроген, тетрациклин, доксициклин и гексаметиленбисацетамид (НМВА), могут быть добавлены одновременно с, до или после температурного сдвига. Если индукторы добавляются после температурного сдвига, они могут быть добавлены в период времени от одного часа до пяти дней после температурного сдвига, такой как от одного до двух дней после температурного сдвига. Производственные клеточные культуры могут работать как система с непрерывным питанием, как в хемостате (см. С. Altamirano et al., 2001, supra), или в соответствии с периодическим процессом с подпиткой (Huang, 2010, supra).

Выбор сред и буфера

[00125] Другие аспекты изобретений относятся к способам скрининга сред для культивирования клеток или буфера HEPES с целью выбора для использования в

клеточной культуре, чтобы повысить тем самым производительность клеточной культуры, например, повысить титр белка, ускорить рост клеток, увеличить плотность жизнеспособных клеток и т.д. Такие способы могут быть использованы для выбора сред с пониженным содержанием примесей в соответствии с изобретениями для использования в клеточной культуре, или для выбора буфера HEPES с пониженным содержанием примесей для использования в клеточной культуре.

[00126] В некоторых вариантах осуществления, предусматривается способ выбора среды для культивирования клеток для использования в клеточной культуре с целью повышения производительности клеточной культуры. Способ может обычно включать: обеспечение среды для культивирования клеток, содержащей буфер HEPES; анализ среды для культивирования клеток, содержащей буфер HEPES, для определения количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, и количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, присутствующих в среде для культивирования клеток; и выбор среды для культивирования клеток, содержащей буфер HEPES, для использования в клеточной культуре, если будет определено, что среда для культивирования клеток, содержащая буфер HEPES, имеет пониженное содержание связанных с HEPES примесей, описанных в данном документе. В соответствии с изобретениями, использование среды для культивирования клеток, выбранной в соответствии с таким способом, повышает производительность клеточной культуры, по сравнению с производительностью клеточной культуры в средах для культивирования клеток без пониженного содержания примесей HEPES.

[00127] В других вариантах осуществления, предусматривается способ выбора буфера HEPES для использования в клеточной культуре с целью повышения производительности клеточной культуры. Способ может обычно включать: обеспечение буфера HEPES; анализ буфера HEPES для определения количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 267,07, и количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес (МВ) 221,06, присутствующих в буфере HEPES; и выбор буфера HEPES для использования в клеточной культуре, если будет определено, что буфер HEPES имеет пониженное содержание связанных с HEPES примесей, описанных в данном документе. В соответствии с изобретениями, использование буфера HEPES, выбранного в соответствии с таким способом, повышает производительность клеточной культуры по сравнению с производительностью клеточной культуры с буфером HEPES без пониженного содержания примесей.

[00128] Любой пригодный способ анализа сред или буфера HEPES для количественного определения присутствия связанных с HEPES примесей может быть использован в связи со способами, раскрытыми в данном документе. Аналитические методики для использования в соответствии с изобретениями включают ВЭЖХ, ЖХ-МС и другие методики, включая все методики анализа, разделения и очистки, раскрытые в данном документе.

[00129] Настоящие изобретения не ограничены в объеме конкретными вариантами

осуществления, описанными в данном документе, которые предназначены для иллюстрации отдельных аспектов или вариантов осуществления изобретений. Функционально эквивалентные способы и компоненты входят в объем изобретений. Различные модификации изобретений, помимо описанных в данном документе, очевидны специалистам в данной области техники из приведенного выше описания и сопроводительных чертежей. Такие модификации входят в объем изобретений.

ПРИМЕРЫ

[00130] Следующие примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны ограничивать объем изобретений.

ПРИМЕР 1 - ИДЕНТИФИКАЦИЯ СВЯЗАННЫХ С НЕРЕС ПРИМЕСЕЙ

[00131] Был проведен анализ ANOVA генеалогии партий для 53 различных компонентов химически определенных сред между партиями, использованными в клеточных культурах с «высокими титрами» продукции и клеточных культурах с «низкими титрами» продукции. Кислота и соль НЕРЕС были идентифицированы как компоненты «высокого риска», продемонстрировавшие самую сильную корреляцию с конечным титром (корреляция была сильнее, чем корреляция между титром и средой в целом). НЕРЕС также был идентифицирован как «компонент высокого риска» в независимом анализе на основе оценки рисков, который учитывает весовые доли компонентов в составах сред, чистоту компонентов согласно сертификатам анализов (СОА) и способы их получения.

[00132] В качестве последующих исследований были проведены ИКФ и рамановский спектроскопический анализы партий сред. Была обнаружена сильная корреляция между конечным титром и поглощением в определенных областях ИКФ-спектров сред, которые были отнесены к НЕРЕС (на основании известных особенностей спектров НЕРЕС) и позже подтверждены сравнением с ИКФ-спектрами образцов, сохраняющих НЕРЕС. Спектральные различия между партиями с «низкими титрами» и «высокими титрами» продукции сопоставляли с наблюдаемыми результатами определения титров. Были получены данные от дополнительных партий сред и использованы для построения прогностической модели определения титра входящих партий сред.

[00133] Также было обнаружено, что несколько полос в рамановских спектрах CDM1B имеют сильную корреляцию с конечным титром. Аналогично ИКФ-анализу, эти полосы были отнесены к НЕРЕС путем сопоставления рамановских спектров сред со спектрами образцов, сохраняющих НЕРЕС.

[00134] После идентификации НЕРЕС как компонента «высокого риска» с сильной корреляцией с конечным титром, был проведен анализ химического состава партий буфера НЕРЕС, включая ЖХ-МС и оценку корреляции титров. На основании этих исследований были определены две связанные с НЕРЕС примеси, которые продемонстрировали отрицательную корреляцию с титром для всех проанализированных производственных партий.

[00135] Для двух идентифицированных связанных с HEPES примесей были определены химическая формула и молекулярный вес (МВ), представленные в таблице 2 ниже.

ТАБЛИЦА 2

| Предположительное обозначение | Формула | <i>m/z</i> (отрицательный) |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------|
| HEPES+[O ₂]-[H ₂] | C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₆ S | 267,07 |
| HEPES-[CH ₄] | C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S | 221,06 |

[00136] В таблице 3 ниже приведены все идентифицированные примеси, включая HEPES+[O₂]-[H₂] и HEPES-[CH₄].

ТАБЛИЦА 3

| Предположительное обозначение | Формула | <i>m/z</i> (отрицательный) | Коэффициент корреляции Пирсона | | |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | | | 5 партий соли HEPES | 20 партий CDM1B (Ренс (Rens)) | 7 партий CDM1B (Гел (Geel)) |
| Винилсульфоновая кислота | C ₂ H ₄ O ₃ S | 106,98 | -0,60 | 0,16 | 0,41 |
| HEPES+[O ₂]-[H ₂] | C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₆ S | 267,07 | -0,82 | -0,77 | -0,68 |
| HEPES+[O]-[H ₂] | C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₅ S | 251,07 | -0,80 | 0,17 | -0,22 |
| HEPES-[CH ₄] | C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S | 221,06 | -0,85 | -0,68 | -0,83 |
| Ацетамидометансульфоновая кислота | C ₃ H ₇ N O ₄ S | 152,00 | -0,81 | -0,78 | -0,34 |
| HEPES+[O] | C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₅ S | 253,09 | -0,95 | -0,20 | -0,03 |
| 2,2-Дигидроксиэтансульфоновая кислота | C ₂ H ₆ O ₅ S | 140,99 | -0,85 | н.д. | н.д. |
| HEPES-[C ₂ H ₆]+[O] | C ₆ H ₁₂ N ₂ | 223,04 | -0,74 | н.д. | н.д. |

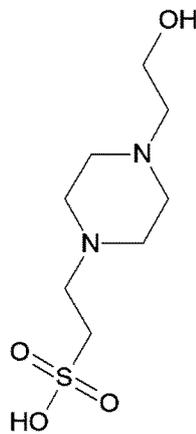
| | | | | | |
|---------------------------------------|------|--|--|--|--|
| <i>[SO3-содержащие]</i> соединения | O5 S | | | | |
|---------------------------------------|------|--|--|--|--|

[00137] Неожиданно, примеси, идентифицированные ниже в таблице 4 (соединения таблицы 4), не оказывали негативного влияния на клеточный титр, несмотря на то, что многие из них присутствовали в большем количестве, чем HEPES+[O2]-[H2] и HEPES-[CH4]. Одно или более из соединений таблицы 4 могут присутствовать в культуральной среде, не оказывая чрезмерного неблагоприятного воздействия на клетки.

