



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89644

(13) C2

(51) МПК (2009)

C12P 21/08

C12N 5/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ВИРОБНИЦТВА $\alpha$ -АБЕТА (ВАРІАНТИ)

1

(21) а200703284

(22) 26.08.2005

(24) 25.02.2010

(86) PCT/US2005/030364, 26.08.2005

(31) 60/604,936

(32) 27.08.2004

(33) US

(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.

(72) ДРАПО ДЕНІ, US, ЛУАН ЙЕН-ТУНГ, US, МЕРСЕР ДЖЕЙМС Р., US, ВАНГ ВЕНГ, CN/US, ЛЕСКО Р. ДЕНІЕЛ, US

(73) УАЙЄТ РЕСЕРЧ АЙРЛЕНД ЛІМІТЕД, ІЕ

(56) WO A 03077858, 25.09.2003.

WO A 0246237, 13.06.2002.

BOLS N C ET AL: "MEDIA FOR HYBRIDOMA GROWTH AND MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION".BIOTECHNOLOGY ADVANCES, vol. 6, no. , 1988, pages 169-177.

BIBILA T A ET AL: "IN PURSUIT OF THE OPTIMAL FED-BATCH PROCESSES FOR MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 11, no. 11, 1995, pages 1-13.

KUNDU PRABUDDHA K ET AL: "Getting higher yields of monoclonal antibody in culture", INDIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY, vol. 42, no. 2,pages 155-171.

(57) 1. Спосіб продукування  $\alpha$ -АБета у клітинній культурі великомасштабного виробництва, що включає кроки:

забезпечення клітинної культури, що включає:

клітини ссавців, які містять ген, що кодує  $\alpha$ -АБета, ген якого експресується за умов клітинної культури; і

середовище, що містить глутамін і має характеристики середовища, вибрану із групи, що складається із нижченаведених характеристик: i) сукупна кількість амінокислот на одиницю об'єму більша ніж приблизно 70 мМ; ii) молярне співвідношення сукупної кількості глутаміну до сукупної кількості аспарагіну становить менше ніж приблизно 2; iii) молярне співвідношення сукупної кількості глутаміну до сукупної кількості амінокислот в цілому становить менше ніж приблизно 0,2; iv) молярне співвідношення сукупної кількості неорганічних іонів до сукупної кількості амінокислот в цілому становить приблизно від 0,4 до 1; або v) об'єднана сукупна кількість глутаміну й аспарагіну на одини-

2

цю об'єму становить більше ніж приблизно 16 мМ, та їх комбінації;

підтримання вказаної культури в початковій фазі росту при першому наборі умов культивування упродовж першого проміжку часу, достатнього для надання можливості вказаним клітинам репродукуватися до щільності життєздатних клітин в межах діапазону приблизно 20-80 % від максимальної можливої щільності життєздатних клітин, якщо вказана культура підтримувалась при першому наборі умов культивування;

зміну принаймні однієї з умов культивування таким чином, щоб застосувати другий набір умов культивування;

підтримання вказаної культури упродовж другого проміжку часу при другому наборі умов і упродовж другого проміжку часу таким чином, щоб  $\alpha$ -АБета накопичився в клітинній культурі.

2. Спосіб продукування  $\alpha$ -АБета у клітинній культурі великомасштабного виробництва, що включає кроки:

забезпечення клітинної культури, що включає:

клітини ссавців, які містять ген, що кодує  $\alpha$ -АБета, ген якого експресується за умов клітинної культури; і

середовище, що містить молярне співвідношення сукупної кількості глутаміну до сукупної кількості аспарагіну, яке становить менше ніж приблизно 2; і

вказане середовище, що містить глутамін; і

вказане середовище, що має дві характеристики середовища, вибрані із групи, що складається із нижченаведених характеристик: i) середовище містить сукупну кількість амінокислот на одиницю об'єму, більшу ніж приблизно 70 мМ; ii) молярне співвідношення сукупної кількості глутаміну до сукупної кількості амінокислот становить менше ніж приблизно 0,2; iii) молярне співвідношення сукупної кількості неорганічних іонів до сукупної кількості амінокислот становить приблизно від 0,4 до 1; або iv) об'єднана сукупна кількість глутаміну й аспарагіну на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 16 мМ, та їх комбінації;

підтримання вказаної культури в початковій фазі росту при першому наборі умов культивування упродовж першого проміжку часу, достатнього для надання можливості вказаним клітинам репроду-

(13) C2

(11) 89644

(19) UA

куватися до щільності життєздатних клітин в межах діапазону приблизно 20-80 % від максимальної можливої щільності життєздатних клітин, якщо вказана культура підтримувалась при першому наборі умов культивування;

зміну принаймні однієї з умов культивування таким чином, щоб застосувати другий набір умов культивування;

підтримання вказаної культури упродовж другого проміжку часу при другому наборі умов і упродовж другого проміжку часу таким чином, щоб  $\alpha$ -АБета накопичився в клітинній культурі.

3. Спосіб за п. 1, в якому вказана умова клітинної культури у вказаній зміні на принаймні одному кроці умов культивування вибирається із групи, що складається із: (i) температури, (ii) pH, (iii) осмоляльності, (iv) рівня хімічних індуктантів та їх комбінації.

4. Спосіб за п. 1, у якому початкова концентрація глутаміну вказаного середовища становить менше ніж або дорівнює 10 mM.

5. Спосіб за п. 1, у якому початкова концентрація глутаміну вказаного середовища становить менше ніж або дорівнює 4 mM.

6. Спосіб за п. 1, у якому сумарна сукупна кількість глутаміну на одиницю об'єму вказаного середовища становить менше ніж або дорівнює 10 mM.

7. Спосіб за п. 1, у якому сумарна сукупна кількість глутаміну на одиницю об'єму вказаного середовища становить менше ніж або дорівнює 4 mM.

8. Спосіб за п. 1, у якому глутамін забезпечується тільки в початковому середовищі на початку клітинної культури.

9. Спосіб за п. 1, у якому початкова щільність вказаних клітин ссавців становить принаймні  $2 \times 10^5$  клітин/мл.

10. Спосіб за п. 1, у якому початкова щільність вказаних клітин ссавців становить принаймні  $2 \times 10^6$  клітин/мл.

11. Спосіб за п. 1, у якому крок забезпечення включає забезпечення принаймні приблизно 1000 л культури.

12. Спосіб за п. 1, у якому крок забезпечення включає забезпечення принаймні приблизно 10000 л культури.

13. Спосіб за п. 1, у якому вказаний перший набір умов включає перший температурний діапазон, що становить приблизно 30-42 градуси Цельсія.

14. Спосіб за п. 1, у якому вказаний перший набір умов включає перший температурний діапазон, що становить приблизно 37 градусів Цельсія.

15. Спосіб за п. 1, у якому вказаний другий набір умов включає другий температурний діапазон, що становить приблизно 25-41 градус Цельсія.

16. Спосіб за п. 1, у якому вказаний другий набір умов включає другий температурний діапазон, що становить приблизно 29-35 градусів Цельсія.

17. Спосіб за п. 1, у якому вказаний другий набір умов включає другий температурний діапазон, що становить приблизно 31 градус Цельсія.

18. Спосіб за п. 1, що додатково включає другий крок змін слідом за першою вказаною зміною принаймні однієї з умов культивування, що включає зміну принаймні однієї з умов культивування таким чином, щоб застосувати третій набір умов до культури.

19. Спосіб за п. 18, у якому другий крок змін включає зміну принаймні однієї умови культивування, вибраної із групи, що складається із: (i) температури, (ii) pH, (iii) осмоляльності, (iv) рівня хімічних індуктантів та їх комбінації.

20. Спосіб за п. 18, у якому вказаний третій набір умов включає третій температурний діапазон, що становить приблизно 27-37 градусів Цельсія.

21. Спосіб за п. 1, у якому вказаний перший проміжок часу становить від 1 до 7 днів.

22. Спосіб за п. 1, у якому вказаний перший проміжок часу становить приблизно 4 дні.

23. Спосіб за п. 1, у якому вказаний перший проміжок часу й вказаний другий проміжок часу сумарно становлять принаймні 5 днів.

24. Спосіб за п. 1, у якому в кроці підтримання вказаної культури упродовж другого проміжку часу рівень лактату зменшується слідом за рівнем лактату у культурі, досягаючи максимального рівня.

25. Спосіб за п. 1, у якому в кроці підтримання вказаної культури упродовж другого проміжку часу рівень амонію зменшується слідом за рівнем амонію в культурі, досягаючи максимального рівня.

26. Спосіб за п. 1, у якому вказана сумарна кількість вказаного виробленого  $\alpha$ -АБета є принаймні у 1,5 рази вищою, ніж кількість  $\alpha$ -АБета, виробленого за інших ідентичних умов в іншому ідентичному середовищі, що не має вказаних характеристик середовища.

27. Спосіб за п. 1, у якому вказана сумарна кількість вказаного виробленого  $\alpha$ -АБета є принаймні у 2 рази вищою, ніж кількість  $\alpha$ -АБета, виробленого за інших ідентичних умов в іншому ідентичному середовищі, що не має вказаних характеристик середовища.

28. Спосіб за п. 1, у якому вказана клітинна культура у подальшому постачається додатковими компонентами.

29. Спосіб за п. 28, у якому вказані додаткові компоненти постачаються в множинних інтервалах.

30. Спосіб за п. 28, у якому вказані додаткові компоненти вибираються із групи, що складається з гормонів і/або інших факторів росту, певних іонів (таких як натрію, хлориду, кальцію, магнію і фосфату), буферів, вітамінів, нуклеозидів або нуклеотидів, мікроелементів (неорганічних сполук, що зазвичай присутні у дуже низьких кінцевих концентраціях), амінокислот, ліпідів або глюкози чи інших джерел енергії.

31. Спосіб продукування  $\alpha$ -АБета у клітинній культурі великомасштабного виробництва, що включає кроки:

забезпечення клітинної культури, що включає: клітини ссавців, які містять ген, що кодує  $\alpha$ -АБета, ген якого експресується за умов клітинної культури; і

визначене середовище, що містить глутамін і має принаймні дві характеристики середовища, які вибираються із групи, що складається із нижченаведених характеристик: i) початкова концентрація амінокислот більша ніж приблизно 70 mM; ii) молярне співвідношення глутаміну до аспарагіну становить менше ніж приблизно 2; iii) молярне співвідношення глутаміну до загальної кількості амінокислот становить менше ніж приблизно 0,2; iv) молярне співвідношення кількості неорганічних

іонів до загальної кількості амінокислот становить приблизно від 0,4 до 1; та v) об'єднана концентрація глутаміну й аспарагіну становить більше ніж приблизно 16 мМ;

підтримання вказаної культури в початковій фазі росту при першому наборі умов культивування упродовж першого проміжку часу, достатнього для надання можливості вказаним клітинам репродукуватися в межах діапазону приблизно 20-80 % від максимальної можливої щільності життєздатних клітин, якщо вказана культура підтримувалась при першому наборі умов культивування;

зміну принаймні однієї з умов культивування таким чином, щоб застосувати другий набір умов культивування;

підтримання вказаної культури упродовж другого проміжку часу при другому наборі умов і упродовж другого проміжку часу таким чином, щоб  $\alpha$ -АБета накопичився в клітинній культурі.

32. Спосіб продукування  $\alpha$ -АБета у клітинній культурі великомасштабного виробництва, що включає кроки:

забезпечення клітинної культури, що включає:

клітини ссавців, які містять ген, що кодує  $\alpha$ -АБета, ген якого експресується за умов клітинної культури; і

визначене середовище, що містить глутамін, яке характеризується нижченаведеними особливостями: i) початкова концентрація амінокислот більша ніж приблизно 70 мМ; ii) молярне співвідношення глутаміну до аспарагіну становить менше ніж приблизно 2; iii) молярне співвідношення глутаміну до загальної кількості амінокислот становить менше ніж приблизно 0,2; iv) молярне співвідношення кількості неорганічних іонів до загальної кількості амінокислот становить приблизно від 0,4 до 1; або v) об'єднана концентрація глутаміну й аспарагіну становить більше ніж приблизно 16 мМ;

підтримання вказаної культури в початковій фазі росту при першому наборі умов культивування упродовж першого проміжку часу, достатнього для надання можливості вказаним клітинам репродукуватися в межах діапазону приблизно 20-80 % від максимальної можливої щільності життєздатних клітин, якщо вказана культура підтримувалась при першому наборі умов культивування;

зміну принаймні однієї з умов культивування таким чином, щоб застосувати другий набір умов культивування;

підтримання вказаної культури упродовж другого проміжку часу при другому наборі умов і упродовж другого проміжку часу таким чином, щоб  $\alpha$ -АБета накопичився в клітинній культурі.

33. Спосіб за п. 1, у якому вказане середовище включає середовище, що містить глутамін і має характеристики середовища, які вибираються із групи, що складається із нижченаведених характеристик:

i) початкова концентрація амінокислот більша ніж приблизно 70 мМ; ii) молярне співвідношення початкової кількості глутаміну до початкової кількості аспарагіну становить менше ніж приблизно 2; iii) молярне співвідношення початкової кількості глутаміну до початкової загальної кількості амінокислот становить менше ніж приблизно 0,2; iv) молярне співвідношення початкової кількості

неорганічних іонів до початкової загальної кількості амінокислот становить приблизно від 0,4 до 1; v) об'єднана початкова концентрація глутаміну й початкова концентрація аспарагіну становить більше ніж приблизно 16 мМ, та їх комбінацій.

34. Спосіб за будь-яким із пп. 1, 2 або 31-33, у якому:

рівні лактату є нижчими, ніж ті рівні, що спостерігаються за інших ідентичних умов в іншому ідентичному середовищі, що не має вказаної характеристики середовища;

рівні амонію є нижчими, ніж ті рівні, що спостерігаються за інших ідентичних умов в іншому ідентичному середовищі, що не має вказаної характеристики середовища; і

загальна кількість виробленого  $\alpha$ -АБета є принаймні настільки ж високою, як та, що спостерігається за інших ідентичних умов в іншому ідентичному середовищі, що не має вказаної характеристики середовища.

35. Спосіб за п. 1, у якому вказана культура не постачається додатковими компонентами протягом продукування вказаного  $\alpha$ -АБета.

36. Спосіб за п. 1, у якому гліцилглутамін замінюється на глутамін у вказаній культурі.

37. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість гістидину, ізолейцину, лейцину, метіоніну, фенілаланіну, триптофану, тирозину і проліну на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить більше ніж приблизно 25 мМ.

38. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість гістидину, ізолейцину, лейцину, метіоніну, фенілаланіну, триптофану, тирозину і проліну на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить більше ніж приблизно 35 мМ.

39. Спосіб за п. 1, у якому вказане середовище має характеристику середовища, вибрану із групи, що складається із нижченаведених характеристик:

(i) сукупна загальна кількість гістидину на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 1,7 мМ;

(ii) сукупна загальна кількість ізолейцину на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 3,5 мМ;

(iii) сукупна загальна кількість лейцину на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 5,5 мМ;

(iv) сукупна загальна кількість метіоніну на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 2,0 мМ;

(v) сукупна загальна кількість фенілаланіну на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 2,5 мМ;

(vi) сукупна загальна кількість проліну на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 2,5 мМ;

(vii) сукупна загальна кількість триптофану на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 1,0 мМ; і

(viii) сукупна загальна кількість тирозину на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 2,0 мМ.

40. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість серину на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить більше ніж приблизно 10 мМ.

41. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість аспарагіну на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить більше ніж приблизно 8 мМ.

42. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість аспарагіну на одиницю об'єму у вказаному

середовищі становить більше ніж приблизно 12 мМ.

43. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість фосфору на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить більше ніж приблизно 5 мМ.

44. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість глутамату на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить менше ніж приблизно 1 мМ.

45. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість кальцію пантотенату на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить більше ніж приблизно 20 мг/л.

46. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість нікотинаміду на одиницю об'єму у вказаному

середовищі становить більше ніж приблизно 25 мг/л.

47. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість піридоксину й піридоксалу на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить більше ніж приблизно 35 мг/л.

48. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість рибофлавіну на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить більше ніж приблизно 2,0 мг/л.

49. Спосіб за п. 1, у якому сукупна загальна кількість тіаміну гідрохлориду на одиницю об'єму у вказаному середовищі становить більше ніж приблизно 35 мг/л.

Ця заявка заявляє пріоритет попередньої Патентної заявки США №60/604936, яка була подана 27 серпня 2004 року, зміст якої включено шляхом посилання у повному обсязі.

Білки й поліпептиди набувають все більшого й більшого значення у якості терапевтичних засобів. У більшості випадків, терапевтичні білки й поліпептиди отримують в клітинній культурі, із клітин, які були створені й/або відібрані з метою продукування незвично високих рівнів певного білка або поліпептиду, що розглядається. Контроль і оптимізація умов клітинної культури є критично важливими для успішного комерційного виробництва білків і поліпептидів.

Багато білків і поліпептидів, отриманих у клітинній культурі, продукуються в серійному або підживлювальному процесі, при якому клітини культивують упродовж певного періоду часу, а потім культуру завершують, й отриманий білок або поліпептид виділяють. На остаточну кількість і якість виробленого білка або поліпептиду можуть істотно впливати умови клітинної культури. Наприклад, традиційні процеси серійної й підживлювальної культури часто призводять до продукування відходів метаболізму, які негативно впливають на ріст, життєздатність клітин і виробництво або стабільність білка чи поліпептиду, що розглядається. У той час як було докладено зусиль для поліпшення виробництва білків і поліпептидів у процесах серійної й підживлювальної культури, залишається потреба в додаткових удосконаленнях.

Крім того, значне зусилля було зроблене для розробки визначених середовищ (тобто, середовищ, зібраних із відомих індивідуальних компонентів, що не містять сироватки або інших побічних продуктів тваринного походження) для використання при культивуванні клітин, особливо клітин ссавців. Особливості росту клітини можуть бути зовсім різними у визначених середовищах на відміну від середовищ, отриманих із сироватки. Існує певна потреба в розробці удосконалених систем для продукування білків й поліпептидів за допомогою клітинної культури у визначених середовищах.

Даний винахід пропонує удосконалену систему для великомасштабного виробництва білків і/або поліпептидів у клітинній культурі. Наприклад, даний винахід пропонує комерційні масштабні (наприклад, 500л або більше) способи культивування, які використовують середовище, що характеризу-

ється однією або кількома нижчезазначеними особливостями: i) сукупна кількість амінокислот на одиницю об'єму більша ніж приблизно 70мМ; ii) молярне співвідношення сукупної кількості глутаміну до сукупної кількості аспарагіну становить менше ніж приблизно 2; iii) молярне співвідношення сукупної кількості глутаміну до сукупної кількості амінокислот в цілому становить менше ніж приблизно 0,2; iv) молярне співвідношення сукупної кількості неорганічних іонів до сукупної кількості амінокислот в цілому становить приблизно від 0,4 до 1; або v) об'єднана сукупна кількість глутаміну й аспарагіну на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 16мМ. Звичайний спеціаліст у даній галузі зрозуміє, що термін "сукупний", який використовується вище, стосується сумарної кількості певного компоненту або компонентів, доданих упродовж клітинної культури, включаючи компоненти, що додаються на початку культури й компоненти, що додаються згодом. У певних варіантах втілення винаходу, яким надається перевага, бажано мінімізувати "підживлення" культури протягом довгого часу, таким чином, бажано максимально збільшити кількість, присутні спочатку. Звичайно, протягом культури компоненти середовища метаболізуються і, таким чином, культури з тими ж самими сукупними кількостями даних компонентів матимуть різні абсолютні рівні, якщо ці компоненти додаються в різний час (наприклад, всі присутні спочатку у порівнянні з деякими, що додаються шляхом підживлення).

Відповідно до даного винаходу, використання такого середовища надає можливість отримувати високі рівні продукування білка й зменшує накопичення певних небажаних факторів, таких як амоній і/або лактат.

Звичайний спеціаліст у даній галузі зрозуміє, що композиції середовищ відповідно до даного винаходу охоплюють визначені й невизначені середовища. У певних варіантах втілення даного винаходу, яким надається перевага, культуральне середовище - це визначене середовище, в якому склад середовища відомий й контролюється.

У певних варіантах втілення даного винаходу, яким надається перевага, до способів культивування належать зміна культивування від першого набору умов культивування до другого набору умов культивування у такий спосіб, щоб досягнути метаболічного зсуву для клітин. У деяких варіан-



тах втілення ця зміна виконується, коли культура досягла приблизно 20-80% її максимальної щільності клітин. У деяких варіантах втілення зміна включає зміну температури (або температурного діапазону), при якій підтримується культура. Альтернативно або додатково, даний винахід пропонує способи, пристосовані таким чином, щоб після досягнення піку, рівні лактату і/або амонію в культурі зменшувалися з часом. В інших варіантах втілення зміна включає зсув pH, осмолярності або рівня хімічних індуктантів, таких як алканові кислоти або їх солі.

До клітинних культур відповідно до даного винаходу можуть довільно додаватись поживні речовини й/або інші компоненти середовища, включаючи гормони й/або інші фактори росту, певні іони (такі як натрію, хлориду, кальцію, магнію і фосфату), буфери, вітаміни, нуклеозиди або нуклеотиди, мікроелементи (неорганічні сполуки, що зазвичай присутні у дуже низьких кінцевих концентраціях), амінокислоти, ліпіди або глюкозу чи інше джерело енергії. У певних варіантах втілення даного винаходу може бути вигідним доповнювати середовища хімічними індуктантами, такими як гексаметилен-біс(ацетамід) ("НМБА") і натрію бутират ("NaB"). Ці довільні добавки можуть додаватись на початку культивування або можуть додаватись в більш пізній період з метою поповнення вичерпаних поживних речовин або з іншої причини. Зазвичай, відповідно до даного винаходу бажано обирати початковий склад середовища таким чином, щоб мінімізувати підживлення.

Відповідно до даного винаходу може проводитись моніторинг різних умов культивування, включаючи pH, щільність клітин, життєздатність клітин, рівні лактату, рівні амонію, осмолярність або титр поліпептиду чи білка, що експресується.

Фігура 1 показує порівняння Середовища 1 і Середовища 2 у колбах для струшування з використанням клітин анти-GDF-8.

Фігура 2 показує ріст й життєздатність клітин анти-GDF-8 у Середовищі 1.

Фігура 3 показує ріст клітин клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном.

Фігура 4 показує життєздатність клітин клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном.

Фігура 5 показує рівні амонію клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном.

Фігура 6 показує рівні лактату клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном.

Фігура 7 показує титр анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном.

Фігура 8 показує щільність клітин клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну.

Фігура 9 показує життєздатність клітин клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну.

Фігура 10 показує рівні амонію клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну.

Фігура 11 показує рівні лактату клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну.

Фігура 12 показує титр анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну.

Фігура 13 показує відповідь на дози заліза клітин анти-GDF-8 у Середовищі 1 і Середовищі 2.

Фігура 14 показує щільність клітин культур з підживленням глутаматом і глутаміном.

Фігура 15 показує життєздатність клітин культур з підживленням глутаматом і глутаміном.

Фігура 16 показує титр анти-Льюїс Y у культурах з підживленням глутаматом і глутаміном.

Фігура 17 показує рівні лактату у культурах з підживленням глутаматом і глутаміном.

Фігура 18 показує рівні амонію у культурах з підживленням глутаматом і глутаміном.

Фігура 19 показує осмолярність культур з підживленням глутаматом і глутаміном.

Фігура 20 показує щільність клітин анти-Льюїс Y. Кожен графік - це середнє із двох колб для струшування, вирощених з використанням тих самих умов.

Фігура 21 показує життєздатність клітин анти-Льюїс Y. Кожен графік - це середнє із двох колб для струшування, вирощених з використанням тих самих умов.

Фігура 22 показує середній титр культури анти-Льюїс Y. Кожен графік - це середнє із двох колб для струшування, вирощених з використанням тих самих умов.

Фігура 23 показує рівні амонію клітин анти-Льюїс Y. Кожен графік - це середнє із двох колб для струшування, вирощених з використанням тих самих умов.

Фігура 24 показує лопастний пристрій, що використовується у серійно-підживлюваних культурах.

Фігура 25 показує ріст клітин анти-GDF-8 за різних експериментальних умов.

Фігура 26 показує життєздатність клітин анти-GDF-8 за різних експериментальних умов.

Фігура 27 показує титр анти-GDF-8 за різних експериментальних умов.

Фігура 28 показує рівні лактату культур анти-GDF-8 за різних експериментальних умов.

Фігура 29 показує рівні амонію культур анти-GDF-8 за різних експериментальних умов.

Фігура 30 показує ріст клітин анти-GDF-8 за різних експериментальних умов.

Фігура 31 показує титр анти-GDF-8 за різних експериментальних умов.

Фігура 32 показує рівні лактату культур анти-GDF-8 за різних експериментальних умов.

Фігура 33 показує рівні амонію культур анти-GDF-8 за різних експериментальних умов.

Фігура 34 показує ріст клітин анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну.

Фігура 35 показує життєздатність клітин анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну.

Фігура 36 показує рівні лактату культур анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну.

Фігура 37 показує рівні амонію культур анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну.

Фігура 38 показує рівні глутаміну культур анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну.

Фігура 39 показує титр анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну.

Фігура 40 показує осмолярність культур анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну.

Фігура 41 показує ріст клітин анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну.

Фігура 42 показує рівні лактату культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну.

Фігура 43 показує рівні амонію культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну.

Фігура 44 показує рівні глутаміну культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну.

Фігура 45 показує рівні глутамату культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну.

Фігура 46 показує титр анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну.

Фігура 47 показує осмолярність культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну.

Фігура 48 показує ріст клітин анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів.

Фігура 49 показує рівні лактату культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів.

Фігура 50 показує рівні амонію культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів.

Фігура 51 показує рівні глутаміну культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів.

Фігура 52 показує титр анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів.

Фігура 53 показує ріст клітин анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні вітамінів, мікроелементів E і заліза.

Фігура 54 показує рівні лактату культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні вітамінів, мікроелементів E і заліза.

Фігура 55 показує рівні амонію культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні вітамінів, мікроелементів E і заліза.

Фігура 56 показує титр анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні вітамінів, мікроелементів E і заліза.

Фігура 57 показує ріст клітин анти-GDF-8 у Середовищах 1, 3 і 9.

Фігура 58 показує титр анти-GDF-8 у Середовищах 1, 3 і 9.

Фігура 59 показує екстрапольовані титри анти-GDF-8 для різних рівнів глутаміну окремо й сумарного об'єднаного глутаміну й аспарагіну.

Фігура 60 показує ріст клітин анти-ABета за різних умов середовищ, що випробовуються.

Фігура 61 показує життєздатність клітин анти-ABета за різних умов середовищ, що випробовуються.

Фігура 62 показує рівні лактату культур анти-ABета за різних умов середовищ, що випробовуються.

Фігура 63 показує рівні амонію культур анти-ABета за різних умов середовищ, що випробовуються.

Фігура 64 показує титр анти-ABета за різних умов середовищ, що випробовуються.

Фігура 65 показує осмолярність культур анти-ABета за різних умов середовищ, що випробовуються.

Фігура 66 показує ріст клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов.

Фігура 67 показує життєздатність клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов.

Фігура 68 показує залишкову глюкозу в культурах клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов.

Фігура 69 показує рівні глутаміну в культурах клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов.

Фігура 70 показує концентрацію лактату в культурах клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов.

Фігура 71 показує рівні амонію в культурах клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов.

Фігура 72 показує відносний титр TNFR-Ig за різних експериментальних умов.

Фігура 73 показує щільності клітин анти-GDF-8, вирощених в 6000л і 1л біореакторах.

Фігура 74 показує титри анти-GDF-8 клітин, вирощених в 6000л і 1л біореакторах.

Фігура 75 показує рівні лактату клітин анти-GDF-8, вирощених в 6000л і 1л біореакторах.

Фігура 76 показує рівні амонію клітин анти-GDF-8, вирощених в 6000л і 1л біореакторах.

#### Визначення

"Близько", "Приблизно": вжиті авторами терміни "близько" і "приблизно", що застосовуються до однієї або кількох певних умов клітинної культури, стосуються діапазону значень, які є подібними до зазначеного еталонного значення для тієї умови або умов культури. У певних варіантах втілення термін "близько" стосується діапазону значень, які перебувають у межах 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 відсотка або менше зазначеного еталонного значення для тієї умови або умов культури.

"Амінокислота": вжитий авторами термін "амінокислота" стосується будь-якої із двадцяти природних амінокислот, які зазвичай використовуються в утворенні поліпептидів, або аналогів чи

похідних цих амінокислот. Амінокислоти відповідно до даного винаходу забезпечуються в середовищі до клітинних культур. Амінокислоти, що забезпечуються в середовищі, можуть пропонуватися у вигляді солі або у формі гідрату.

"Антитіло": вжитий авторами термін "антитіло" стосується молекули імуноглобуліну або імунологічно активної частини молекули імуноглобуліну, такої як фрагменти Fab або  $F(ab')_2$ , що містить одну або кілька антиген-зв'язуючих ділянок, які специфічно зв'язуються (імунореагують) з антигеном. Вжиті авторами терміни "моноклональні антитіла" і "склад моноклонального антитіла" стосуються клонової популяції молекул антитіл, які містять тільки один вид антиген-зв'язуючої ділянки, що має здатність імунореагувати зі специфічною антигенною детермінантою, тоді як терміни "поліклональні антитіла" і "склад поліклонального антитіла" стосуються популяції молекул антитіл, які містять різні види антиген-зв'язуючих ділянок, що мають здатність до взаємодії з певним антигеном. Визначення моноклональних антитіл включає клонові молекули, отримані за допомогою традиційних технологій, й молекули певної послідовності, отримані шляхом маніпуляції або мутації певних залишків, наприклад, гуманізовані антитіла.

"Серійна культура": вжитий авторами термін "серійна культура" стосується способу культивування клітин, при якому всі компоненти, які будуть в остаточному підсумку використовуватися при культивуванні клітин, включаючи середовище (див. визначення "середовища" нижче), а також самі клітини, надаються на початку процесу культивування. Як правило, в деякий момент серійна культура припиняється, а клітини і/або компоненти в середовищі збираються й, довільно, очищуються.