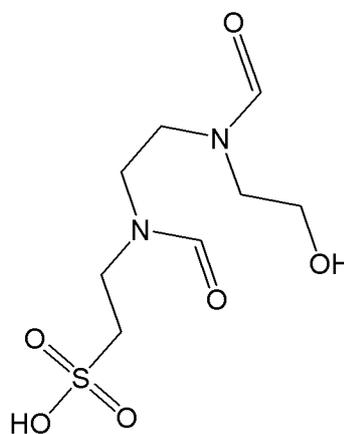
ТАБЛИЦА 4

| Предположительное обозначение |
|--------------------------------------------------------|
| Винилсульфоновая кислота |
| HEPES+[O]-[H2] |
| Ацетамидометансульфоновая кислота |
| HEPES+[O] |
| 2,2-Дигидроксиэтансульфоновая кислота |
| HEPES-[C2H6]+[O] <i>[SO3-содержащие]</i> соединения |

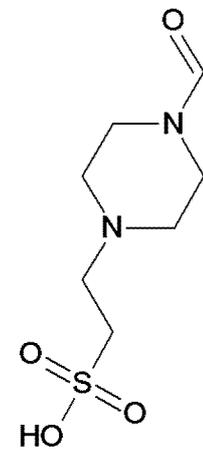
[00138] Без намерения ограничиваться теорией, на основании химической формулы и молекулярного веса (МВ) для связанных с HEPES примесей предлагаются следующие химические структуры. Однако изобретения не ограничены представлением этих предложенных химических структур, и другие химические структуры, соответствующие химическим формулам и молекулярным массам связанных с HEPES примесей, предусмотрены как входящие в объем изобретений.



HEPES



HEPES+[O2]-[H2]



HEPES-[CH4]

ПРИМЕР 2 - СВЯЗАННЫЕ С НЕРЕС ПРИМЕСИ ОТРИЦАТЕЛЬНО КОРРЕЛИРУЮТ С ТИТРОМ

[00139] Были проведены крупномасштабные производственные испытания производства дупилумаба на нескольких площадках. В соответствии с изобретениями, было обнаружено, что количество связанных с НЕРЕС примесей, как описано в данном документе, влияет на титр белка. Исходя из полученных результатов и в соответствии с изобретениями, улучшенный титр белка может быть получен при использовании сред с пониженным содержанием связанных с НЕРЕС примесей, в соответствии с изобретениями.

[00140] Фиг. 1 иллюстрирует зависимость между относительными количествами НЕРЕС+[O2]-[H2] и титром белка. Фиг. 2А и 2В демонстрируют отрицательную корреляцию между титром и НЕРЕС+[O2]-[H2] для нескольких производственных партий дупилумаба на двух разных площадках (Фиг. 2А, 20 производственных партий на площадке 1; Фиг. 2В, 7 производственных партий на площадке 2). Сводные данные по результатам аппроксимации приведены под каждым из графиков Фиг. 2А и 2В.

[00141] Фиг. 3 иллюстрирует зависимость между относительными количествами НЕРЕС-[СН4] и титром белка. Фиг. 4А и 4В демонстрируют отрицательную корреляцию между титром и НЕРЕС-[СН4] для нескольких производственных партий дупилумаба на двух разных площадках (Фиг. 4А, 20 производственных партий на площадке 1; Фиг. 4В, 7 производственных партий на площадке 2). Сводные данные по результатам аппроксимации приведены под каждым из графиков Фиг. 4А и 4В.

[00142] Как видно на фигурах, как на площадке 1, так и на площадке 2, НЕРЕС+[O2]-[H2] и НЕРЕС-[СН4] оба показывали более высокое содержание в производственных партиях с более низким титром и демонстрировали отрицательную корреляцию с титром. Схожие результаты, полученные на разных производственных площадках, повышают степень достоверности определения того, что большее содержание НЕРЕС+[O2]-[H2] и НЕРЕС-[СН4] отрицательно коррелирует с титром.

ПРИМЕР 3 - ВЫЯСНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПРИМЕСЕЙ В БУФЕРЕ НЕРЕС

[00143] НЕРЕС+[O2]-[H2] и НЕРЕС-[СН4] были выделены из НЕРЕС с использованием колонки для жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (ННЛС) (на Фиг. 5А показана мишень). Для дальнейшего разделения НЕРЕС+[O2]-[H2] и НЕРЕС-[СН4] с другими примесями НЕРЕС, которые собирались во фракции, получаемой при разделении методом ННЛС, использовали колонку смешанного режима (на Фиг. 5В показана мишень). Комбинация обеих колонок может быть использована для дополнительной очистки НЕРЕС+[O2]-[H2] и НЕРЕС-[СН4].

[00144] Структуры НЕРЕС+[O2]-[H2] и НЕРЕС-[СН4] были подтверждены с использованием обращенно-фазовой жидкой хроматографии-масс-спектрометрии (ОФ-ЖХ/МС), жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий-масс-спектрометрии (ННЛС-ЖХ/МС), и МС/МС фрагментации. Фиг. 6А представляет собой полученный методом ОФ-ЖХ/МС график НЕРЕС-[СН4] (также обозначаемого как «221»),

выделенного из исходного материала HEPES. Фиг. 6B представляет собой полученный методом HPLC-ЖХ/МС график HEPES-[CH₄], выделенного из исходного материала HEPES. Фиг. 7 показывает МС/МС фрагментацию HEPES-[CH₄], выделенного из исходного материала HEPES.

ПРИМЕР 4 - БЕЛКИ

[00145] Настоящие изобретения могут быть использованы в производстве биологических и фармацевтических продуктов и применимы для размножения клеток, содержащих гены, кодирующие представляющие интерес белки, и каждый вариант осуществления и пример, раскрытый в данной заявке, может быть использован вместе с описанными ниже в производстве биологических и фармацевтических продуктов. Такие белки могут включать, без ограничений, антитела, рецепторы, слитые белки, антагонисты, ингибиторы, ферменты (такие как используемые в ферментной заместительной терапии), факторы и кофакторы, цитокины, хемокины, репрессоры, активаторы, лиганды, репортерные белки, селективные белки, белковые гормоны, белковые токсины, структурные белки, запасные белки, транспортные белки, нейротрансмиттеры и сократительные белки. Конкретные типы белков, которые могут продуцироваться в соответствии с изобретениями, описаны более подробно ниже.

[00146] Антитела (также называемые «иммуноглобулины») являются примерами белков, имеющих несколько полипептидных цепей и обширные посттрансляционные модификации. Канонический иммуноглобулиновый белок (например, IgG) включает четыре полипептидных цепи - две легких и две тяжелых цепи. Каждая легкая цепь связана с одной тяжелой цепью с помощью цистеиновой дисульфидной связи, и две тяжелых цепи связаны друг с другом с помощью двух цистеиновых дисульфидных связей. Иммуноглобулины, вырабатываемые в системах млекопитающих, также являются гликозилированными по различным остаткам (например, по остаткам аспарагина) различными полисахаридами, и могут различаться для разных видов, что может влиять на антигенность терапевтических антител. Butler and Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", *Curr. Opin. Biotech.* 30:107-112 (2014).

[00147] Константная область тяжелой цепи антитела содержит три домена - CH₁, CH₂ и CH₃. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно разделены на области гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с областями, являющимися более консервативными, которые называются каркасными участками (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR₁, CDR₁, FR₂, CDR₂, FR₃, CDR₃, FR₄ (CDR тяжелой цепи могут сокращенно обозначаться HCDR₁, HCDR₂ и HCDR₃; CDR легкой цепи могут сокращенно обозначаться LCDR₁, LCDR₂ и LCDR₃). Термин «высокоаффинное» антитело относится к антителам, имеющим

аффинность связывания со своей мишенью по меньшей мере 10^{-9} M, по меньшей мере 10^{-10} M; по меньшей мере 10^{-11} M; или по меньшей мере 10^{-12} M, при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, или путем определения сродства в растворе методом твердофазного иммуноферментного анализа.

[00148] Легкие цепи антитела включают последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина любого организма и, если не указано иное, включают легкие цепи каппа и лямбда человека. Вариабельные (VL) домены легкой цепи типично включают три CDR легкой цепи и четыре каркасные (FR) области, если не указано иное. В общем, полноразмерная легкая цепь включает, от аминоконца к карбоксильному концу, домен VL, который включает FR1-CDR1- FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые могут быть использованы с настоящими изобретениями, включают, например, такие, которые не связывают селективно либо первый, либо второй антиген, селективно связываемый антигенсвязывающим белком. Пригодные легкие цепи включают такие, которые могут быть идентифицированы путем скрининга наиболее часто используемых легких цепей в существующих библиотеках антител («мокрых» библиотеках или *in silico*), причем легкие цепи по существу не влияют на аффинность и/или селективность антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих белков. Подходящие легкие цепи включают такие, которые могут связывать один или оба эпитопа, связываемые антигенсвязывающими областями антигенсвязывающего белка.

[00149] Вариабельные домены антитела включают аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (при желании модифицированную), которая включает следующие аминокислотные области, по порядку от N-конца к C-концу (если не указано иное): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. «Вариабельный домен» включает аминокислотную последовательность, способную к укладке в канонический домен (VH или VL), имеющий структуру сдвоенного бета-слоя, в которой бета-слои соединены дисульфидными связями между остатками первого бета-листа и второго бета-листа.