"Біореактор": вжитий авторами термін "біореактор" стосується будь-якого контейнера, що використовується для росту культури клітин ссавців. Біореактор може бути будь-якого розміру, що придатний для культивування клітин ссавців. Як правило, біореактор буде мати об'єм, що становить принаймні 1 літр і може бути об'ємом 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12,0000 літрів або більше, або будь-якого проміжного об'єму в цих межах. Внутрішні умови біореактора, включаючи, крім інших, рН і температуру, як правило, контролюють упродовж періоду культивування. Біореактор може складатися з будь-якого матеріалу, що є прийнятним для утримування культур клітин ссавців, суспендованих в середовищах за умов культивування відповідно до даного винаходу, включаючи скло, пластмасу або метал. Вжитий авторами термін "виробничий біореактор" стосується кінцевого біореактору, що використовується у виробництві поліпептиду або білка, що розглядається. Об'єм біореактора для великомасштабного виробництва клітинної культури, як правило, становить принаймні 500 літрів і може бути 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12,0000 літрів або більше, або будь-якого проміжного об'єму в цих межах. Звичайний спеціаліст в даній галузі буде знати й зможе обрати прийнятні біореактори для використання в практичному втіленні даного винаходу.

"Щільність клітин": вжитий авторами термін "щільність клітини" стосується кількості клітин, присутніх у даному об'ємі середовища.

"Життєздатність клітин": вжитий авторами термін "життєздатність клітини" стосується здатності клітин у культурі виживати при даному наборі умов культивування або експериментальних змін. Вжитий авторами термін також стосується тієї частини клітин, які є живими в певний час по відношенню до загальної кількості клітин, живих й мертвих, у культурі на той момент часу.

"Культура", "клітинна культура" і "культура клітин ссавців": ці вжиті авторами терміни стосуються популяції клітин ссавців, яка суспендована в середовищі (див. визначення "середовища" нижче) за умов, що підходять для виживання й/або росту клітинної популяції. Як буде очевидно для звичайних спеціалістів в даній галузі, ці вжиті авторами терміни можуть стосуватися комбінації, що містить популяцію клітин ссавців й середовище, у якому ця популяція суспендована.

"Підживлювана культура": вжитий авторами термін "підживлювана культура" стосується способу культивування клітин, при якому до культури додаються додаткові компоненти в певний час після початку процесу культивування. До компонентів, що додаються, як правило, належать харчові добавки для клітин, які були вичерпані протягом процесу культивування. Підживлювана культура зазвичай в деякий момент припиняється, а клітини і/або компоненти в середовищі збираються й, довільно, очищуються.

"Фрагмент": вжитий авторами термін "фрагмент" стосується поліпептидів і визначається як будь-яка дискретна частина даного поліпептиду, що є унікальною або характерною для цього поліпептиду. Вжитий авторами термін також стосується будь-якої дискретної частини даного поліпептиду, що зберігає принаймні частку активності повнорозмірного поліпептиду. Бажано, щоб частка збереженої активності становила принаймні 10% активності повнорозмірного поліпептиду. Більш бажано, щоб частка збереженої активності становила принаймні 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% або 90% активності повнорозмірного поліпептиду. Ще більш бажано, щоб частка збереженої активності становила принаймні 95%, 96%, 97%, 98% або 99% активності повнорозмірного поліпептиду. Найбільш бажано, щоб частка збереженої активності становила 100% активності повнорозмірного поліпептиду. Вжитий авторами термін також стосується будь-якої частини даного поліпептиду, що включає принаймні елемент встановленої послідовності, виявлений у повнорозмірному поліпептиді. Бажано, щоб елемент послідовності охоплював принаймні 4-5, більш бажано принаймні приблизно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 або більше амінокислот повнорозмірного поліпептиду.

"Ген": вжитий авторами термін "ген" стосується будь-якої нуклеотидної послідовності, ДНК або РНК, принаймні деяка частина якої кодує дискретний кінцевий продукт, як правило, крім іншого, поліпептид, що функціонує в деякому аспекті клітинного метаболізму або розвитку. Вважається, що термін стосується не тільки кодуючої послідовності

ті, що кодує поліпептид або інший дискретний кінцевий продукт, але може також охоплювати ділянки до і після кодувальної послідовності, які модулюють основний рівень експресії (див. визначення "генетичного контрольного елемента" нижче), а також проміжні послідовності ("інтрони") між індивідуальними кодувальними сегментами ("екзонами").

"Генетичний контрольний елемент": вжитий авторами термін "генетичний контрольний елемент" стосується будь-якого елемента послідовності, що модулює експресію гена, з яким він оперативно зв'язаний. Генетичні контрольні елементи можуть функціонувати шляхом збільшення або зменшення рівнів експресії й можуть бути розташовані до, у межах або після кодувальної послідовності. Генетичні контрольні елементи можуть діяти на будь-якій стадії генної експресії, регулюючи, наприклад, ініціацію, елонгацію або термінацію транскрипції, сплайсинг іРНК, редагування іРНК, стабільність іРНК, локалізацію іРНК в межах клітини, ініціацію, елонгацію або термінацію трансляції або будь-яку іншу стадію генної експресії. Генетичні контрольні елементи можуть функціонувати індивідуально або в комбінації один з одним.

"Гібридома": вжитий авторами термін "гібридома" стосується клітини, створеної шляхом злиття умертвленої клітини, отриманої з імунологічного джерела, й клітини, що продукує антитіла. Отримана гібридома представляє собою умертвлену клітину, що продукує антитіла. Окремі клітини, що використовуються для створення гібридами можуть проходити з будь-якого ссавцевого джерела, включаючи, крім іншого, щура, свиню, кролика, вівцю, свиню, козу і людину. Термін також охоплює тріомні клітинні лінії, які отримують, коли потомство гетерогібридних мієломних злиттів, що є продуктом злиття між людськими клітинами й мишачої мієломної клітинної лінії, у подальшому зливається із плазмацитом. Крім того, вважається, що термін включає будь-яку умертвлену гібридну клітинну лінію, що продукує антитіла, таку як, наприклад, квадроми (див., наприклад, Milstein et al., Nature, 537:3053 (1983)).

"Інтегрована щільність життєздатних клітин": вжитий авторами термін "інтегрована щільність життєздатних клітин" стосується середньої щільності життєздатних клітин протягом культивування, помноженої на час перебігу культивування. Припускаючи, що кількість продукованого поліпептиду й/або білка пропорційна кількості життєздатних клітин, присутніх упродовж культивування, інтегрована щільність життєздатних клітин є корисним інструментом для оцінки кількості поліпептиду й/або білка, виробленого протягом культивування.

"Середовище", "клітинне культуральне середовище", "культуральне середовище": ці вжиті авторами терміни стосуються розчину, що містить поживні речовини, які живлять зростаючі клітини ссавців. Як правило, ці розчини забезпечують незаміними й замініми амінокислоти, вітаміни, джерела енергії, ліпіди та мікроелементи, необхідні клітині для мінімального росту й/або виживання. Розчин може також містити компоненти, які збільшують ріст й/або виживання вище мінімального рівня, включаючи фактори росту й гормони. В оптимальному варіанті розчини готують у такий спосіб,

що рН й концентрації солей є оптимальними для виживання та проліферації клітин. Середовище може також належати до "визначених середовищ" - середовищ без сироватки, що не містять жодних білків, гідролізатів або компонентів невідомого складу. Визначені середовища не містять компонентів тваринного походження, і всі компоненти мають відому хімічну структуру.

"Відходи метаболізму": вжитий авторами термін "відходи метаболізму" стосується сполук, що продукуються клітинною культурою внаслідок нормальних або патологічних метаболічних процесів, які є до певної міри шкідливими для клітинної культури, особливо по відношенню до експресії або активності бажаного рекомбінантного поліпептиду або білка. Наприклад, відходи метаболізму можуть бути шкідливими для росту або життєздатності клітинної культури, можуть зменшувати кількість продукованого рекомбінантного поліпептиду або білка, можуть змінювати згортання, стабільність, глікозилювання або іншу посттрансляційну модифікацію експресованого поліпептиду або білка, чи можуть бути шкідливими для клітин й/або експресії чи активності рекомбінантного поліпептиду або білка у будь-який інший спосіб. До прикладів відходів метаболізму належать лактат, що виробляється внаслідок метаболізму глюкози, і амоній, що виробляється внаслідок метаболізму глютаміну. Одна мета даного винаходу полягає в сповільненні виробництва, зниженні або навіть усуненні відходів метаболізму в культурах клітин ссавців.

"Осмолярність" і "осмоляльність": "осмоляльність" - міра осмотичного тиску розчинених часток у водному розчині. Частки включають іони й неіонізовані молекули. Осмоляльність виражається як концентрація осмотично активних часток (тобто, осмолі), розчинених в 1кг розчину (1мОсм/кг H<sub>2</sub>O при 38°C відповідає осмотичному тиску, рівному 19мм рт.ст). "Осмолярність", на відміну від цього, стосується кількості часток, розчинених в 1 літрі розчину. Вжите авторами скорочення "мОсм" означає "міліосмолі/кг розчину".

"Перфузійна культура": вжитий авторами термін "перфузійна культура" стосується способу культивування клітин, при якому до культури додаткові компоненти додаються безперервно або напівбезперервно після початку процесу культивування. Додані компоненти, як правило, включають поживні добавки для клітин, які були вичерпані протягом процесу культивування. Частина клітин й/або компонентів у середовищі, як правило, збирається на безперервній або напівбезперервній основі й, довільно, очищується.

"Поліпептид": вжитий авторами термін "поліпептид" стосується послідовного ланцюга амінокислот, з'єднаних за допомогою пептидних зв'язків. Вжитий термін стосується амінокислотного ланцюга будь-якої довжини, але звичайний спеціаліст в даній галузі розумітиме, що термін не обмежується довгими ланцюгами й може стосуватися мінімального ланцюга, що включає дві амінокислоти, з'єднані разом за допомогою пептидного зв'язку.

"Білок": вжитий авторами термін "білок" стосується одного або кількох поліпептидів, які функціонують як дискретна одиниця. Якщо окремий поліпептид є дискретною функціонуючою одиницею й

не потребує постійної фізичної асоціації з іншими поліпептидами для утворення дискретної функціонуючої одиниці, вжиті авторами терміни "поліпептид" і "білок" використовуються по чергову. Якщо дискретна функціональна одиниця складається з більш ніж одного поліпептиду, які фізично асоціюються один з одним, вжитий авторами термін "білок" стосується кількох поліпептидів, які фізично з'єднані й функціонують разом як дискретна одиниця.

"Рекомбінантно експресований поліпептид" і "рекомбінантний поліпептид": ці вжиті авторами терміни стосуються поліпептиду, експресованого із ссавцевої клітини-хазяїна, що була генетично створена для експресії цього поліпептиду. Рекомбінантно експресований поліпептид може бути ідентичним або подібним до поліпептидів, які зазвичай експресуються в ссавцевій клітині-хазяїні. Рекомбінантно експресований поліпептид може також бути стороннім для клітини-хазяїна, тобто гетерологічним до пептидів, що зазвичай експресуються в ссавцевій клітині-хазяїні. Альтернативно, рекомбінантно експресований поліпептид може бути химерним, оскільки частини поліпептиду містять амінокислотні послідовності, які є ідентичними або подібними до поліпептидів, що зазвичай експресуються в ссавцевій клітині-хазяїні, у той час як інші частини є сторонніми для клітини-хазяїна.

"Посів": вжитий авторами термін "посів" стосується процесу переносу клітинної культури в біореактор або інший контейнер. Клітини можуть попередньо розмножуватись в іншому біореакторі або контейнері. Альтернативно, клітини можуть бути заморожені й розморожені безпосередньо перед їх переносом в біореактор або контейнер. Термін стосується будь-якої кількості клітин, включаючи одну клітину.

"Титр": вжитий авторами термін "титр" стосується загальної кількості рекомбінантно експресованого поліпептиду або білка, продукovanого культурою клітин ссавців, розділеної на дану кількість об'єму середовища. Титр, як правило, виражається в одиницях міліграмів поліпептиду або білка на мілілітр середовища.

Даний винахід пропонує удосконалені системи для виробництва білків і/або поліпептидів клітинною культурою. Зокрема, винахід пропонує системи, які мінімізують продукування одного або кількох продуктів метаболізму, шкідливих для росту, життєздатності клітин і/бо виробництва або якості білка. В оптимальному варіанті втілення даного винаходу, клітинна культура є серійною або підживлювальною культурою. Інші певні варіанти втілення винаходу, яким надається перевага, докладно обговорюються нижче. Звичайні спеціалісти в даній галузі розуміють, однак, що різні модифікації до цих переважних варіантів втілення охоплюються обсягом представленої нижче формули винаходу. Формула винаходу та її рівноцінні варіанти, що визначають обсяг даного винаходу, не є й не повинні обмежуватись певними переважними варіантами втілення або цим описом певних переважних варіантів втілення.

Поліпептиди

Будь-який поліпептид, що може експресуватись в клітині-хазяїні, може бути вироблений відповідно до даного винаходу. Поліпептид може експресуватись із гена, що є ендегенним для клітини-хазяїна, або із гена, що введений в клітину-хазяїна шляхом генної інженерії. Поліпептид може бути пептидом, що зустрічається в природі, або може, альтернативно, мати послідовність, що була створена або відібрана рукою людини. Створений генною інженерією поліпептид може бути зібраний із інших поліпептидних сегментів, які окремо зустрічаються в природі, або може включати один або кілька сегментів, які не зустрічаються в природі.

Поліпептиди, які можуть, за бажанням, бути експресовані відповідно до даного винаходу, часто будуть відбиратись на підставі потрібної біологічної або хімічної активності. Наприклад, даний винахід може використовуватись для експресії будь-якого фармацевтично або комерційно доцільного ферменту, рецептора, антитіла, гормону, регуляторного фактора, антигену, зв'язуючого агента і т.п.

Антитіла

З огляду на велику кількість антитіл, що використовуються у даний час або досліджуються у якості фармацевтичних або інших комерційних засобів, виробництво антитіл представляє особливий інтерес відповідно до даного винаходу. Антитіла - це білки, які мають здатність специфічно зв'язувати певний антиген. Відповідно до даного винаходу може використовуватись будь-яке антитіло, що може бути експресоване в клітині-хазяїні. В оптимальному варіанті втілення, антитіло, що експресується, є моноклональним антитілом.

В іншому оптимальному варіанті втілення, моноклональне антитіло є химерним антитілом. Химерне антитіло містить амінокислотні фрагменти, які отримані з більш ніж одного організму. Молекули химерного антитіла можуть включати, наприклад, антиген-зв'язуючий домен із антитіла миші, щура або інших видів, з людськими константними ділянками. Описані різноманітні тактики для створення химерних антитіл. Див. наприклад, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851 (1985); Takeda et al., Nature 314, 452 (1985), Cabilly et al., Патент США №4816567; Boss et al., Патент США №4816397; Tanaguchi et al., Публікація Європейського Патенту EP 171496; Публікація Європейського Патенту 0173494, Патент Великобританії GB 2177096B.

В іншому оптимальному варіанті втілення, моноклональне антитіло є людським антитілом, отриманим, наприклад, за допомогою рибосом-дисплейних або фаг-дисплейних бібліотек (див., наприклад, Winter et al., Патент США №6291159 і Kawasaki, Патент США №5658754), або використання ксенотрансплантатних видів, у яких нативні гени антитіла інактивовані й функціонально заміннені людськими генами антитіла, при цьому залишаючи неушкодженими інші компоненти нативної імунної системи (див., наприклад, Kucherlapati et al., Патент США №6657103).

В іншому оптимальному варіанті втілення, моноклональне антитіло є гуманізованим антитілом. Гуманізоване антитіло є химерним антитілом, в

якому значна більшість амінокислотних залишків отримана з людських антитіл, у такий спосіб зводячи до мінімуму будь-яку потенційну імунну реакцію при переносі у людський суб'єкт. В гуманізованих антитілах амінокислотні залишки в ділянках, що визначають комплементарність, замінені, принаймні частково, залишками із не людських видів, які обумовлюють бажану антиген-специфічність або афінність. Такі змінені молекули імуноглобуліну можуть бути створені за допомогою будь-якого з декількох способів, відомих в даній галузі (наприклад, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 7308-7312 (1983); Kozbor et al., Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson et al., Meth Enzymol, 92, 3-16 (1982)), і бажано вироблені відповідно до положень РСТ Публікації WO92/06193 або EP 0239400, зміст кожної з яких включений авторами шляхом посилання. Гуманізовані антитіла можуть вироблятися комерційно, наприклад, Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Великобританія. Для ознайомлення з додатковою літературою, див. Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); і Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992), зміст кожного з них включений авторами шляхом посилання.

В іншому оптимальному варіанті втілення, моноклональні, химерні або гуманізовані антитіла, описані вище, можуть містити амінокислотні залишки, які у природі не зустрічаються в жодному антитілі в жодних видах. Ці сторонні залишки можуть використовуватися, наприклад, для надання нової або модифікованої специфічності, афінності або ефektorної функції моноклональному, химерному або гуманізованому антитілу. В іншому оптимальному варіанті втілення, описані вище антитіла можуть бути кон'югованими із препаратами для системної фармакотерапії, такими як токсини, низькомолекулярні цитотоксичні препарати, модифікатори біологічної відповіді та радіонукліди (див. наприклад, Kunz et al., Кон'югати носій-похідне каліхеаміцину (Calicheamicin derivative-carrier conjugates). US20040082764 A1).

В одному варіанті втілення антитіло є антитілом, що специфічно зв'язується із фрагментом Аβ амілоїдного білка-попередника або з іншими компонентами амілоїдної бляшки, і є корисним в боротьбі з накопиченням амілоїдних бляшок у мозку, що характерне для хвороби Альцгеймера. (див., наприклад, Патентна заявка США 60/636684).

В іншому варіанті втілення антитіла відповідно до даного винаходу спрямовані проти антигенів поверхні клітини, що експресуються на цільових клітинах і/або тканинах при проліферативних захворюваннях, таких як рак. В одному варіанті втілення антитіло є антитілом анти-Льюїс Y IgG1. Льюїс Y - це вуглеводневий антиген зі структурою  $Fuca1 \rightarrow 2Gal\beta 1 \rightarrow 4[Fuca1 \rightarrow 3]GlcNac\beta 1 \rightarrow 3R$  (Abe et al. (1983) J. Biol. Chem., 258 11793-11797). Антиген Льюїс Y експресується на поверхні від 60% до 90% людських епітеліальних пухлин (включаючи пухлини молочної залози, товстої кишки, легені та передміхурової залози), принаймні 40% яких надекспресують цей антиген, і має обмежену експресію в нормальних тканинах.

Для того, щоб спрямовуватися на Ley й ефективно націлюватися на пухлину, в ідеалі потрібне антитіло з винятковою специфічністю до антигену. Таким чином, бажано, щоб антитіла анти-Льюїс Y відповідно до даного винаходу не реагували перехресно зі структурами типу 1 (тобто, лакто-серіями груп крові (Lea і Leb)) і, бажано, не зв'язували інші антигенні детермінанти типу 2 (тобто, неолакто-структуру), таку як структури Lex і H-типу 2. Прикладом оптимального антитіла анти-Льюїс Y є створене hu3S193 (див. Патент США №№ 6310185; 6518415; 5874060, зміст яких включений авторами у повному обсязі). Гуманізоване антитіло hu3S193 (Attia, M.A., et al. 1787-1800) було отримане шляхом пересадки CDR від 3S193, яке є мишачим моноклональним антитілом, що утворюється проти клітини аденокарциноми з винятковою специфічністю до Ley (Kitamura, K., 12957-12961). Hu3S193 не тільки зберігає специфічність 3S193 до Ley, але й також набуває здатності опосередковувати комплемент-залежну цитотоксичність (далі зазначається як CDC) і антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (далі зазначається як ADCC) (Attia, M.A., et al. 1787-1800). Це антитіло спрямовується на ксенотрансплантати, що експресують Ley, у голих мишах, як демонструється в дослідженнях біорозподілу з hu3S193, міченим  $^{125}I$ ,  $^{111}In$  або  $^{18}F$ , а також іншими радіоактивними мітками, що потребують хелатуючого агента, типу  $^{111}In$ ,  $^{99m}Tc$ , або  $^{90}Y$  (Clark, et al. 4804-4811).

В іншому варіанті втілення антитіло є одним з людських антитіл анти-GDF-8, названих Myo29, Myo28 та Myo22, і антитілами та антиген-зв'язуючими фрагментами, отриманими з них. Ці антитіла здатні зв'язувати зрілий GDF-8 з високою афінністю, інгібувати активність GDF-8 *in vitro* та *in vivo*, як продемонстровано, наприклад, шляхом інгібування зв'язування ActRIIB і випробувань гена-репортера, і можуть інгібувати активність GDF-8, пов'язану з негативним регулюванням скелетно-м'язової маси й кісткової щільності. Див., наприклад, Veldman, et al., Патент США №20040142382.

#### Рецептори

Інший клас поліпептидів, які продемонстрували свою ефективність у якості фармацевтичних й/або комерційних засобів, включає рецептори. Рецептори - це, як правило, трансмембранні гліко-протеїни, які функціонують шляхом розпізнання позаклітинного сигнального ліганду. Рецептори, як правило, містять протеїнкіназний домен на додаток до домену, який розпізнає ліганд, що ініціює сигнальний шлях, фосфорилуючи цільові внутрішньоклітинні молекули після зв'язування ліганду, що призводить до змін, пов'язаних з розвитком або метаболізмом, усередині клітини. В одному варіанті втілення рецептори, що розглядаються, модифікуються таким чином, щоб вилучити у них трансмембранний й/або внутрішньоклітинний домен(и), замість якого може довільно бути прикріплений Ig-домен. В оптимальному варіанті втілення рецептори, що виробляються відповідно до даного винаходу, є рецепторними тирозинкіназами (RTK). Родина RTK включає рецептори, які є критичними для різних функцій численних типів клітин (див., наприклад, Yarden and Ullrich, Ann. Rev. Biochem.

57:433-478, 1988; Ullrich and Schlessinger, Cell 61:243-254, 1990, зміст яких включений авторами шляхом посилання). До прикладів RTK, належать, крім інших, члени родини рецепторів фактора росту фібробластів (FGF - fibroblast growth factor), члени родини рецепторів епідермального фактора росту (EGF - epidermal growth factor), рецептор тромбоцитарного фактора росту (PDGF - platelet derived growth factor), тирозинкіназа з імунглобулін- і EGF-гомологічними доменами-1 (TIE-1) і рецептори TIE-2 (Sato et al., Nature 376(6535):70-74 (1995), зміст якого включений авторами шляхом посилання) і c-Met рецептор, деякі з яких, як припускається, стимулюють ангиогенез, прямо або непрямо (Mustonen and Alitalo, J. Cell Biol. 129:895-898, 1995). До інших прикладів RTK належать ембріональна печінкова кіназа 1 (FLK-1 - fetal liver kinase 1) (іноді зазначається як рецептор, що містить кіназний домен-вставку (KDR - kinase insert domain-containing receptor) (Terman et al., Oncogene 6:1677-83, 1991) або рецептор судинного ендотеліального клітинного фактора росту 2 (VEGFR-2 - vascular endothelial cell growth factor receptor 2)), fms-подібна тирозинкіназа 1 (Fit-1 - fms-like tyrosine kinase-1) (DeVries et al. Science 255:989-991, 1992; Shibuya et al., Oncogene 5:519-524, 1990), іноді зазначається як рецептор судинного ендотеліального клітинного фактора росту 1 (VEGFR-1 - vascular endothelial cell growth factor receptor 1), нейротрофілін-1, ендоглін, ендозіалін і Ах1, але не обмежуються ними. Звичайні спеціалісти в даній галузі знатимуть інші рецептори, які можуть оптимально бути експресовані відповідно до даного винаходу.

У варіанті втілення, якому надається особлива перевага, відповідно до даного винаходу експресуються інгібітори фактору некрозу пухлини, у формі альфа й бета рецепторів фактору некрозу пухлини (TNFR-1; EP417 563, опублікований 20 березня 1991 року; і TNFR-2, EP 417 014 опублікований 20 березня 1991 року) (для огляду, див. Naismith and Sprang, J Inflamm. 47(1-2):1-7 (1995-96), зміст якого включений авторами шляхом посилання). Відповідно до одного варіанту втілення інгібітор фактору некрозу пухлини містить розчинний рецептор TNF і, бажано, TNFR-Ig. В одному варіанті втілення оптимальними інгібіторами TNF відповідно до даного винаходу є розчинні форми TNFR-I і TNFR-II, а також розчинні TNF-зв'язуючі білки, в іншому варіанті втілення злиття TNFR-Ig є TNFR:Fc, термін, що використовується авторами, стосується "etanercept", що є димером двох молекул позаклітинної частини р75 TNF-альфа. рецептора, кожна молекула складається з 235-амінокислотної Fc частини субодиниці 1 людського IgG.

Фактори росту та інші сигнальні молекули

Інший клас поліпептидів, які показали свою ефективність у якості фармацевтичних й/або комерційних засобів, включає фактори росту та інші сигнальні молекули. Фактори росту це, як правило, глікопротеїни, які секретуються клітинами й зв'язуються із та активують рецептори на інших клітинах, ініціюючи зміни, пов'язані з розвитком або метаболізмом, в рецепторній клітині. В одному варіанті втілення білок, що розглядається, є зли-

тим поліпептидом ActRIIB, що містить позаклітинний домен рецептора ActRIIB і частину Fc антитіла (див., наприклад, Wolfman, et al., Злитий поліпептид ActRIIB та його використання (ActRIIB fusion polypeptides and uses therefor), US2004/0223966 A1). В іншому варіанті втілення фактором росту може бути модифікований пропептид GDF-8 (см., наприклад, Wolfman, et al., Модифіковані та стабілізовані пропептиди GDF та їх використання (Modified and stabilized GDF propeptides and uses thereof), US2003/0104406 A1). Альтернативно, білок, що розглядається, міг би бути білком, що містить домен фолістатину (див., наприклад, Hill, et al., GASP1: білок, що містить домен фолістатину (GASP1: a follistatin domain containing protein). US 2003/0162714 A1, Hill, et al., GASP1: білок, що містить домен фолістатину (GASP1: a follistatin domain containing protein), US 2005/0106154 A1, Hill, et al., Білки, що містять домен фолістатину (Follistatin domain containing proteins). US 2003/0180306 A1).

До прикладів факторів росту ссавців й інших сигнальних молекул належать, крім інших, цитокіни; епідермальний фактор росту (EGF); тромбоцитарний фактор росту (PDGF); фактори росту фібробластів (FGF), такі як aFGF і bFGF; трансформуючі фактори росту (TGF), такі TGF-альфа й TGF-бета, включаючи TGF-бета 1, TGF-бета 2, TGF-бета 3, TGF-бета 4 або TGF-бета 5; інсуліноподібний фактор росту-I і -II (IGF-I і IGF-II); дес(1-3)-IGF-I (IGF-I мозку), білки, що зв'язують інсуліноподібні фактори росту; CD білки, такі як CD-3, CD-4, CD-8 і CD-19; еритропоєтин; остеоеіндуктивні фактори; імунотоксини; кістковий морфогенетичний білок (BMP - bone morphogenetic protein); інтерферон, такий як інтерферон-альфа, -бета, і -гама; колонієстимулюючі фактори (CSF - colony stimulating factors), наприклад, M-CSF, GM-CSF і G-CSF; інтерлейкіни (IL), наприклад, від IL-1 до IL-10; фактор некрозу пухлини (TNF) альфа й бета; А-ланцюг інсуліну; В-ланцюг інсуліну; проінсулін; фолікулостимулюючий гормон; кальцитонін; лютеїнізуючий гормон; глюкагон; коагулюючі фактори, такі як фактор VIIIС, фактор IX, тканинний фактор і фактор фон Віллебранда; антикоагулюючі фактори, такі як Білок С; передсердний натрійуретичний фактор; легеневи сурфактант; активатор плазміногена, такий як урокіназа або людський сечовий або тканинний активатор плазміногена (t-PA); бомбезин; тромбін, гемопоетичний фактор росту; енкефаліназа; RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted - регульований при активації звичайно Т-клітин, експресований і секретований); людський запальний білок макрофагів (MIP-1-альфа); мулеріан-інгібуюча речовина; А-ланцюг релаксину; В-ланцюг релаксину; прорелаксин; мишачий гонадотропін-асоційований пептид; нейротрофічні фактори, такі як кістковий нейротрофічний фактор (BDNF - bone-derived neurotrophic factor), нейротрофін-3, -4, -5, або -6 ( NT-3, NT-4, NT-5, або NT-6), або фактор росту нервів, такий як NGF-бета. Звичайні спеціалісти в даній галузі знатимуть інші фактори росту або сигнальні молекули, які можуть бути експресовані відповідно до даного винаходу.

G-білок спряжені рецептори

Інший клас поліпептидів, які показали свою ефективність у якості фармацевтичних й/або комерційних засобів, включає фактори росту та інші сигнальні молекули. G-білок спряжені рецептори (GPCR - G-protein coupled receptor) - це білки, які мають сім трансмембранних доменів. Після зв'язування ліганда із GPCR, всередині клітини трансдукується сигнал, що призводить до зміни біологічної або фізіологічної властивості клітини.

GPCR, разом з G-білками та ефекторами (внутрішньоклітинними ферментами й каналами, які модулюються G-білками), є компонентами модульної сигнальної системи, що з'єднує стан внутрішньоклітинних вторинних месенджерів із позаклітинними вхідними сигналами. Ці гени й генні продукти є потенційними збудниками захворювання.

Певні дефекти в гені родопсину й гені рецептора вазопресину V2, як показано, спричинює різні форми аутосомальної доміантної й аутосомальної рецесивної пігментної дегенерації сітківки, нецукрового ниркового діабету. Ці рецептори мають критичне значення для центральної нервової системи і для периферійних фізіологічних процесів. Суперродина білків GPCR на даний час містить більш ніж 250 типів паралогів, рецепторів, які представляють варіанти, отримані шляхом дуплікації гену (або інших процесів), на противагу ортологам, тим же рецепторам від різних видів. Суперродина може бути розділена на п'ять родин: Родина I, рецептори, типовими представниками яких є родопсин і бета2-адренергічний рецептор, і на даний час представлена більш ніж 200 унікальними членами; Родина II, що нещодавно охарактеризована родиною рецепторів секретину/кальцитоніну/паратиреоїдного гормону; Родина III, родина метаботропного глутаматного рецептору в ссавців; Родина IV, родина cAMP рецепторів, важлива при хемотаксисі і розвитку *D. discoideum*; і Родина V, грибові спряжені рецептори феромонів, такі як STE2.