[00150] Определяющая комплементарность область («CDR») антитела включает аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты генов иммуноглобулина организма, которая в обычных условиях (т.е., у животного дикого типа) расположена между двумя каркасными областями в вариабельной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитела или T-клеточного рецептора). CDR может кодироваться, например, последовательностью зародышевой линии или перестроенной или неперестроенной последовательностью, и, например, наивной или зрелой B-клеткой или T-клеткой. В некоторых случаях (например, для CDR3), CDR могут кодироваться двумя или более последовательностями (например, последовательностями зародышевой линии), которые не являются смежными (например, в последовательности нуклеиновой кислоты, не подвергнутой перестройке), но являются смежными в последовательности нуклеиновой кислоты B-клетки, например, в результате сплайсинга или соединения последовательностей (например, V-D-J рекомбинации с

образованием тяжелой цепи CDR3). Каждый из вышеперечисленных компонентов антител может быть получен в соответствии с изобретениями.

[00151] Биспецифические антитела включают антитела, способные селективно связывать два или больше эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две разных тяжелых цепи, причем каждая из тяжелых цепей специфически связывается с разными эпитопами - либо на двух разных молекулах (например, антигенах), либо на одной молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связываться с двумя разными эпитопами (первым эпитопом и вторым эпитопом), то аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет на по меньшей мере от одного до двух, трех или четырех порядков величины ниже аффинности первой тяжелой цепи ко второму эпитопу, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или на разных мишенях (например, на одном и том же или на разных белках). Биспецифические антитела могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут экспрессироваться в клетке, экспрессирующей легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело содержит две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за ними следуют (от N-конца к С-концу) домен СН1, шарнир, домен СН2 и домен СН3, и легкая цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может ассоциироваться с любой из тяжелых цепей, либо может ассоциироваться с любой из тяжелых цепей и связываться с одним или более эпитопами, связываемыми антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, либо может ассоциироваться с любой из тяжелых цепей и обеспечивать возможность связывания одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами, и может быть получено в соответствии с изобретениями.

[00152] Например, для вариантов осуществления антител, изобретения могут быть изменены для исследовательского и промышленного применения для диагностики и терапии на основе всех основных классов антител, а именно IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Предпочтительным классом является IgG, таким как IgG1 (включая IgG1 λ и IgG1 κ), IgG2 и IgG4. Примеры антител, которые могут быть получены в соответствии с изобретениями, включают алирокумаб, атоливимаб, мафтивимаб, одесивимаб, одесивимаб-ebgn, касиривимаб, имдевимаб, цемиплимаб, цемиплимаб-rwlc, дупилумаб, эвинакумаб, эвинакумаб-dgnb, фасинумаб, несвакумаб, тревогрумаб, ринукумаб и сарилумаб. Дополнительные варианты осуществления антител включают антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, фрагмент

Fab или фрагмент F(ab')₂, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3, или антитело IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

[00153] В дополнительных вариантах осуществления, антитело выбирают из группы, состоящей из антитела против белка программируемой гибели клеток 1 (например, анти-PD1 антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0203579A1), антитела против лиганда белка программируемой гибели клеток 1 (например, анти-PD-L1 антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0203580A1), анти-Dll4 антитела, антитела против ангиопоэтина-2 (например, анти-ANG2 антитела, как описано в патенте США № 9402898), антитела против ангиопоэтин-подобного белка 3 (например, анти-AngPt13 антитела, как описано в патенте США № 9018356), антитела против рецептора тромбоцитарного фактора роста (например, анти-PDGFR антитела, как описано в патенте США № 9265827), анти-Erb3 антитела, антитела против пролактинового рецептора (например, анти-PRLR антитела, как описано в патенте США № 9302015), антитела против компонента 5 комплемента (например, анти-C5 антитела, как описано в публикации патентной заявки США No US2015/0313194A1), анти-TNF антитела, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, анти-EGFR антитела, как описано в патенте США № 9132192, или анти-EGFRvIII антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0259423A1), антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексин-9 (например, анти-PCSK9 антитела, как описано в патенте США № 8062640 или в публикации патентной заявки США № US2014/0044730A1), антитела против фактора роста и дифференцировки-8 (например, анти-GDF8 антитела, также известного как антитело против миостатина, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагона (например, анти-GCGR антитела, как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), анти-VEGF антитела, анти-IL1R антитела, антитела против рецептора интерлейкина 4 (например, анти-IL4R антитела, как описано в публикациях патентных заявок США № US2014/0271681A1 или патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела против рецептора интерлейкина 6 (например, анти-IL6R антитела, как описано в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), анти-IL1 антитела, анти-IL2 антитела, анти-IL3 антитела, анти-IL4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL6 антитела, анти-IL7 антитела, антитела против интерлейкина 33 (например, анти-IL33 антитела, как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0271658A1 или US2014/0271642A1), антитела против респираторного

синцитиального вируса (например, анти-RSV антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2014/0271653A1), антитела против кластера дифференцировки 3 (например, анти-CD3 антитела, как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1, и в заявке США № 62/222605), антитела против кластера дифференцировки 20 (например, анти-CD20 антитела, как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1, и в патенте США № 7879984), анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, антитела против кластера дифференцировки 48 (например, анти-CD48 антитела, как описано в патенте США № 9228014), анти-Fel d1 антитела (например, как описано в патенте США № 9079948), средства для лечения SARS-CoV-2 (REGN-COVTM, включающего касиривимаб и имдевимаб), антитела против вируса ближневосточного респираторного синдрома (например, анти-MERS антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0337029A1), коктейля антител против вируса Эбола ((REGN-EB3, включающего атолтвивимаб, мафтвивимаб и одесивимаб-ebgn (INMAZEB®)), антитела против вируса Эбола (например, как описано в публикации патентной заявки США № US2016/0215040), антитела против вируса Зика, антитела против гена активации лимфоцитов 3 (например, анти-LAG3 антитела или анти-CD223 антитела), антитела против фактора роста нервов (например, анти-NGF антитела, как описано в публикации патентной заявки США № US2016/0017029 и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела против активина А. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело выбирают из группы, состоящей из биспецифического анти-CD3 x анти-CD20 антитела (как описано в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического анти-CD3 x анти-муцин 16 антитела (например, биспецифического анти-CD3 x анти-Muc16 антитела), и биспецифического анти-CD3 x анти-простат-специфический мембранный антиген антитела (например, биспецифического анти-CD3 x анти-PSMA антитела). См. также публикацию патента США № US 2019/0285580 A1.

[00154] Производные и фрагменты антител могут быть адаптированы для производства в соответствии с изобретениями, и включают, без ограничений: фрагменты антител (например, ScFv-Fc, dAB-Fc, половинные антитела), мультиспецифические средства (например, IgG-ScFv, IgG-dab, ScFV-Fc-ScFV, триспецифические) и Fc-слитые белки (например, Fc-слитый (N-концевой), Fc-слитый (C-концевой), моно-Fc-слитый, биспецифический Fc-слитый). Фраза «Fc-содержащий белок» включает антитела, биспецифические антитела, производные Fc-содержащих антител, фрагменты Fc-содержащих антител, Fc-слитые белки, иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые содержат по меньшей мере функциональную часть области CH2 и CH3 иммуноглобулина. «Функциональная часть» относится к области CH2 и CH3, которая может связывать рецептор Fc (например, FcγR; или FcRn (неонатальный Fc-рецептор), и/или которая может участвовать в активации комплемента. Если область CH2 и CH3 содержит делеции, замены и/или вставки или другие модификации, делающие ее

неспособной связываться с каким-либо Fc-рецептором, а также неспособной активировать комплемент, то область CH2 и CH3 является нефункциональной.

[00155] Антигенсвязывающие молекулы (ABM) и конъюгаты ABM, имеющие ненативные форматы, такие как Fab-домены в ненативных конфигурациях, могут экспрессироваться в соответствии с изобретениями, и раскрыты в WO 2021/026409 A1. Мультиспецифические связывающие молекулы (MBM) и конъюгаты MBM могут продуцироваться в соответствии с изобретениями, и раскрыты в WO 2021/091953A1 и WO 2021/030680 A1.

[00156] Fc-содержащие белки могут содержать модификации в доменах иммуноглобулина, включая случаи, когда модификации влияют на одну или более эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, влияющие на связывание FcγR, связывание FcRn и, таким образом, на период полувыведения и/или CDC-активность (комплемент-зависимую цитотоксичность)). Такие модификации включают, без ограничений, следующие модификации и их комбинации, с нумерацией константной области иммуноглобулина по системе EU: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 и 439.