GPCR включають рецептори для біогенних амінів, для ліпідних медіаторів запалення, пептидних гормонів і сенсорних сигнальних медіаторів. GPCR стає активованим при зв'язуванні рецептором його позаклітинного ліганда. Конформаційні зміни в GPCR, які спричинені взаємодією ліганд-рецептор, впливають на зв'язуючу афінність G-білка із внутрішньоклітинними доменами GPCR. Це дає GTP можливість зв'язуватись з G білком із підвищеною афінністю.

Активация G білка за допомогою GTP призводить до взаємодії  $\alpha$  субодиниці G білка з аденилатциклазою або іншими генераторами молекул вторинних месенджерів. Ця взаємодія регулює активність аденилатциклази, а отже продукування молекули вторинного месенджеру, cAMP. cAMP регулює фосфорилування й активацію інших внутрішньоклітинних білків. Альтернативно, клітинні рівні інших молекул вторинних месенджерів, таких як cGMP або ейкозиноїди, можуть підвищуватись або знижуватись активністю GPCR.  $\alpha$  субодиниця G білка дезактивується шляхом гідролізу GTP за допомогою GTPази, а  $\alpha$ ,  $\beta$ , і  $\gamma$  субодиниці повторно асоціюють. Після цього гегеротримерний G білок відокремлюється від аденилатциклази або

іншого генератора молекул вторинних месенджерів. Активність GPCR може також регулюватися шляхом фосфорилування внутрішньо- і позаклітинних доменів або петель.

Глутаматні рецептори формують групу GPCR, які є важливими в нейротрансмісії. Глутамат є головним трансмітером в ЦНС і, як вважається, грає важливу роль в нейрональній пластичності, когнітивній функції, пам'яті, навчанні і при декількох неврологічних захворюваннях, таких як епілесія, інсульт і нейродегенеративні порушення (Watson, S. and S. Arkininstall (1994) *The G-Protein Linked Receptor Facts Book*, Academic Press, San Diego CA, pp. 130-132). Ці ефекти глутамата опосередковуються двома різними класами рецепторів під назвою іонотропні і метаботропні. Іонотропні рецептори містять внутрішній катіонний канал й опосередковують швидкі збуджувальні дії глутамату. Метаботропні рецептори є модуляторними, збільшуючи мембранну збудливість нейронів шляхом інгібування кальцієзалежної калієвої провідності і шляхом інгібування та потенціювання збуджувальної передачі іонотропних рецепторів. Метаботропні рецептори класифікуються на п'ять підтипів, базуючись на фармакології агоніста й шляхах трансдукції сигналу, й широко розподіляються в тканинах головного мозку.

Родина вазоактивних кишкових поліпептидів (VIP - vasoactive intestinal polypeptide), є групою споріднених поліпептидів, дії яких також опосередковуються GPCR. Ключовими членами цієї родини є безпосередньо VIP, секретин і фактор, що вивільняє гормон росту (GRF - growth hormone releasing factor). VIP має широкий спектр фізіологічної дії, включаючи розслаблення гладких м'язів, стимуляцію або інгібування секреції в різних тканинах, модуляцію різних видів активності імунних клітин та різні збуджувальні й інгібувальні види активності в ЦНС. Секретин стимулює секрецію ферментів та іонів у підшлунковій залозі й кишечнику й також є присутнім у маленьких кількостях в мозку. GRF є важливим нейроендокринним агентом, що регулює синтез і вивільнення гормону росту із передньої частки гіпофізу (Watson, S. and S. Arkininstall вище, pp. 278-283).

Після зв'язування ліганда з GPCR, конформаційна зміна передається до G білка, що змушує  $\alpha$ -субодиницю обміняти зв'язану молекулу GDP на молекулу GTP і відокремитись від  $\beta\gamma$ -субодиниць. GTP-зв'язана форма  $\alpha$ -субодиниці, як правило, функціонує як ефектор-модулюючий залишок, призводячи до продукування вторинних месенджерів, таких як циклічний AMP (наприклад, шляхом активації аденилатциклази), диацилгліцерину або фосфатів інозиту. Для людини відомо більш ніж 20 різних типів  $\alpha$ -субодиниць, які зв'язуються з меншим об'єднанням  $\beta$  і  $\gamma$ -субодиниць. До прикладів ссавцевих G білків належать Gi, Go, Gq, Gs і Gt. G білки докладно описані в Lodish H. et al. *Molecular Cell Biology*, (Scientific American Books Inc., New York, N.Y., 1995), зміст якої включений авторами шляхом посилання.

GPCR є головною мішенню для дії й розробки препаратів. Фактично, рецептори призвели до розробки більш ніж половини відомих на даний час препаратів (Drews, *Nature Biotechnology*, 1996, 14:



1516), і GPCR представляють найважливішу мішень для терапевтичного втручання, причому 30% препаратів, що клінічно призначаються, антагонізують або агонізують GPCR (Milligan, G. and Rees, S., (1999) TIPS. 20: 118-124). Це демонструє, що використання рецепторів такого типу у якості терапевтичних мішеней є добре встановленим, доведеним фактом.

Взагалі, спеціалісти при практичному втіленні даного винаходу будуть обирати поліпептид, що їх цікавить, і знатимуть його точну амінокислотну послідовність. Способи відповідно до даного винаходу успішно застосовувались у виробництві різноманітних поліпептидів, включаючи, наприклад, людське моноклональне антитіло, спрямоване на фактор росту й диференціювання 8 (Приклади 1, 3, 4, 7-14), гуманізоване антитіло анти-Льюїс Y (Приклади 5 і 6), анти-АБета (Приклад 15) і димерний Fc-злитий білок рецептора фактора некрозу пухлини (Приклад 16), що свідчить про те, що даний винахід буде корисним для експресії цілого спектру різних поліпептидів і білків. Будь-який даний білок, що повинен бути експресований відповідно до даного винаходу, матиме свої власні особливі характеристики й може впливати на щільність або життєздатність культивованих клітин, і може бути експресований на більш низьких рівнях ніж інший поліпептид або білок, вирощений при ідентичних умовах культури. Звичайний спеціаліст в даній галузі матиме змогу відповідним чином модифікувати кроки й композиції даного винаходу з метою оптимізації клітинного росту й/або виробництва будь-якого даного поліпептиду або білка, що експресується.

#### Генетичні контрольні елементи

Як буде очевидно для звичайних спеціалістів в даній галузі, генетичні контрольні елементи можуть використовуватися з метою регулювання генної експресії поліпептиду або білка. Такі генетичні контрольні елементи повинні відбиратися на основі їх активності у відповідній клітині-хазяїні. Контрольні елементи можуть бути конститутивно активними або можуть бути індукційними за певних обставин. Індукційні контрольні елементи є особливо корисними у випадках, коли експресований білок є токсичним або іншим чином шкідливо впливає на ріст і/або життєздатність клітин. У таких випадках, регулювання експресії поліпептиду або білка через індукційні контрольні елементи може покращити життєздатність клітин, щільність клітини і/або сумарний вихід експресованого поліпептиду або білка. В даній галузі відома й доступна велика кількість контрольних елементів, корисних у практичному втіленні даного винаходу.

Представники конститутивних ссавцевих промотерів, які можуть використовуватися відповідно до даного винаходу, включають, крім інших, промотер гіпоксантин фосфорибозилтрансферази (HPTR - hypoxanthine phosphoribosyl transferase), промотер аденозиндеамінази, промотер піруваткінази, промотер бета-актину, а також інші конститутивні промотери, відомі звичайним спеціалістам в даній галузі. Додатково, до вірусних промотерів, які, як показано, стимулюють конститутивну експресію кодуючих послідовностей в еукаріотичних

клітинах, належать, наприклад, промотер мавпячого вірусу, промотери вірусу герпесу простого, промотери папіломавірусу, промотери аденовірусу, промотери вірусу імунodefіциту людини (ВІЛ), промотери вірусу саркоми Рausa, промотери цитомегаловірусу (ЦМВ), довгі термінальні повторення (LTR) вірусу мишачої лейкемії Молоні та інших ретровірусів, промотер тимідинкінази вірусу герпесу простого, а також інші вірусні промотери, відомі звичайним спеціалістам в даній галузі.

Індукційні промотери запускають експресію операційно зв'язаних кодуючих послідовностей в присутності індукуючого агенту й можуть також використовуватися відповідно до даного винаходу. Наприклад, у клітинах ссавців, металотіонеїновий промотер індукуює транскрипцію низхідних кодуючих послідовностей у присутності певних іонів металу. Інші індукційні промотери будуть визнані й/або відомі звичайним спеціалістам в даній галузі.

Зазвичай, генна послідовність експресії також включатиме 5'нетранскрибуючі і 5'нетранслюючі послідовності, пов'язані з ініціюванням транскрипції й трансляції, відповідно, такі як рамка TATA, кеппінг послідовності, послідовність CAAT і т.п. Для збільшення рівнів експресії поліпептидів або білків, які будуть експресуватися, можуть доцільно використовуватися елементи-посилувачі. До прикладів елементів-посилувачів, які, як показано, функціонують в клітинах ссавців, належить SV40 ранній генний посилувач, як описано в Dijkema et al., EMBO J. (1985) 4: 761 і посилувач/промотер, отриманий із довгого термінального повторення (LTR) вірусу саркоми Рausa (RSV - Rous Sarcoma Virus), як описано в Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79:6777 і людського цитомегаловірусу, як описано в Boshart et al., Cell (1985) 41:521.

Системи для зв'язування контрольних елементів із кодуючими послідовностями відомі в даній галузі (загальні методи молекулярної біології та рекомбінантної ДНК описані в Sambrook, Fritsch, and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, зміст якого включений авторами шляхом посилання). Комерційні вектори, що підходять для вставки оптимальної кодуючої послідовності для експресії в різних клітинах ссавців за різних умов росту та індукції також добре відомі в даній галузі.

Введення кодуючих послідовностей і відповідних контрольних елементів в клітини-хазяїни

Способи, що підходять для введення в ссавцеві клітини-хазяїни нуклеїнових кислоти, достатніх для досягнення експресії поліпептидів або білків, що розглядаються, відомі в даній галузі. Див., наприклад, Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); Levinson et al.; EP 117,060; and EP 117058, зміст кожного з яких включений авторами шляхом посилання.

Для клітин ссавців, оптимальні способи трансформації включають спосіб осадження фосфатом кальцію Graham і van der Erb, Virology, 52:456-457 (1978) або спосіб з ліпофектаміном™ (Gibco BRL) Hawley-Nelson, Focus 15:73 (1993). Загальні аспекти системних трансформацій ссавцевих клітин-

хазяїнів були описані Axel у Патенті США №4399216, виданому 16 серпня 1983 року. Для ознайомлення з різними способами для трансформації ссавцевих клітин, див. Keown et al., *Methods in Enzymology* (1989), Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990), і Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988). До характерних прикладів прийнятних векторів для експресії поліпептидів або білків у клітинах ссавців належать, крім інших, pCDNA1; pCD, див. Okayama, et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:1136-1142; pMCIneo Poly-A, див. Thomas, et al. (1987) *Cell* 51:503-512; і вектор бациловірусу, такий як pAC 373 або pAC 610.

В оптимальних варіантах втілення, поліпептид або білок стійко трансфектується в клітинуюхазяїна. Однак, звичайний спеціаліст в даній галузі визнає, що даний винахід може використовуватися у випадку транзиторно або стійко трансфектованих клітин ссавців.

#### Клітини

Відповідно до даного винаходу може використовуватися будь-яка клітина ссавця або тип клітин, сприйнятливий до клітинної культури і до експресії поліпептидів. До прикладів клітин ссавців, які можуть використовуватися відповідно до існуючого винаходу, належать, крім інших, лінія мишачої мієломи BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); людські ретинобласти (PER.C6 (CruCell, Leiden, Нідерланди)); лінія CV1 нирки мавпи, трансформована за допомогою SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); лінія людської ембріональної нирки (клітини 293 або 293, субклоновані для росту в суспензійній культурі, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); клітини нирки дитинчат хом'яків (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'яка +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); клітини Сертолі миші (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); клітини нирки мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клітини людського раку шийки матки (HeLa, ATCC CCL 2); клітини нирки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки щура Буффало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини людської легені (W138, ATCC CCL 75); клітини людської печінки (Hep G2, HB 8065); мишача пухлина молочної залози (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TPI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); клітини MRC 5; клітини FS4; і лінія людської гепатоаденоми (Hep G2). У варіанті втілення, якому надається особлива перевага, даний винахід використовується для культивування та експресії поліпептидів і білків із клітинних ліній CHO.

Крім цього, відповідно до даного винаходу може використовуватися будь-яка кількість комерційно й некомерційно доступних клітинних ліній гібридом, які експресують поліпептиди або білки. Спеціаліст, кваліфікований в даній галузі, добре розумітиме, що клітинні лінії гібридом можуть мати різні вимоги щодо живлення й/або можуть потребувати різних умов культивування для оптимального росту й експресії поліпептиду або білка, і матиме змогу модифікувати умови, у разі необхідності.

Як відзначено вище, у багатьох випадках клітини будуть відбиратися або створюватися для

продукції високих рівнів білка або поліпептиду. Часто, клітини створюються генетично для продукції високих рівнів білка, наприклад, шляхом введення гена, що кодує білок або поліпептид, який розглядається, й/або за допомогою введення контрольних елементів, які регулюють експресію гена (ендогенного або введенного), що кодує поліпептид, який розглядається.

Певні поліпептиди можуть шкідливо впливати на ріст клітини, життєздатність клітини або деякі інші характеристики клітин, що в остаточному підсумку до певної міри обмежує виробництво поліпептиду або білка, який розглядається. Навіть серед популяції клітин одного певного типу, створеного для експресії певного поліпептиду, існує варіабельність у межах клітинної популяції, таким чином, що певні індивідуальні клітини будуть рости краще й/або продукуватимуть більше поліпептиду, що розглядається. У певних оптимальних варіантах втілення даного винаходу, клітинна лінія відбирається практиком емпіричним шляхом для здорового росту за певних умов, обраних для культивування клітин. У варіантах втілення, яким надається особлива перевага, індивідуальні клітини, створені для експресії певного поліпептиду обираються для великомасштабного виробництва, базуючись на рості клітин, кінцевій щільності клітин, відсотку життєздатності клітин, титрі експресованого поліпептиду або будь-якої їх комбінації чи будь-яких інших умовах, що вважаються практиком важливими.

#### Фаза клітинної культури

До типових процедур для продукування поліпептиду, що розглядається, належать серійні культури й підживлювані культури. Процеси серійної культури традиційно включають інокуляцію культури для великомасштабного виробництва посівною культурою з певною конкретною щільністю клітин, вирощування клітин за умов, що сприяють росту й життєздатності клітин, збір культури, коли клітини досягають зазначеної щільності клітин, і очищення експресованого поліпептиду. Процедури підживлюваної культури включають додатковий крок або кроки підживлення серійної культури за допомогою поживних речовин й інших компонентів, які споживаються упродовж росту клітин. Постійна й не вирішена проблема, що стосується традиційних серійних й підживлюваних культур, полягає в утворенні відходів метаболізму, які чинять шкідливий вплив на ріст, життєздатність клітин і виробництво експресованих поліпептидів. Два продукти-відходи метаболізму, які чинять особливо шкідливий вплив - це лактат і амоній, що утворюються внаслідок метаболізму глюкози та глутаміну, відповідно. Крім ферментативного продукування амонію внаслідок метаболізму глутаміну, амоній також накопичується в клітинних культурах внаслідок неметаболічного розщеплення, що відбувається з часом. Даний винахід пропонує поліпшений спосіб великомасштабного виробництва поліпептидів, що мінімізує шкідливі ефекти амонію й лактата шляхом сповільнення і навіть нівелювання накопичення цих відходів у клітинних культурах. Звичайний спеціаліст в даній галузі визнає, що даний винахід може використовуватися в будь-якій системі, у якій культивуються клітини,

включаючи, крім інших, серійні, підживлювані й перфузійні системи. У певних оптимальних варіантах втілення даного винаходу, клітини вирощують в серійних або підживлюваних системах.