[00157] Например, и без ограничений, связывающий белок представляет собой Fc-содержащий белок и проявляет повышенный период полувыведения из сыворотки (по сравнению с тем же самым Fc-содержащим белком без указанной модификации (модификаций)) и имеет модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T), и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/SI/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В другом примере, модификация может включать модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[00158] Как было указано выше, изобретения также пригодны для продуцирования других молекул, включая слитые белки. Такие белки могут включать, частично или полностью, два или больше белков, один из которых представляет собой Fc-участок молекулы иммуноглобулина, и которые в их природном состоянии не являются слитыми. Fc-слитые белки включают Fc-слитый (N-концевой), Fc-слитый (C-концевой), моно-Fc-слитый и биспецифический Fc-слитый. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными участками

выделенных из антител полипептидов (включая Fc-домен), было описано, например, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 10535-39 (1991) ; Byrn et al., Nature 344:677-70, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в: Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, страницы 10.19.1-10.19.11 (1992). Белки, содержащие рецептор Fc, также описаны в С. Huang, "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MFMETIBODY technology," 20(6) Curr. Opin. Biotechnol. 692-9 (2009).

[00159] Слитые белки Fc-рецептора включают один или более из одного или более внеклеточных доменов рецептора, сопряженного с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которой расположен домен CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, Fc-слитый белок содержит две или больше разных цепей рецепторов, которые связываются с одним или большим числом лигандов. Некоторые слитые белки Fc-рецептора могут содержать лигандсвязывающие домены многих разных рецепторов.

[00160] В некоторых вариантах осуществления, Fc-слитый белок представляет собой слитый белок Fc-рецептора, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, сопряженных с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, Fc-фрагмент включает шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок Fc-рецептора содержит две или больше разных цепей рецептора, которые связываются с одним лигандом или с различными лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой TRAP-белок, такой как, например, белок-ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6927044, или белок-ловушка VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит домен 2 VEGF-рецептора Flt1 Ig, слитый с доменом 3 VEGF-рецептора Flk1 Ig, слитым с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления, Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или более из одного или более антигенсвязывающих доменов, таких как фрагмент вариабельной области тяжелой цепи и фрагмент вариабельной области легкой цепи антитела, сопряженного с Fc-фрагментом.

[00161] Мини-белки-ловушки представляют собой белки-ловушки, которые используют мультимеризующий компонент (MC) вместо Fc-участка и раскрыты в патентах США №№ 7279159 и 7087411, и могут быть получены в соответствии с изобретениями.

[00162] Хотя изобретения были описаны со ссылками на примеры вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что могут быть внесены различные изменения и вместо элементов могут быть использованы их эквиваленты без выхода за пределы объема изобретений. Кроме того, могут быть выполнены многие модификации, чтобы адаптировать конкретную ситуацию или материал к описанию изобретения без выхода за пределы его сущности. Поэтому

предполагается, что настоящие изобретения не будут ограничиваться конкретным вариантом осуществления, раскрытым как наилучший способ, предусмотренный для осуществления этих изобретений, но будут включать все варианты осуществления, входящие в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения титра рекомбинантного белка в производстве рекомбинантного белка путем культивирования рекомбинантных эукариотических клеток, включающий:

(а) обеспечение определенной среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, причем определенная среда для культивирования клеток содержит менее около 4000 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 400 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES;

(б) культивирование указанных рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей;

(с) экспрессию представляющего интерес рекомбинантного белка из указанных рекомбинантных эукариотических клеток; и

(д) получение более высокого титра рекомбинантного белка в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

2. Способ по п. 1, где эукариотическую клетку выбирают из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки птицы, клетки насекомого и дрожжевой клетки.

3. Способ по п. 1, где эукариотическую клетку выбирают из группы, состоящей из CHO, COS, клетки сетчатки, Vero, CV1, почки, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, A431, CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, клетки ММТ, стволовой клетки, опухолевой клетки и клеточной линии, полученной из вышеназванных клеток.

4. Способ по п. 3, где эукариотическая клетка представляет собой клетку CHO.

5. Способ по п. 1, где указанная экспрессия представляющего интерес рекомбинантного белка происходит во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз.

6. Способ по п. 1, где указанное культивирование рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей происходит во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз.

7. Способ по п. 1, где рост клеток во время указанного культивирования рекомбинантных эукариотических клеток выше, чем рост аналогичных или идентичных рекомбинантных эукариотических клеток в средах без пониженного содержания примесей.

8. Способ по п. 1, где более высокий титр рекомбинантного белка повышен на по меньшей мере около 5% по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

9. Способ по п. 1, где рекомбинантный белок представляет собой антитело,

антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')₂, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4.

10. Способ по п. 1, где рекомбинантный белок содержит Fc-домен.

11. Способ по п. 10, где рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из Fc-слитого белка, слитого белка Fc-рецептора (TRAP), антитела, фрагмента антитела и слитого белка ScFv-Fc.

12. Способ по п. 11, где рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из анти-PD1 антитела, анти-PDL-1 антитела, анти-Dll4 антитела, анти-ANG2 антитела, анти-AngPt13 антитела, анти-PDGFR антитела, анти-Erb3 антитела, анти-PRLR антитела, анти-TNF антитела, анти-EGFR антитела, анти-PCSK9 антитела, анти-GDF8 антитела, анти-GCGR антитела, анти-VEGF антитела, анти-IL1R антитела, анти-IL4R антитела, анти-IL6R антитела, анти-IL1 антитела, анти-IL2 антитела, анти-IL3 антитела, анти-IL4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL6 антитела, анти-IL7 антитела, анти-RSV антитела, анти-NGF антитела, анти-CD3 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, анти-CD48 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-CD20 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-MUC16 антитела и биспецифического анти-CD3/анти-PSMA антитела.

13. Способ по п. 11, где рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из алирокумаба, атолтвивимаба, мафтвивимаба, одесивимаба, одесивимаба-ebgn, касирвивимаба, имдевимаба, цемиплимаба, цемиплимаба-gwlc, дупилумаба, эвинакумаба, эвинакумаба-dgnb, фасинумаба, несвакумаба, тревогрумаба, ринукумаба и сарилумаба.

14. Способ по п. 13, где рекомбинантный белок представляет собой дупилумаб.

15. Среда для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, включающая определенную среду для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, причем определенная среда для культивирования клеток включает буфер 4-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), и содержит менее около 800 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 80 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES.

16. Среда для культивирования клеток по п. 15, где среда не содержит гидролизатов.

17. Среда для культивирования клеток по п. 15, где среда является химически определенной.

18. Среда для культивирования клеток по п. 15, дополнительно содержащая инсулин.

19. Среда для культивирования клеток по п. 15, дополнительно содержащая $\geq 0,09$ мМ $\pm 0,014$ мМ орнитина, $\geq 0,20 \pm 0,03$ мМ путресцина, или их комбинации.

20. Среда для культивирования клеток по п. 15, дополнительно содержащая $\geq 40 \pm 6$ мМ смеси аминокислот или их солей.

21. Среда для культивирования клеток по п. 20, где смесь аминокислот состоит из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

22. Среда для культивирования клеток по п. 15, дополнительно содержащая одну или более жирных кислот и токоферол.

23. Среда для культивирования клеток по п. 22, где одну или более жирных кислот выбирают из группы, состоящей из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, тиоктовой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, декановой кислоты, додекановой кислоты, гексановой кислоты, лигноцериновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты.

24. Среда для культивирования клеток по п. 15, дополнительно содержащая смесь нуклеозидов.

25. Среда для культивирования клеток по п. 24, где смесь нуклеозидов включает один или более из аденозина, гуанозина, цитидина, уридина, тимидина и гипоксантина.

26. Среда для культивирования клеток по п. 25, содержащая аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

27. Среда для культивирования клеток по п. 15, дополнительно содержащая одну или более солей двухвалентных катионов.

28. Среда для культивирования клеток по п. 27, где двухвалентный катион представляет собой магний, кальций, или оба катиона.

29. Среда для культивирования клеток по п. 28, включающая Ca^{2+} и Mg^{2+} .

30. Среда для культивирования клеток по п. 15, где представляет собой химически определенную среду и включает: буфер HEPES; смесь аминокислот; необязательно, смесь нуклеозидов; одну или более жирных кислот и токоферол; одну или более солей двухвалентных катионов; и один или более витаминов.

31. Среда для культивирования клеток по п. 30, дополнительно содержащая инсулин.

32. Способ выбора определенной среды для культивирования клеток для использования в клеточной культуре с целью повышения производительности клеточной культуры, включающий:

(а) обеспечение определенной среды для культивирования клеток, содержащей буфер 4-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES);

(б) анализ определенной среды для культивирования клеток, содержащей буфер HEPES, для определения количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, и количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, присутствующих в указанной определенной среде для

культивирования клеток;

(с) выбор определенной среды для культивирования клеток, содержащей буфер HEPES, для использования в клеточной культуре, если будет определено, что определенная среда для культивирования клеток, содержащая буфер HEPES, содержит менее около 4000 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 400 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES;

при этом использование определенной среды для культивирования клеток, содержащей буфер HEPES, которая содержит менее около 4000 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 400 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES, повышает производительность клеточной культуры по сравнению с производительностью клеточной культуры в средах без пониженного содержания связанных с HEPES примесей.

33. Способ по п. 32, где повышенная производительность клеточной культуры включает повышенный титр клеточной культуры и/или рост клеток.