#### Середовища

Традиційні композиції середовищ, включаючи комерційно доступні середовища, такі як Хема F10 (Ham's F10, Sigma), середовище MEM (Minimal Essential Medium, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), і середовище Ігла в модифікації Дульбекко ([DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium], Sigma), містять в своєму складі відносно високі рівні глюкози й глютаміну в порівнянні з іншими амінокислотами. Ці компоненти, як вважалося, були потрібні в надлишку, оскільки вони є первинними метаболічними джерелами енергії для клітин. Однак, швидке споживання цих поживних речовин призводить до накопичення лактату й амонію, як описано вище. Додатково, високі початкові рівні глюкози й глютаміну, й подальше накопичення лактату й амонію зумовлюють високу осмолярність, стан, що сам по собі часто є шкідливим для росту, життєздатності клітин й виробництва поліпептидів.

Даний винахід пропонує різні композиції середовищ, які, при використанні відповідно до інших кроків культивування, описаних авторами, мінімізують і навіть нівелюють накопичення лактату та амонію. Композиції середовищ даного винаходу, які, як показано, чинять сприятливий вплив на ріст й/або життєздатність клітин або на експресію поліпептиду чи білка, включають одну або кілька з нижченаведених характеристик: i) сукупна кількість амінокислот на одиницю об'єму більша ніж приблизно 70мМ; ii) молярне співвідношення сукупної кількості глютаміну до сукупної кількості аспарагіну становить менше ніж приблизно 2; iii) молярне співвідношення сукупної кількості глютаміну до сукупної кількості амінокислот в цілому становить менше ніж приблизно 0,2; iv) молярне співвідношення сукупної кількості неорганічних іонів до сукупної кількості амінокислот в цілому становить приблизно від 0,4 до 1; або v) об'єднана сукупна кількість глютаміну й аспарагіну на одиницю об'єму становить більше ніж приблизно 16мМ. Звичайний спеціаліст у даній галузі зрозуміє, що термін "сукупний", який використовується вище, стосується сумарної кількості певного компоненту або компонентів, доданих упродовж клітинної культури, включаючи компоненти, що додаються на початку культури й компоненти, що додаються згодом. Звичайний спеціаліст у даній галузі зрозуміє, що композиції середовищ відповідно до даного винаходу охоплюють визначені й невизначені середовища.

Традиційні композиції середовищ починаються з відносно низького рівня сумарної кількості амінокислот у порівнянні з композиціями середовищ даного винаходу. Наприклад, загальний вміст амінокислот традиційного середовища для клітинної культури, відомого як DME-F12 (суміш 50:50 середовища Ігла в модифікації Дульбекко й середовища Хема F12) становить 7,29мМ, а загальний вміст амінокислот традиційного середовища для клітинної культури, відомого як RPMI-1640, становить 6,44мМ (Див. наприклад, H.J. Morton, *In Vitro*, 6:89-108 (1970), R.G. Ham, *Proc. Nat. Assoc. Sci.*

(USA), 53:288-293 (1965), G.E. Moore et al., *J. Am. Medical Assn.*, 199:519-24 (1967), вміст кожного з яких включений авторами шляхом посилання). У певних варіантах втілення даного винаходу, концентрація амінокислот в культуральних середовищах бажано є більшою ніж приблизно 70мМ. Ще більш бажано, композиції середовищ відповідно до даного винаходу містять концентрації амінокислот, більші ніж приблизно 70мМ у вихідних середовищах. Показано, що у випадку, коли концентрації амінокислот вихідних середовищ перебувають у цьому діапазоні, щільність клітин й титр збільшуються протягом періоду росту культури (див. Приклад 13).

Крім того, у певних варіантах втілення даного винаходу, молярне співвідношення глютаміну до аспарагіну в культуральних середовищах є зниженим у порівнянні з іншими комерційно й некомерційно доступними середовищами. Бажано, щоб молярне співвідношення глютаміну до аспарагіну в культуральних середовищах становило менше ніж приблизно два.

Крім того, у певних варіантах втілення даного винаходу, молярне співвідношення глютаміну до сумарної кількості амінокислот у культуральних середовищах є зниженим у порівнянні з іншими комерційно й некомерційно доступними середовищами. Бажано, щоб молярне співвідношення глютаміну до сумарної кількості амінокислот у культуральних середовищах становило менше ніж приблизно 0,2.

Цікавий і несподіваний результат зниження молярного співвідношення глютаміну до аспарагіну або до сумарної концентрації амінокислот у вихідних середовищах відповідно до даного винаходу полягав у тому, що на додаток до відзначеного зменшення в накопиченні амонію, також спостерігалось зменшення в накопиченні лактату. У певних варіантах втілення, накопичені рівні амонію й лактату не тільки нижчі ніж в контрольних культурах, але й дійсно фактично зменшуються після початкового накопичення (наприклад, див. Приклади 3 і 7).

Boraston (Патент США №5871999) описав культуральне середовище, у якому молярне співвідношення сумарної кількості неорганічних іонів до сумарної кількості амінокислот становить від 1 до 10. Boraston показав, що при забезпеченні культурального середовища, у якому молярне співвідношення сумарної кількості неорганічних іонів до сумарної кількості амінокислот перебуває в цьому діапазоні, агрегація клітин CHO, вирощених у середовищі, зменшується. В іншому оптимальному варіанті втілення даного винаходу, молярне співвідношення сумарної кількості неорганічних іонів до сумарної кількості амінокислот у культуральному середовищі зменшене навіть ще більше, до приблизно від 0,4 до 1. Як показано в Прикладі 13, зменшення цього співвідношення від 1,75 до приблизно 0,7 призводить до помітного збільшення щільності клітин й виробництва експресованого поліпептиду або білка упродовж періоду росту культури.

В іншому оптимальному варіанті втілення даного винаходу, культуральне середовище містить об'єднану концентрацію глютаміну і аспарагіну, що

становить приблизно від 16 до 36мМ. Як показано в Прикладі 14, Таблиці 22, у середовищ, які містять об'єднану сумарну концентрацію глутаміну та аспарагіну в межах цього діапазону, відзначаються вищі титри експресованого поліпептиду ніж у середовищ, які містять об'єднану сумарну кількість глутаміну і аспарагіну поза цим діапазоном. Звичайний спеціаліст в даній галузі матиме змогу обрати точну об'єднану концентрацію глутаміну і аспарагіну в межах цього діапазону з метою оптимізації росту й/або життєздатності клітин і збільшення до максимуму виробництва експресованого поліпептиду.

Крім того, звичайний спеціаліст в даній галузі визнає, що будь-яка із вище зазначених умов може використовуватися або окремо або в різних комбінаціях одна з одною. Використовуючи композиції середовищ, яким властива одна, кілька або всі вищезгадані характеристики, звичайний спеціаліст в даній галузі матиме змогу оптимізувати ріст й/або життєздатність клітин і збільшити до максимуму виробництво експресованого поліпептиду.

Кожна із цих композицій середовищ, розкритих в даному винаході, може, довільно, доповнюватися у міру необхідності гормонами й/або іншими факторами росту, певними іонами (такими, як натрій, хлорид, кальцій, магній і фосфат), буферами, вітамінами, нуклеозидами або нуклеотидами, мікроелементами (неорганічними сполуками, що зазвичай присутні у дуже низьких кінцевих концентраціях), амінокислотами, ліпідами, гідролізатами білка або глюкозою чи іншим джерелом енергії. У певних варіантах втілення даного винаходу поповнення середовищ хімічними індуктантами, такими як гексаметилен-біс(ацетамід) ("ГМБА") і натрію бутират ("NaB") може мати сприятливий ефект. Ці додаткові добавки можуть додаватися на початку культивування або можуть додаватися в більш пізній період часу з метою поповнення вичерпаних поживних речовин або з іншої причини. Звичайний спеціаліст в даній галузі знатиме будь-які бажані або необхідні добавки, які можуть бути включені в описані композиції середовищ.

Підготовка культури клітин ссавців

В даній галузі відомі різні способи підготовки клітин ссавців для виробництва білків або поліпептидів за допомогою серійної й підживлюваної культури. Як описано вище, нуклеїнова кислота, достатня для досягнення експресії (як правило вектор, що містить ген, який кодує поліпептид або білок, що розглядається, й будь-які оперативно зв'язані генетичні контрольні елементи) може бути введена в лінію клітин-хазяїнів за допомогою великої кількості добре відомих способів. Як правило, клітини підлягають скринінгу для визначення, які із клітин-хазяїнів фактично поглинули вектор і експресують полі пептид або білок, що розглядається. До традиційних способів виявлення певного поліпептиду або білка, що розглядається, експресованого клітинами ссавців належать, крім інших, імуногістохімія, імунопреципітація, проточна цитометрія, імунофлуоресцентна мікроскопія, SDS-PAGE, метод імуноблотингу (Western blot), метод виявлення за допомогою імобілізованого ферменту (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay), методи вискоефективної рідинної хроматографії

(ВЕРХ), тести на біологічну активність й афінна хроматографія. Звичайний спеціаліст в даній галузі знатиме інші відповідні способи для виявлення експресованих поліпептидів або білків. У разі, якщо полі пептид або білок, що розглядається, експресують різні клітини-хазяїни, можуть використовуватися кілька або всі перелічені способи для визначення, яка із клітин експресує цей поліпептид або білок на найвищих рівнях.

Як тільки клітину, що експресує поліпептид або білок, що розглядається, ідентифікували, клітину розмножують у культурі за допомогою будь-якого із широкого спектру способів, добре відомих звичайному спеціалісту в даній галузі. Клітину, яка експресує поліпептид або білок, що розглядається, як правило, розмножують шляхом вирощування її при температурі й у середовищі, що є сприятливим для виживання, росту й життєздатності клітини. Початковий об'єм культури може бути будь-яким, але часто меншим ніж об'єм культури виробничого біореактора, що використовується у кінцевому виробництві поліпептиду або білка, що розглядається, і часто клітини проходять кілька циклів у біореакторах зі збільшенням об'єму до посіву у виробничий біореактор. Клітинна культура може збівуватися або струшуватися з метою збільшення насичення середовища киснем й дисперсії поживних речовин до клітин. Альтернативно або додатково, для збільшення й контролю насичення культури киснем можуть використовуватися спеціальні барботуючі пристрої, які є відомими в даній галузі. Відповідно до даного винаходу, звичайний спеціаліст в даній галузі розумітиме, що може бути вигідним контролювати або регулювати певні внутрішні умови біореактора, включаючи, крім інших, рН, температуру, насичення киснем і т.д.

Початкова щільність клітин у виробничому біореакторі може обиратися звичайним спеціалістом в даній галузі. Відповідно до даного винаходу початкова щільність клітин у виробничому біореакторі може становити всього одну клітину на об'єм культури. В оптимальних варіантах втілення даного винаходу, початкові щільності клітин у виробничому біореакторі можуть коливатися від приблизно  $2 \times 10^2$  життєздатних клітин на мл до приблизно  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  або  $10 \times 10^6$  життєздатних клітин на мл і вище.

Початкові й проміжні клітинні культури можуть бути вирощені до будь-якої бажаної щільності перед посівом у наступний проміжний або кінцевий виробничий біореактор. Бажано, щоб більшість клітин залишалися живими до посіву, хоча не вимагається повна або майже повна життєздатність. В одному варіанті втілення даного винаходу, клітини можуть бути вилучені із супернатанта, наприклад, шляхом низькооборотного центрифугування. Може також бути бажаним промити вилучені клітини середовищем перед посівом у наступний біореактор з метою видалення будь-яких небажаних відходів метаболізму або компонентів середовища. Середовище може бути тим середовищем, у якому попередньо вирощувалися клітини, або може бути іншим середовищем чи промивним розчином, обраним практичним виконавцем даного винаходу.

Після цього клітини можуть бути розведені до відповідної щільності для посіву у виробничий біореактор. В оптимальному варіанті втілення даного винаходу, клітини розводять в тому ж самому середовищі, що буде використовуватися у виробничому біореакторі. Альтернативно, клітини можуть бути розведені в іншому середовищі або розчині, залежно від потреб і бажань практичного виконавця даного винаходу, або з метою пристосування до конкретних потреб безпосередньо клітин, наприклад, якщо вони повинні зберігатися упродовж короткого проміжку часу до посіву у виробничий біореактор.

#### Початкова фаза росту

Як тільки виробничий біореактор був засіяний в описаний вище спосіб, клітинну культуру підтримують в початковій фазі росту за умов, що сприяють виживанню, росту й життєздатності клітинної культури. Точні умови варіують залежно від типу клітин, організму, з якого клітина була отримана, і природи та характеру поліпептиду або білка, що експресується.

Відповідно до даного винаходу виробничий біореактор може бути будь-якого об'єму, що підходить для великомасштабного виробництва поліпептидів або білків. В оптимальному варіанті втілення об'єм виробничого біореактору становить принаймні 500 літрів. В інших оптимальних варіантах втілення об'єм виробничого біореактору становить 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 літрів або більше, чи має будь-який проміжний об'єм в цих межах. Звичайний спеціаліст в даній галузі знатиме й матиме змогу обрати підходящий біореактор для використання в практичному втіленні даного винаходу. Виробничий біореактор може бути сконструйований з будь-якого матеріалу, що є сприятливим для росту й життєздатності клітин, що не перешкоджає експресії або стабільності поліпептиду або білка, що експресується.

Температура клітинної культури в початковій фазі росту буде обиратися на підставі насамперед діапазону температур, при яких клітинна культура залишається життєздатною. Наприклад, протягом початкової фази росту, клітини CHO добре ростуть при 37°C. Зазвичай, більшість клітин ссавців добре ростуть в межах діапазону приблизно від 25°C до 42°C. Бажано, щоб клітини ссавців добре росли в межах діапазону приблизно від 35°C до 40°C. Звичайні спеціалісти в даній галузі матимуть змогу обрати відповідну температуру або температури для вирощування клітин, залежно від потреб клітин і виробничих вимог практичного виконавця.

В одному варіанті втілення даного винаходу температура початкової фази росту підтримується як єдина, постійна температура. В іншому варіанті втілення температура початкової фази росту підтримується в межах діапазону температур. Наприклад, протягом початкової фази росту температура може стійко збільшуватись або зменшуватись. Альтернативно, упродовж початкової фази росту температура може збільшуватись або зменшуватись дискретними кількостями в різні проміжки часу. Звичайний спеціаліст в даній галузі матиме змогу визначити доцільність застосування однієї або кількох температур і стійкого чи дискретного характеру зміни температури.