34. Способ выбора буфера HEPES для использования в клеточной культуре с целью повышения производительности клеточной культуры, включающий:

(а) обеспечение буфера 4-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES);

(b) анализ буфера HEPES для определения количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, и количества связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, присутствующих в буфере HEPES;

(с) выбор буфера HEPES для использования в клеточной культуре, если будет определено, что буфер HEPES содержит менее около 4000 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 400 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES;

при этом использование буфера HEPES, содержащего менее около 4000 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 400 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES, предназначенного для использования в связи с клеточной культурой, повышает производительность клеточной культуры по сравнению с производительностью клеточной культуры в присутствии буфера HEPES, содержащего более высокие количества указанных примесей.

35. Способ по п. 34, где повышенная производительность клеточной культуры включает повышенный титр клеточной культуры и/или рост клеток.

36. Клеточная культура, содержащая клетку и среду для культивирования клеток по любому из пп. 15-31.

37. Клеточная культура по п. 36, где клетка представляет собой эукариотическую

клетку.

38. Клеточная культура по п. 37, где эукариотическую клетку выбирают из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки птицы, клетки насекомого и дрожжевой клетки.

39. Клеточная культура по п. 36, где клетка может экспрессировать антитело, выбранное из группы, состоящей из алирокумаба, атолтивимаба, мафтивимаба, одесивимаба, одесивимаба-ebgn, касиривимаба, имдевимаба, цемиплимаба, цемиплимаба-gwlc, дупилумаба, эвинакумаба, эвинакумаба-dgnb, фасинумаба, несвакумаба, тревогрумаба, ринукумаба и сарилумаба.

40. Клеточная культура по п. 39, где клетка может экспрессировать дупилумаб.

41. Способ по п. 8, где более высокий титр рекомбинантного белка повышен на по меньшей мере около 10% по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

42. Способ по п. 8, где более высокий титр рекомбинантного белка повышен на по меньшей мере около 15% по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

43. Способ по п. 8, где более высокий титр рекомбинантного белка повышен на по меньшей мере около 25% по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

44. Способ по п. 1, где скорость удвоения жизнеспособных клеток в средах с пониженным содержанием примесей имеет значение на по меньшей мере 5% больше, чем скорость удвоения клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей.

45. Способ по п. 44, где скорость удвоения жизнеспособных клеток в средах с пониженным содержанием примесей имеет значение на по меньшей мере 10% больше, чем скорость удвоения клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей.

46. Способ по п. 44, где скорость удвоения жизнеспособных клеток в средах с пониженным содержанием примесей имеет значение на по меньшей мере 15% больше, чем скорость удвоения клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей.

47. Способ по п. 44, где скорость удвоения жизнеспособных клеток в средах с пониженным содержанием примесей имеет значение на по меньшей мере 25% больше, чем скорость удвоения клеток, культивируемых в средах без пониженного содержания примесей.

48. Среда для культивирования клеток по п. 15, где среда для культивирования клеток содержит по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из винилсульфоновой кислоты, НЕРЕС+[O]-[H₂], ацетамидометансульфоновой кислоты, НЕРЕС+[O], 2,2-дигидроксиэтансульфоновой кислоты, НЕРЕС-[C₂H₆]+[O] [*SO₃-содержащих*] соединений.

49. Клеточная культура, содержащая (i) по меньшей мере одну рекомбинантную эукариотическую клетку, которая может экспрессировать рекомбинантный белок, и (ii) среду для культивирования клеток, где клеточную культуру получают способом, включающим стадии:

(a) обеспечения определенной среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, причем определенная среда для культивирования клеток содержит менее около 4000 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 400 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES;

(b) культивирования указанных рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей;

(c) экспрессии представляющего интерес рекомбинантного белка из указанных рекомбинантных эукариотических клеток; и

(d) получения более высокого титра рекомбинантного белка в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

50. Клеточная культура по п. 49, где эукариотическую клетку выбирают из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки птицы, клетки насекомого и дрожжевой клетки.

51. Клеточная культура по п. 50, где эукариотическую клетку выбирают из группы, состоящей из CHO, COS, клетки сетчатки, Vero, CV1, почки, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, A431, CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, клетки MMT, стволовой клетки, опухолевой клетки и клеточной линии, полученной из вышеназванных клеток.

52. Клеточная культура по п. 51, где эукариотическая клетка представляет собой клетку CHO.

53. Клеточная культура по п. 49, где указанная экспрессия представляющего интерес рекомбинантного белка происходит во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз.

54. Клеточная культура по п. 49, где указанное культивирование рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей происходит во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз.

55. Клеточная культура по п. 49, где рост клеток во время указанного культивирования рекомбинантных эукариотических клеток выше, чем рост аналогичных или идентичных рекомбинантных эукариотических клеток в средах без пониженного содержания примесей.

56. Клеточная культура по п. 49, где более высокий титр рекомбинантного белка

повышен на по меньшей мере около 5% по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

57. Клеточная культура по п. 49, где рекомбинантный белок представляет собой антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')₂, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4.

58. Клеточная культура по п. 49, где рекомбинантный белок содержит Fc-домен.

59. Клеточная культура по п. 58, где рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из Fc-слитого белка, слитого белка Fc-рецептора (TRAP), антитела, фрагмента антитела и слитого белка ScFv-Fc.

60. Клеточная культура по п. 59, где рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из анти-PD1 антитела, анти-PDL-1 антитела, анти-Dll4 антитела, анти-ANG2 антитела, анти-AngPt13 антитела, анти-PDGFR антитела, анти-Erb3 антитела, анти-PRLR антитела, анти-TNF антитела, анти-EGFR антитела, анти-PCSK9 антитела, анти-GDF8 антитела, анти-GCGR антитела, анти-VEGF антитела, анти-IL1R антитела, анти-IL4R антитела, анти-IL6R антитела, анти-IL1 антитела, анти-IL2 антитела, анти-IL3 антитела, анти-IL4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL6 антитела, анти-IL7 антитела, анти-RSV антитела, анти-NGF антитела, анти-CD3 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, анти-CD48 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-CD20 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-MUC16 антитела и биспецифического анти-CD3/анти-PSMA антитела.

61. Клеточная культура по п. 59, где рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из алирокумаба, атоливимаба, мафтивимаба, одесивимаба, одесивимаба-ebgn, касиривимаба, имдевимаба, цемиплимаба, цемиплимаба-gwlc, дупилумаба, эвинакумаба, эвинакумаба-dgnb, фасинумаба, несвакумаба, тревогрумаба, ринукумаба и сарилумаба.

62. Клеточная культура по п. 61, где рекомбинантный белок представляет собой дупилумаб.

63. Рекомбинантный белок, продуцируемый в клеточной культуре, содержащей (i) по меньшей мере одну рекомбинантную эукариотическую клетку, которая может экспрессировать указанный рекомбинантный белок, и (ii) среду для культивирования клеток, где рекомбинантный белок продуцируется способом, включающим стадии:

(a) обеспечения определенной среды для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей, причем определенная среда для культивирования клеток содержит менее около 4000 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 267,07, на моль общего HEPES, и менее около 400 мкмоль связанной с HEPES примеси, имеющей молекулярный вес 221,06, на моль общего HEPES;

(b) культивирования указанных рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием

примесей;

(с) экспрессии представляющего интерес рекомбинантного белка из указанных рекомбинантных эукариотических клеток; и

(d) получения более высокого титра рекомбинантного белка в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

64. Рекомбинантный белок по п. 63, где эукариотическую клетку выбирают из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки птицы, клетки насекомого и дрожжевой клетки.

65. Рекомбинантный белок по п. 64, где эукариотическую клетку выбирают из группы, состоящей из CHO, COS, клетки сетчатки, Vero, CV1, почки, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, A431, CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, клетки ММТ, стволовой клетки, опухолевой клетки и клеточной линии, полученной из вышеназванных клеток.

66. Рекомбинантный белок по п. 65, где эукариотическая клетка представляет собой клетку CHO.

67. Рекомбинантный белок по п. 63, где указанная экспрессия представляющего интерес рекомбинантного белка происходит во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз.

68. Рекомбинантный белок по п. 63, где указанное культивирование рекомбинантных эукариотических клеток в указанной определенной среде для культивирования клеток с пониженным содержанием примесей происходит во время фазы продукции, фазы роста или обеих фаз.

69. Рекомбинантный белок по п. 63, где рост клеток во время указанного культивирования рекомбинантных эукариотических клеток выше, чем рост аналогичных или идентичных рекомбинантных эукариотических клеток в средах без пониженного содержания примесей.

70. Рекомбинантный белок по п. 63, где более высокий титр рекомбинантного белка повышен на по меньшей мере около 5% по сравнению с аналогичными или идентичными клетками, культивируемыми в средах без пониженного содержания примесей.

71. Рекомбинантный белок по п. 63, где рекомбинантный белок представляет собой антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')₂, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4.

72. Рекомбинантный белок по п. 63, где содержит Fc-домен.

73. Рекомбинантный белок по п. 72, где указанный рекомбинантный белок

выбирают из группы, состоящей из Fc-слитого белка, слитого белка Fc-рецептора (TRAP), антитела, фрагмента антитела и слитого белка ScFv-Fc.