Протягом початкової фази росту клітини можуть вирощуватися упродовж довшого або коротшого проміжку часу, залежно від потреб практика й потреб безпосередньо клітин. В одному варіанті втілення клітини вирощують упродовж періоду часу, який є достатнім для досягнення щільності життєздатних клітин, що є встановленим відсотком від максимальної щільності життєздатних клітин, якої б клітини врешті-решт досягли, якщо б їм надали можливість рости без втручань. Наприклад, клітини можуть бути вирощені упродовж періоду часу, достатнього для досягнення бажаної щільності життєздатних клітин, що становить 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 99 відсотків від максимальної щільності життєздатних клітин.

В іншому варіанті втілення клітинам надають можливість рости упродовж певного проміжку часу. Наприклад, залежно від початкової концентрації клітинної культури, температури, при якій вирощуються клітини і властивого клітинам темпу росту, клітини можуть вирощуватися упродовж 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або більше днів. У деяких випадках, клітинам можна надати можливість рости протягом місяця або більше. Клітини б вирощувались упродовж 0 днів у виробничому біореакторі, якби їхній ріст у біореакторі для посіву, при температурі початкової фази росту, був достатній для того, щоб щільність життєздатних клітин у виробничому біореакторі під час його інокуляції уже була на рівні бажаного відсотка від максимальної щільності життєздатних клітин. Практичний виконавець даного винаходу матиме змогу обрати тривалість початкової фази росту залежно від вимог виробництва поліпептиду або білка й потреб безпосередньо клітин.

Клітинну культуру можна збовтувати або струшувати протягом початкової фази культивування з метою збільшення насичення киснем й дисперсії поживних речовин до клітин. Відповідно до даного винаходу звичайний спеціаліст в даній галузі розумітиме, що може бути вигідним контролювати або регулювати певні внутрішні умови біореактора протягом початкової фази росту, включаючи, крім інших, pH, температуру, насичення киснем і т.д. Наприклад, pH можна контролювати шляхом додавання відповідної кількості кислоти або основи, а насичення киснем можна контролювати за допомогою барботуючих пристроїв, які є відомими в даній галузі.

#### Заміна умов культивування

Відповідно до тактики даного винаходу, наприкінці початкової фази росту може бути замінена принаймні одна з умов культивування для того, щоб застосувати другий набір умов культивування, і відбувся метаболічний зсув у культурі. Накопичення інгібіторних метаболітів, особливо лактату й амонію, інгібує ріст. Метаболічний зсув, що досягається шляхом, наприклад, зміни в температурі, pH, осмоляльності або рівня хімічного індуктанта клітинної культури, може характеризуватися зниженням співвідношення певної швидкості продукування лактату до певної швидкості споживання глюкози. В одному необмежувачому варіанті втілення умови культивування заміняють шляхом

заміни температури культивування. Однак, як відомо у даній галузі, заміна температури не є єдиним механізмом, через який можна досягнути відповідного метаболічного зсуву. Наприклад, такий метаболічний зсув може також бути досягнутий шляхом заміни інших умов культивування, включаючи, крім інших, pH, осмоляльність і рівні натрію бутирату. Як обговорювалося вище, вибір часу заміни культури буде визначатися практичним виконавцем даного винаходу, базуючись на вимогах виробництва поліпептиду або білка чи потребах безпосередньо клітин.

При заміні температури культивування температурна заміна може бути відносно поступовою. Наприклад, здійснення зміни температури може займати кілька годин або днів. Альтернативно, температурна заміна може бути відносно різкою. Наприклад, зміна температури може завершитися через менше ніж кілька годин. З огляду на відповідне виробництво й контрольне устаткування, таке як застосовується в якості стандартного в комерційному великомасштабному виробництві поліпептидів або білків, зміна температури може звершитися навіть упродовж менш ніж години.

Температура клітинної культури в наступній фазі росту буде обиратися на підставі насамперед діапазону температур, при яких клітинна культура залишається життєздатною й експресує рекомбінантні поліпептиди або білки на комерційно прийнятних рівнях. Зазвичай, більшість клітин ссавців залишаються життєздатними й експресують рекомбінантні поліпептиди або білки на комерційно прийнятних рівнях в межах діапазону приблизно від 25°C до 42°C. Бажано, щоб клітини ссавців залишалися життєздатними й експресували рекомбінантні поліпептиди або білки на комерційно прийнятних рівнях в межах діапазону приблизно від 25°C до 35°C. Звичайні спеціалісти в даній галузі матимуть змогу обрати відповідну температуру, або температуру для вирощування клітин, залежно від потреб клітин і виробничих вимог практичного виконавця.

В одному варіанті втілення даного винаходу температура наступної фази росту підтримується як єдина, постійна температура. В іншому варіанті втілення температура наступної фази росту підтримується в межах діапазону температур. Наприклад, протягом наступної фази росту температура може стійко збільшуватись або зменшуватись. Альтернативно, упродовж наступної фази росту температура може збільшуватись або зменшуватись дискретними кількостями в різні проміжки часу. Звичайний спеціаліст в даній галузі розумітиме, що багаторазові дискретні заміни температур охоплюються в даному варіанті втілення. Наприклад, температура може бути замінена один раз, клітини підтримуються при цій температурі або температурному діапазоні упродовж певного проміжку часу, після якого температура може бути замінена знову - на вищу або нижчу температуру. Температура культури після кожної дискретної заміни може бути постійною або може підтримуватися в межах певного діапазону температур.

У Прикладі 16 показані дані, що демонструють ефективність використання двох послідовних змін температур, хоча для звичайних спеціалістів в

даній галузі буде зрозуміло, що відповідно до даного винаходу, можуть використовуватися три або більше послідовних змін температур з метою збільшення життєздатності чи щільності клітин і/або збільшення експресії рекомбінантних поліпептидів або білків. Температура або температурні діапазони клітинної культури після кожної послідовної зміни температури можуть бути вищими або нижчими ніж температура(и) або температурний діапазон(и) перед заміною. В оптимальному варіанті втілення даного винаходу, кожна послідовна температура або температурний діапазон є нижчими ніж попередня температура або температурний діапазон.

Наступна фаза виробництва

Відповідно до даного винаходу, як тільки умови клітинної культивування були замінені як обговорювалося вище, клітинну культуру підтримують упродовж наступної фази виробництва при другому наборі умов культивування, що сприяють виживанню й життєздатності клітинної культури й підходять для експресії бажаного поліпептиду або білка на комерційно прийнятних рівнях.

Як обговорювалося вище, культивування може бути замінено шляхом заміни однієї або кількох з низки умов культивування, включаючи, крім інших, температуру, pH, осмоляльність і рівні натрію бутирату. В одному варіанті втілення замінюється температура культивування. Відповідно до цього варіанту втілення упродовж наступної фази виробництва, культуру підтримують при температурі або температурному діапазоні, що є нижчим ніж температура або температурний діапазон початкової фази росту. Наприклад, протягом наступної фази виробництва, клітини СНО добре експресують рекомбінантні поліпептиди й білки в межах діапазону від 25°C до 35°C. Як обговорювалося вище, можуть використовуватися багаторазові дискретні зміни температури з метою збільшення щільності або життєздатності клітин чи збільшення експресії рекомбінантного поліпептиду або білка.

Відповідно до даного винаходу, клітини можуть підтримуватися в наступній фазі виробництва до досягнення бажаної щільності клітини або титру виробництва. В одному варіанті втілення клітини підтримують в наступній фазі виробництва до досягнення максимального титру до рекомбінантного поліпептиду або білка. В інших варіантах втілення культура може бути зібрана до цього часу, залежно від виробничих вимог практичного виконавця або потреб безпосередньо клітин. Наприклад, клітини можуть підтримуватися упродовж періоду часу, достатнього для досягнення щільності життєздатних клітин, що становить 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 99 відсотків від максимальної щільності життєздатних клітин. У деяких випадках, може бути бажаним надати можливість щільності життєздатних клітин досягати максимуму, а потім надати можливість щільності життєздатних клітин зменшитися до деякого рівня перед збором урожаю культури. У надзвичайному прикладі, може бути бажаним надати можливість щільності життєздатних клітин наблизитися або досягти нуля перед збором урожаю культури.

В іншому варіанті втілення даного винаходу, клітинам надають можливість рости упродовж певного проміжку часу протягом наступної фази виробництва. Наприклад, залежно від концентрації клітинної культури на початку наступної фази росту, температури, при якій вирощуються клітини і властивого клітинам темпу росту, клітини можуть вирощуватися упродовж 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або більше днів. У деяких випадках, клітинам можна надати можливість рости протягом місяця або більше. Практичний виконавець даного винаходу матиме змогу обрати тривалість наступної фази виробництва залежно від вимог виробництва поліпептиду або білка й потреб безпосередньо клітин.

У певних випадках, може бути вигідно або необхідно постачати клітинну культуру протягом наступної фази виробництва поживними речовинами або іншими компонентами середовища, які були вичерпані або метаболізовані клітинами. Наприклад, могло б бути вигідним постачати клітинну культуру поживними речовинами або іншими компонентами середовища, які, як виявилось під час моніторингу клітинної культури, були вичерпані (див. розділ 'Моніторинг умов культивування' нижче). Альтернативно або додатково, може бути вигідно або необхідно підживлювати клітинну культуру перед наступною фазою виробництва. У якості прикладів, крім іншого, може бути вигідно або необхідно постачати клітинну культуру гормонами й/або іншими факторами росту, певними іонами (такими як натрію, хлориду, кальцію, магнію і фосфату), буферами, вітамінами, нуклеозидами або нуклеотидами, мікроелементами (неорганічними сполуками, що зазвичай присутні у дуже низьких кінцевих концентраціях), амінокислотами, ліпідами або глюкозою чи іншим джерелом енергії.

Ці додаткові компоненти можуть всі додаватися до клітинної культури одночасно, або їх можна постачати клітинній культурі в серії додавань. В одному варіанті втілення даного винаходу додаткові компоненти постачаються клітинній культурі в різні проміжки часу в пропорційних кількостях. В іншому варіанті втілення може бути бажано надати тільки певну кількість додаткових компонентів спочатку, і постачати компоненти, що залишаються, пізніше. У ще одному варіанті втілення даного винаходу, клітинна культура постійно підживлюється цими додатковими компонентами.

Відповідно до даного винаходу, повний об'єм, що додається до клітинної культури повинен, оптимально, підтримуватися на мінімальному рівні. Наприклад, повний об'єм середовища або розчину, що містить додаткові компоненти, які додаються до клітинної культури може становити 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50% об'єму клітинної культури до постачання додаткових компонентів.

Клітинну культуру можна збовтувати або струшувати протягом наступної фази виробництва з метою збільшення насичення киснем й дисперсії поживних речовин до клітин. Відповідно до даного винаходу звичайний спеціаліст в даній галузі розумітиме, що може бути вигідним контролювати або регулювати певні внутрішні умови біореактора протягом наступної фази росту, включаючи, крім

інших, рН, температуру, насичення киснем і т.д. Наприклад, рН можна контролювати шляхом додавання відповідної кількості кислоти або основи, а насичення киснем можна контролювати за допомогою барботуючих пристроїв, які є відомими в даній галузі.

#### Контроль умов культивування

У певних варіантах втілення даного винаходу практик може виявити, що вигідно або необхідно проводити періодичний моніторинг певних умов вирощування клітинної культури. Моніторинг умов культивування клітин дозволяє практикові визначати, чи продукує клітинна культура рекомбінантний поліпептид або білок на субоптимальних рівнях або, чи збирається культура входити в субоптимальну фазу продукування. Щоб проводити моніторинг певних умов культивування клітин, буде необхідно відбирати невеликі аліквоти культури для аналізу. Звичайний спеціаліст в даній галузі розумітиме, що існує потенційна можливість, що такий відбір може бути джерелом контамінації клітинної культури, і вживатиме відповідних заходів з метою мінімізації ризику такої контамінації.

У якості прикладів, крім іншого, може бути вигідно або необхідно проводити моніторинг температури, рН, щільності клітин, життєздатності клітин, інтегрованої щільності життєздатних клітин, рівнів лактату, рівнів амонію, осмолярності або титру поліпептиду або білка, що експресується. В даній галузі відомі численні способи, що дозволять звичайному спеціалісту в даній галузі визначати ці умови. Наприклад, щільність клітини може вимірюватися за допомогою гематиметра, лічильника Coulter або дослідження щільності клітин (CEDEX). Щільність життєздатних клітин може бути визначена шляхом фарбування зразка культури трипаном синім. Оскільки тільки мертві клітини поглинають трипан синій, щільність життєздатних клітин може бути визначена шляхом підрахунку загальної кількості клітин, поділу кількості клітин, які поглинули барвник на загальну кількість клітин і взяття зворотного дробу. Для визначення рівнів лактату, амонію або експресованого поліпептиду чи білка може використовуватися ВЕРХ. Альтернативно, рівень експресованого поліпептиду або білка може бути визначений за допомогою стандартних методів молекулярної біології, таких як фарбування coomassie reib SDS-PAGE, метод імуноблотингу (Western blotting), тест Бредфорда, тест Лоурі, тест Бюрета і УФ адсорбція. Може також бути вигідно або необхідно проводити моніторинг посттрансляційних модифікацій експресованого поліпептиду або білка, включаючи фосфорилування й глікозилювання.

#### Виділення експресованого поліпептиду

Зазвичай, як правило, буде бажано виділяти й/або очищувати білки або поліпептиди, що експресуються відповідно до даного винаходу. В оптимальному варіанті втілення, експресований поліпептид або білок секретується у середовище, і, таким чином, наприклад, шляхом центрифугування або фільтрування, можуть бути вилучені клітини й інші тверді частки, як перший крок у процесі очищення. Цей варіант втілення особливо корисний при використанні відповідно до даного вина-

ходу, тому що способи й композиції, описані авто-рами, призводять до збільшення життєздатності клітин. Внаслідок цього, менше клітин вмирає протягом процесу культивування, і у середовище вивільняється менше протеолітичних ферментів, що потенційно можуть зменшувати вихід експресованого поліпептиду або білка.

Альтернативно, експресований поліпептид або білок зв'язується із поверхнею клітини-хазяїна. У цьому варіанті втілення, середовище видаляється, а клітини-хазяїни, що експресують поліпептид або білок, розщеплюються як перший крок у процесі очищення. Лізис ссавцевих клітин-хазяїнів можна досягти за допомогою низки засобів, добре відомих звичайним спеціалістам в даній галузі, включаючи фізичне руйнування скляними кільцями і дію високих рН.

Поліпептид або білок можуть бути виділені й очищені стандартними способами, включаючи, крім інших, хроматографію (наприклад, іоннообмінну, афінну, ексклюзійну і гідроксипатитну хроматографію), гель-фільтрацію, центрифугування або різницю в розчинності, осадження етанолом, або за допомогою будь-яких інших наявних способів для очищення білків (Див., наприклад, Scopes, Protein Purification Principles and Practice 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S.J. and Hames, B.D. (eds.), Protein Expression : A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; and Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol 182), Academic Press, 1997, зміст всіх з них включений авторами шляхом посилання). Для імуноафінної хроматографії, зокрема, білок може бути виділений шляхом зв'язування його з афінною колонкою, що містить антитіла, які були утворені проти цього білка й прикріплені до стаціонарної фази. Альтернативно, таги афінності, такі як послідовність оболонки вірусу грипу, полігістидин або глутатіон-S-трансфераза можуть бути приєднані до білка за допомогою стандартних рекомбінантних способів, щоб надати можливість для легкого очищення пропусканням через відповідну афінну колонку. Інгібітори протеази, такі як фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ), лейпептин, пепстатин або апротинін можуть додаватися на будь-яких або на всіх стадіях з метою зменшення або нівелювання деградації поліпептиду або білка упродовж процесу очищення. Особливо бажано застосовувати інгібітори протеази, коли необхідно розщепити клітини для виділення й очищення експресованого поліпептиду або білка. Звичайний спеціаліст в даній галузі оцінить, що точна техніка очищення буде варіювати залежно від природи поліпептиду або білка, що підлягає очистці, природи клітин, із яких експресується поліпептид або білок, і складу середовища, у якому були вирощені клітини.