74. Рекомбинантный белок по п. 73, где указанный рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из анти-PD1 антитела, анти-PDL-1 антитела, анти-Dll4 антитела, анти-ANG2 антитела, анти-AngPt13 антитела, анти-PDGFR антитела, анти-Erb3 антитела, анти-PRLR антитела, анти-TNF антитела, анти-EGFR антитела, анти-PCSK9 антитела, анти-GDF8 антитела, анти-GCGR антитела, анти-VEGF антитела, анти-IL1R антитела, анти-IL4R антитела, анти-IL6R антитела, анти-IL1 антитела, анти-IL2 антитела, анти-IL3 антитела, анти-IL4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL6 антитела, анти-IL7 антитела, анти-RSV антитела, анти-NGF антитела, анти-CD3 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, анти-CD48 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-CD20 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-MUC16 антитела и биспецифического анти-CD3/анти-PSMA антитела.

75. Рекомбинантный белок по п. 73, где указанный рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из алирокумаба, атоливимаба, мафтивимаба, одесивимаба, одесивимаба-ebgn, касиривимаба, имдевимаба, цемиплимаба, цемиплимаба-gwlc, дупилумаба, эвинакумаба, эвинакумаба-dgnb, фасинумаба, несвакумаба, тревогрумаба, ринукумаба и сарилумаба.

76. Рекомбинантный белок по п. 75, где рекомбинантный белок представляет собой дупилумаб.

77. Клетка по любому из вышеперечисленных пунктов формулы изобретения.

78. Клеточная культура по любому из вышеперечисленных пунктов формулы изобретения.

79. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов формулы изобретения.

80. Рекомбинантный белок по любому из вышеперечисленных пунктов формулы изобретения.

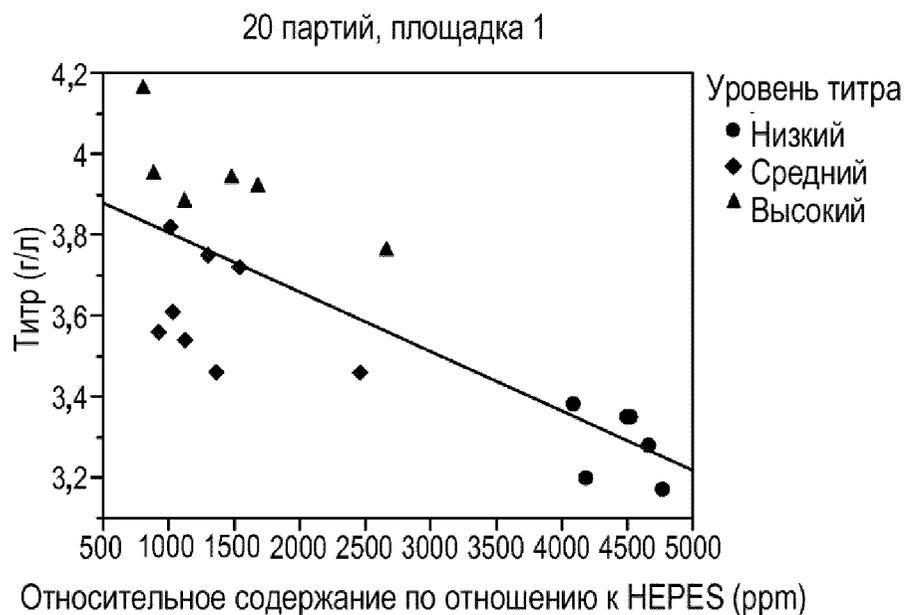
По доверенности

HEPES+[O2]-[H2] в зависимости от титра



Фиг. 1

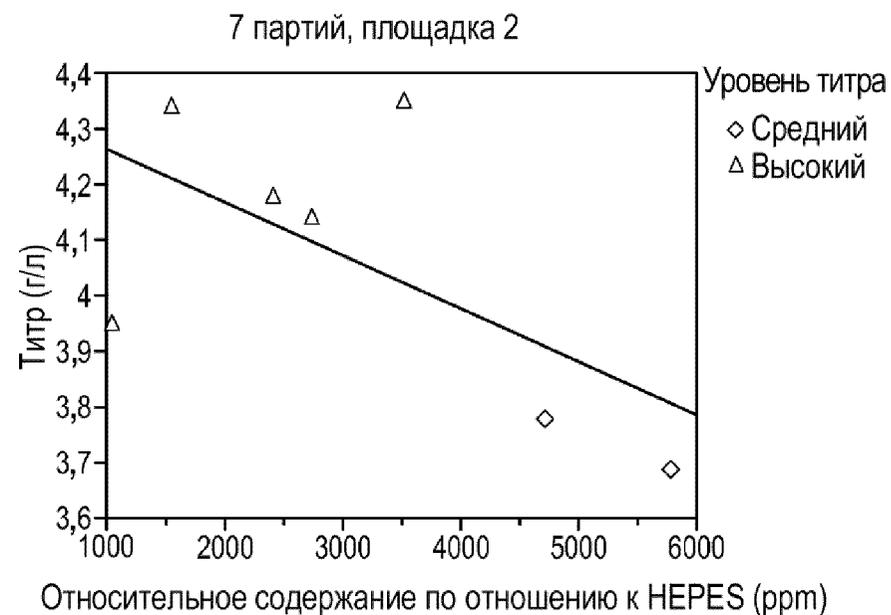
HEPES+[O2]-[H2]



| Результаты аппроксимации | |
|--------------------------------------|----------|
| Коэффициент детерминации | 0,629054 |
| Скорректированный коэф. детерминации | 0,608446 |
| Среднеквадратическая ошибка | 0,176124 |
| Среднее значение ответа | 3,613 |
| Наблюдения (или сумма весов) | 20 |

Коэффициент корреляции Пирсона: -0,79

Фиг. 2А



| Результаты аппроксимации | |
|--------------------------------------|----------|
| Коэффициент детерминации | 0,381483 |
| Скорректированный коэф. детерминации | 0,257779 |
| Среднеквадратическая ошибка | 0,225396 |
| Среднее значение ответа | 4,061429 |
| Наблюдения (или сумма весов) | 7 |

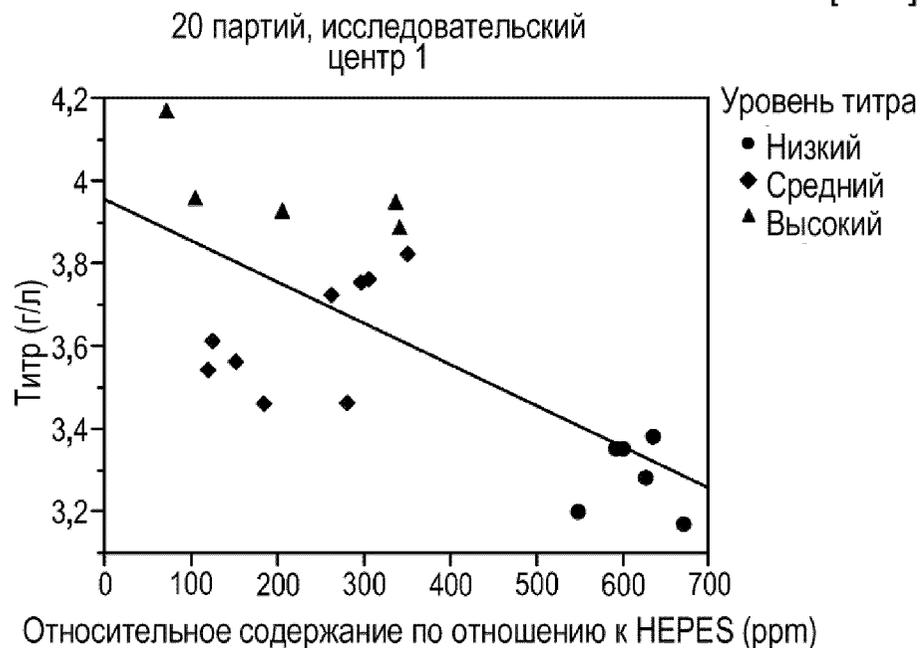
Коэффициент корреляции Пирсона: -0,62

Фиг. 2В



Фиг. 3

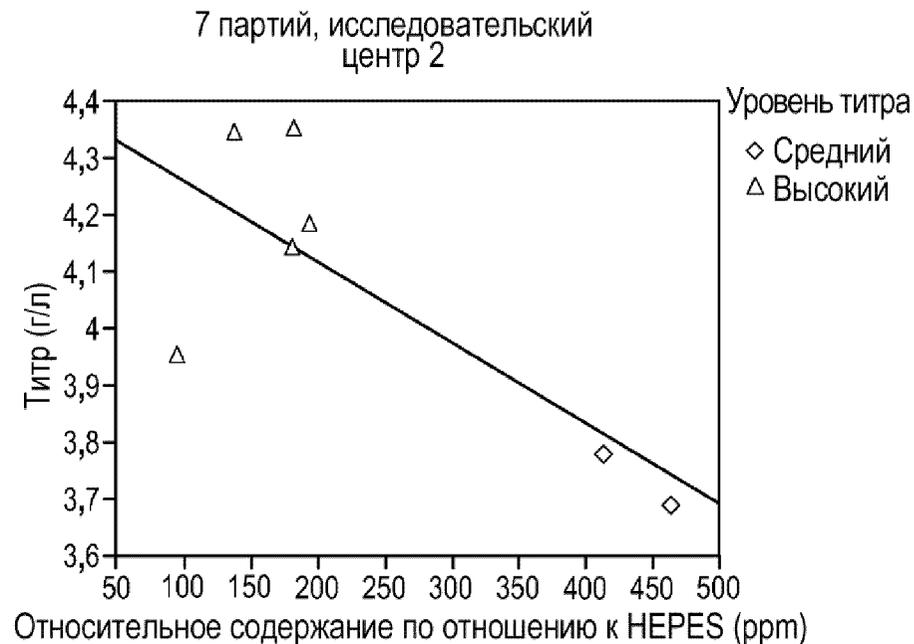
HEPES-[CH4]



| Результаты аппроксимации | |
|--------------------------------------|----------|
| Коэффициент детерминации | 0,497884 |
| Скорректированный коэф. детерминации | 0,469989 |
| Среднеквадратическая ошибка | 0,204911 |
| Среднее значение ответа | 3,613 |
| Наблюдения (или сумма весов) | 20 |

Коэффициент корреляции Пирсона: -0,71

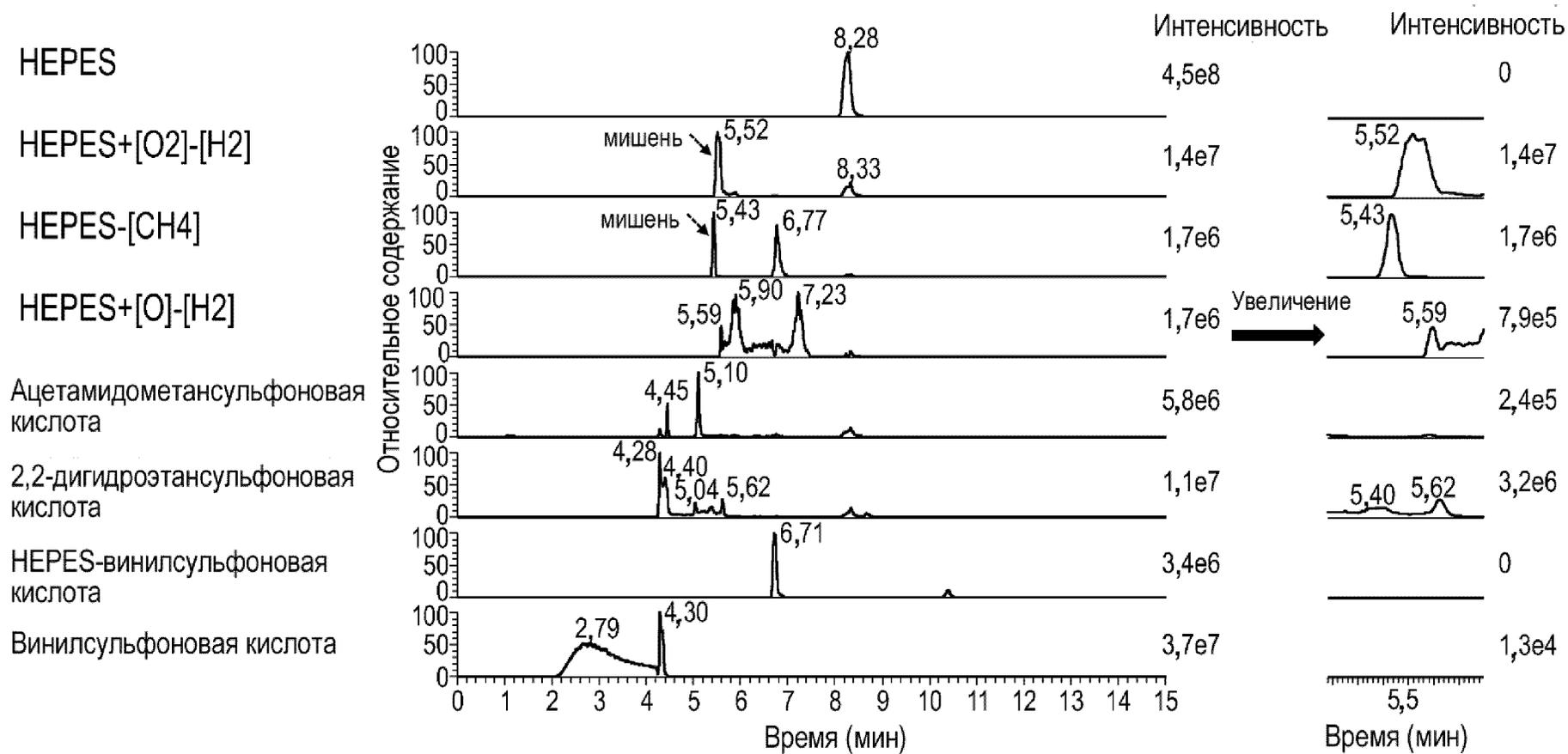
Фиг. 4А



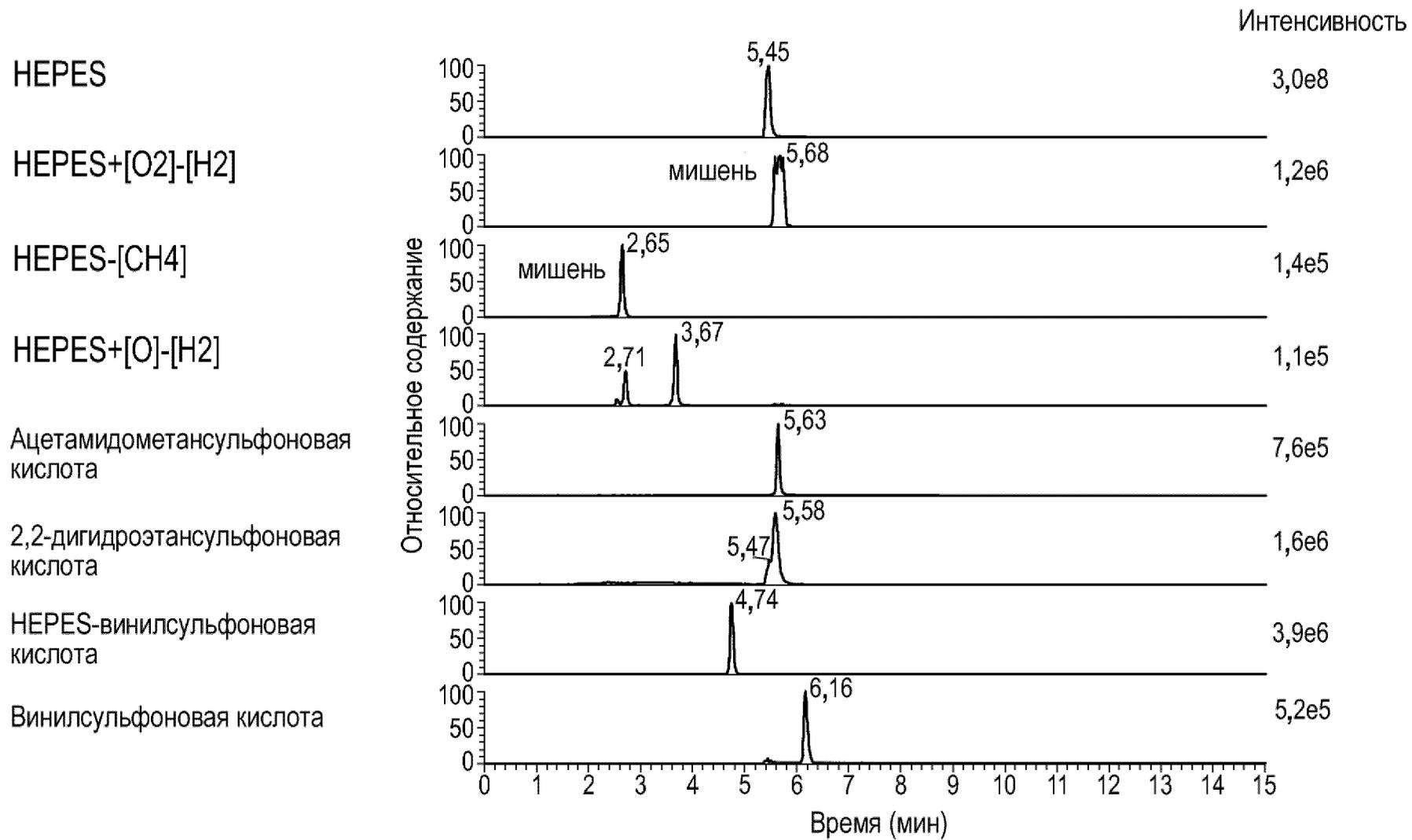
| Результаты аппроксимации | |
|--------------------------------------|----------|
| Коэффициент детерминации | 0,589469 |
| Скорректированный коэф. детерминации | 0,507363 |
| Среднеквадратическая ошибка | 0,18363 |
| Среднее значение ответа | 4,061429 |
| Наблюдения (или сумма весов) | 7 |

Коэффициент корреляции Пирсона: -0,77

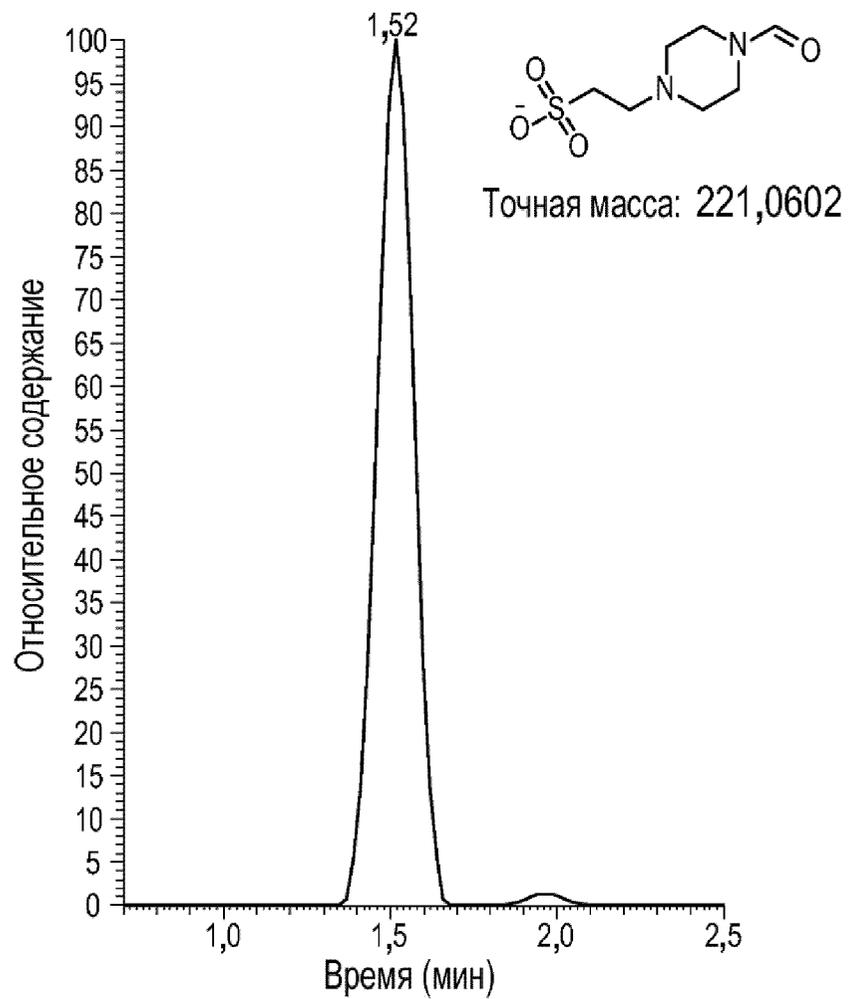
Фиг. 4В



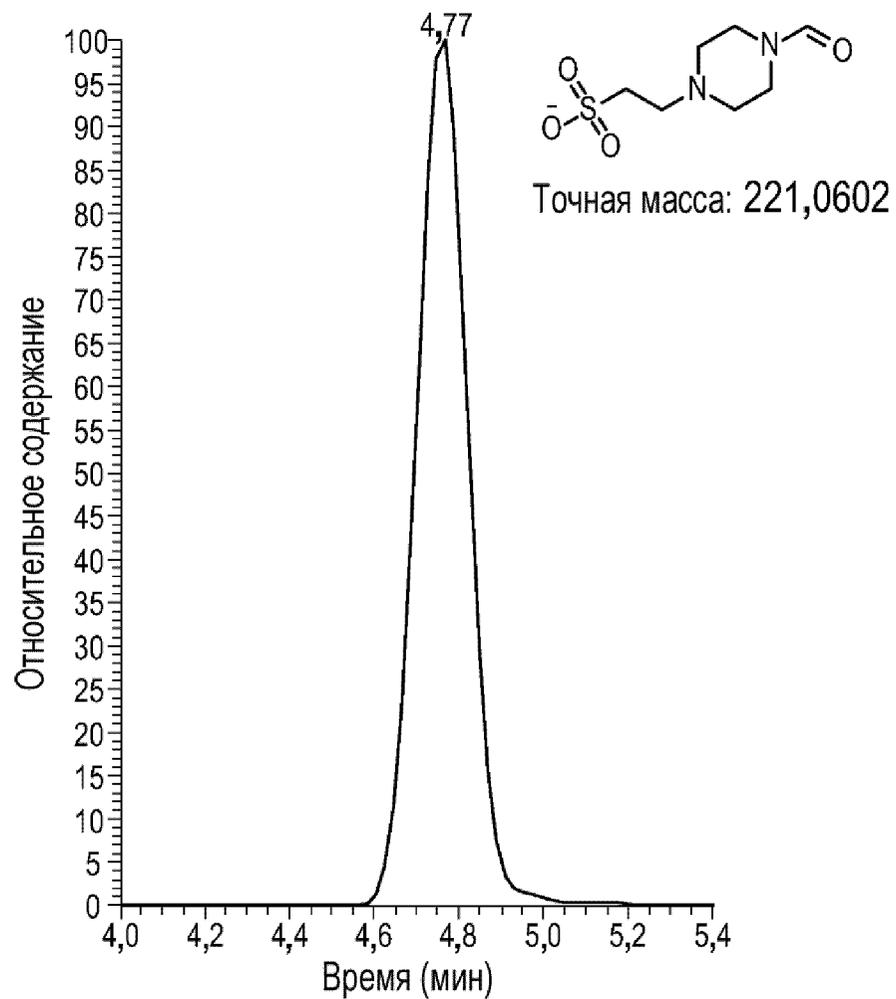
Фиг. 5А



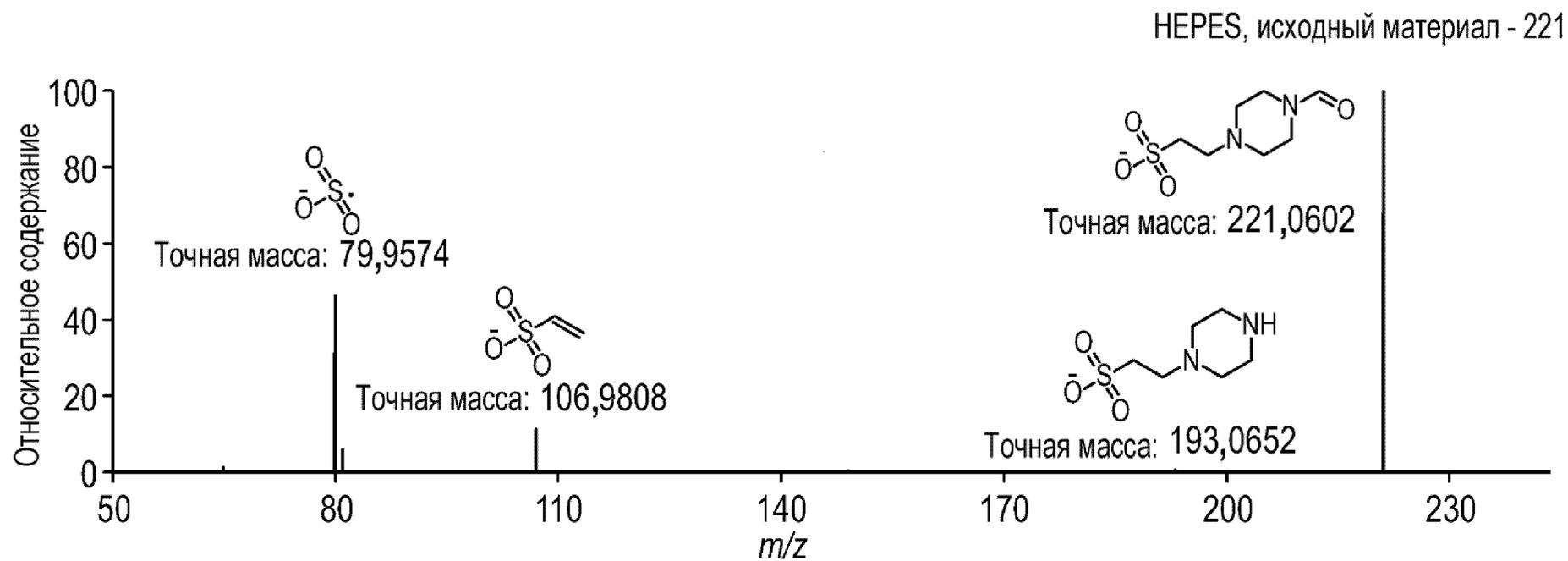
Фиг. 5В



Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 7