#### Фармацевтичні композиції

В певних оптимальних варіантах втілення винаходу, вироблені поліпептиди або білки будуть мати фармакологічну активність і будуть корисними для приготування фармацевтичних препаратів. Сполуки відповідно до винаходу, що описані вище, можна вводити суб'єктові або можна спочатку приготувати у лікарській формі для доставлення будь-

яким доступним шляхом, включаючи, крім інших, парентеральний (наприклад, внутрішньовенний), внутрішньошкірний, підшкірний, пероральний, назальний, бронхіальний, офтальмічний, трансдермальний (місцевий), трансмукозальний, ректальний і вагінальний шляхи. Фармацевтичні композиції відповідно до винаходу, як правило, включають очищений поліпептид або білок, експресований із клітинної лінії ссавців, агент для доставлення (тобто, катіонний полімер, пептидний молекулярний транспортер, поверхнево-активна речовина, і т.д., як описано вище) у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм. Вжитий авто-рами термін "фармацевтично прийнятний носій" включає розчинники, дисперсійні середовища, покриття, протибактеріальні та протигрибкові засоби, ізотонічні агенти і засоби для затримки всмоктування, і т.п., сумісні з фармацевтичним введенням. В композиції можуть також бути включені додаткові активні сполуки.

Фармацевтичну композицію готують у вигляді лікарської форми таким чином, щоб вона була сумісною з наміченим шляхом введення. Розчини або суспензії, що використовуються для парентерального, внутрішньошкірного або підшкірного застосування можуть включати нижченаведені компоненти: стерильний розчинник, такий як вода для ін'єкцій, фізіологічний розчин, фіксовані олії, поліетиленгліколі, гліцерин, пропіленгліколь або інші синтетичні розчинники; протибактеріальні засоби, такі як бензиловий спирт або метилпарабени; антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота або натрію дисульфід; хелатуючі агенти, такі як етилендіамінтетраоцтова кислота; буфери, такі як ацетати, цитрати або фосфати і засоби для коригування тонічності, такі як натрію хлорид або декстроза. рН може бути відкоригований за допомогою кислот або основ, таких як натрію гідроксид або хлористоводнева кислота. Препарати для парентерального застосування можуть бути розфасовані в ампули, одноразові шприци або флакони з кількома дозами, виготовлені зі скла або пластмаси.

До фармацевтичних композицій, що підходять для ін'єкційного використання, як правило, належать стерильні водні розчини (у випадку водорозчинних речовин) або дисперсії й стерильні порошки для екстемпорального приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій. У випадку внутрішньовенного введення прийнятні носії включають фізіологічний розчин, бактеріостатичну воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) або фосфатний буферний розчин (PBS). У всіх випадках, композиція повинна бути стерильною і повинна бути рідкою до того ступеня, щоб легко вводилася шприцем. Оптимальні фармацевтичні композиції є стабільними за умов виготовлення й зберігання й повинні оберігатися від контамінації мікроорганізмами, такими як бактерії та гриби. Зазвичай, відповідний носій може бути розчинником або дисперсійним середовищем, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь, і т.п.) та їх прийнятними сумішами. Належна текучість може підтримуватися, наприклад, за допомогою покриття, такого як лецитин, шляхом підтри-



мування необхідного розміру часток у випадку дисперсії й шляхом використання поверхнево-активних речовин. Запобігання контамінації мікроорганізмами можна досягнути за допомогою різних протибактеріальних й протигрибкових засобів, наприклад, парабенів, хлорбутанолу, фенолу, аскорбінової кислоти, тимерозалу, і т.п. У багатьох випадках, буде бажаним включити в композицію ізотонічні агенти, наприклад, цукор, багатоатомні спирти, такі як манітол, сорбітол або натрію хлорид. Пролонгованої адсорбції ін'єкційних композицій можна досягти шляхом включенням до її складу агента, що затримує всмоктування, наприклад, алюмінію моностеарату і желатину.

Стерильні ін'єкційні розчини можуть готуватися шляхом введення очищеного поліпептиду або білка у необхідній кількості у відповідний розчинник з одним або комбінацією перелічених вище компонентів, у разі потреби, після чого проводиться фільтрована стерилізація. Зазвичай, дисперсії готують шляхом введення очищеного поліпептиду або білка, що експресується із клітинної лінії ссавців, в стерильний носій, що містить основне дисперсійне середовище й інші необхідні компоненти із перелічених вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів до оптимальних способів приготування належать вакуумне висушування й сушіння сублімацією, що дає можливість отримати порошок активного компонента плюс будь-який додатковий бажаний компонент із попередньо стерильно-відфільтрованого розчину.

Пероральні композиції, зазвичай, включають інертний розчинник або харчовий носій. Для перорального терапевтичного введення очищений поліпептид або білок можуть бути поєднані з допоміжними речовинами й використовуватися у вигляді таблеток, драже або капсул, наприклад, желатинових капсул. Пероральні композиції можуть також бути приготовані з використанням рідкого носія для застосування у вигляді рідини для полоскання рота. У якості складової частини композиції можуть бути включені фармацевтично сумісні агенти зв'язування і/або допоміжні матеріали. Таблетки, пігулки, капсули, драже й т.п. можуть містити будь-який з нижченаведених компонентів або сполук подібної природи: зв'язуючий засіб, такий як мікрокристалічна целюлоза, трагакантова камідь або желатин; наповнювач, такий як крохмаль або лактоза, дезінтегруючий агент, такий як альгінова кислота, Примогель (Primogel) або зерновий крохмаль; лібрикант, такий як магнію стеарат або Sterotes; глідант, такий як колоїдний кремнію діоксид; підсолоджувач, такий як сахароза або сахарин; або ароматизатор, такий як м'ята, метилсаліцилат або помаранчевий ароматизатор. У композиціях для перорального введення можуть вигідно застосовуватись засоби для поліпшення стабільності усередині шлунково-кишкового тракту й/або збільшення всмоктування.

Для введення шляхом інгаляції композиції відповідно до винаходу, що містять очищений поліпептид або білок, експресований із клітинної лінії ссавців й агента для доставлення, в оптимальному варіанті доставляються у вигляді аерозолі з упаковок під тиском або розпилювача, з застосуван-

ням прийняттого витискувача, наприклад, газу, такого як вуглекислий газ, або розпилювача. Даний винахід, зокрема, охоплює доставлення сполук, використовуючи назальний спрей, інгалятор або інше пряме доставлення до верхніх й/або нижніх дихальних шляхів. Внутрішньоназальне введення ДНК вакцин, спрямованих проти вірусів грипу, як було показано, індукує відповіді CD8 Т клітин, що вказує на те, що принаймні деякі клітини в дихальних шляхах можуть поглинати ДНК при доставленні цим шляхом, і агенти для доставлення відповідно до винаходу збільшать клітинне поглинання. Відповідно до певних варіантів втілення винаходу композиції, що містять очищений поліпептид, експресований із клітинної лінії ссавців й агент для доставлення, готуються у вигляді великих пористих часток для аерозольного введення.

Системне введення може також здійснюватися трансмукозальним або трансдермальним шляхом. Для трансмукозального або трансдермального введення у композиції використовуються проникаючі засоби у відповідності із бар'єром, через який необхідно проникнути. Такі проникаючі засоби є загальновідомими в даній галузі, і включають, наприклад, для трансмукозального введення, детергенти, жовчні солі і похідні фусидової кислоти. Трансмукозального введення можна досягнути за допомогою назальних спреїв або супозиторіїв. Для трансдермального введення, очищений поліпептид або білок і агенти для доставлення готують у вигляді мазей, бальзамів, гелей або кремів, які є загальновідомими в даній галузі.

Композиції можуть також бути приготовані у формі супозиторіїв (наприклад, зі звичайними основами для супозиторіїв, такими як какаомасто й інші гліцериди) або утримуючих клізм для ректального застосування.

В одному варіанті втілення композиції готують з носіями, які захистять поліпептид або білок від швидкого виведення з організму, такі як лікарські форми з контрольованим вивільненням, включаючи імпланти й мікроінкапсульовані системи для доставлення. Можуть використовуватися біологічно сумісні полімери, що розкладаються мікроорганізмами, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоестери і полімолочна кислота. Способи для підготовки таких лікарських форм будуть очевидні для спеціаліста, кваліфікованого в даній галузі. Матеріали можуть також бути отримані комерційно від Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Ліпосомальні суспензії (включаючи ліпосоми, спрямовані на інфіковані клітини з моноклональними антитілами до вірусних антигенів) можуть також використовуватися у якості фармацевтично прийнятних носіїв. Вони можуть бути приготовлені відповідно до способів, відомих спеціалістам, кваліфікованим у даній галузі, наприклад, як описано в Патенті США №4522811.

Вигідно готувати пероральні або парентеральні композиції у формі одиниці дозування для простоти введення й однорідності дозування. Термін «форма одиниці дозування», вжитий авторами, стосується фізично дискретних одиниць, які відповідають одиничним дозуванням для суб'єкта, що підлягає лікуванню; кожна одиниця, що містить

попередньо визначену кількість активного поліпептиду або білка в кількості, з розрахунку для досягнення бажаного терапевтичного ефекту у комбінації з необхідним фармацевтичним носієм.

Поліпептид або білок, експресований відповідно до даного винаходу можна вводити в різні інтервали і упродовж різних проміжків часу, як потрібно, наприклад, один раз на тиждень упродовж приблизно від 1 до 10 тижнів, від 2 до 8 тижнів, приблизно від 3 до 7 тижнів, приблизно 4, 5, або 6 тижнів, і т.д. Кваліфікований спеціаліст оцінить, що певні фактори можуть впливати на дозування й вибір часу, що необхідні для ефективного лікування суб'єкта, включаючи, крім інших, ступінь тяжкості хвороби або розладу, попереднє лікування, загальний стан здоров'я й/або вік суб'єкта та інші наявні хвороби. Зазвичай, лікування суб'єкта за допомогою поліпептиду або білку, як описано авторами, може включати окреме лікування або, у багатьох випадках, може включати низку схем лікування. Крім того зрозуміло, що відповідні дози можуть залежати від сили дії поліпептиду або білка й можуть бути довільно пристосовані до конкретного реципієнта, наприклад, шляхом введення доз, що збільшуються, до досягнення попередньо встановленої бажаної відповіді. Вважається, що певний рівень дози для будь-якого конкретного тваринного суб'єкта може залежати від різних факторів, включаючи активність певного поліпептиду або білка, що застосовується, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать і раціон харчування суб'єкта, час введення, шлях введення, швидкість екскреції, будь-яку комбінацію препаратів і ступінь експресії або активності, що буде змодульована.

Даний винахід включає використання композицій відповідно до винаходу для лікування не-свійських тварин. Відповідно, дози й способи введення можуть бути відібрані відповідно до відомих принципів ветеринарної фармакології й медицини. Керівні принципи можна знайти, наприклад, в Adams, R. (ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8<sup>th</sup> edition, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001.

Фармацевтичні композиції відповідно до винаходу можуть бути включені в контейнер, пакування або розподіляючий пристрій разом з інструкціями для застосування.

Представлений вище опис є пояснювальним і жодним чином не обмежує обсяг винаходу. Альтер-

нативні методи й матеріали для втілення винаходу, а також додаткові заявки будуть очевидними до спеціаліста в даній галузі, і призначені для включення у межах супровідної формули винаходу.

#### Приклади

Приклад 1: Удосконалене середовище 1 для підживлюваного процесу анти-GDF-8

Традиційні підживлювані процеси для культивування клітинних ліній мають кілька недоліків, включаючи час і зусилля, необхідні для введення підживлень і потребу в спеціальному устаткуванні у великомасштабних біореакторах. Мета полягала у розробці серійних середовищ для виробництва білків, що розглядаються, у великомасштабних біореакторах, що потребує мінімального підживлення.

#### Матеріали й методи

Штами й середовища: клітини яєчника китайського хом'яка ("CHO"), були модифіковані генною інженерією для експресії моноклонального антитіла проти фактора росту й диференціювання 8 ("анти-GDF-8 клітини") (див. Veldman et al., *Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Therefor*, US20040142382 A1). Клітини анти-GDF-8 використовувалися для випробування нових серійних середовищ. Середовище 1 і Середовище 2 порівнювали на їхні здатності підтримувати високу щільність й життєздатність клітин. Композиції цих середовищ, а також Середовища 3 перелічені в Таблиці 1. Середовища готують шляхом додавання всіх компонентів, за винятком  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Після цього середовища доводять до pH 7.25, фіксують осмолярність і після цього додають  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Умови культивування: Для експериментів в колбах, клітини анти-GDF-8 вирощували у колбах струшування й пропускали три рази. Для експериментів в біореакторі клітини анти-GDF-8 вирощували упродовж 12 днів, щодня постачали 2% за об'ємом 20X середовища для підживлення Середовища 4 (Таблиця 3) або 3% за об'ємом 16X Середовища 4 (Таблиця 4) після дня 5. Протягом перших 4 днів клітини вирощували при 37°C. На день 5 температуру замінили на 31°C.

Аналіз зразків: Щоденні зразки відбирали із культур і аналізували на рівні амінокислот, вітамінів, заліза, фосфату, глюкози й глутаміну.

Таблиця 1. Склад Середовища 1, Середовища 2 і Середовища 3.

	Середовище 1		Середовище 2		Середовище 3	
<b>Амінокислоти</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>
аланін	96.03	1.08	17.80	0.20	24.87	0.28
аргінін	1186.99	6.82	347.97	2.00	423.43	2.43
аспарагін · H <sub>2</sub> O	713.59	4.76	75.00	0.50	173.90	1.16
аспарагінова кислота	318.53	2.39	26.20	0.20	52.72	0.40
цистеїн · HCl · H <sub>2</sub> O	70.01	0.40	70.19	0.40	70.01	0.40
цистин · 2HCl	297.09	0.95	62.25	0.20	62.09	0.20
глутамінова кислота	158.59	1.08	29.40	0.20	41.08	0.28
глутамін	1892.40	12.96	1163.95	7.97	1162.40	7.96
гліцин	95.88	1.28	30.00	0.40	35.92	0.48
гістидин · HCl · H <sub>2</sub> O	369.10	1.76	46.00	0.22	75.27	0.36
ізолейцин	623.63	4.76	104.99	0.80	151.90	1.16
лейцин	852.31	6.51	104.99	0.80	172.69	1.32
лізин · HCl	945.96	5.20	145.99	0.80	218.38	1.20
метіонін	291.82	1.96	29.80	0.20	53.55	0.36
фенілаланін	428.62	2.60	65.99	0.40	98.81	0.60
пролін	372.25	3.24	68.99	0.60	96.40	0.84
серин	904.71	8.62	126.00	1.20	273.07	2.60
треонін	513.39	4.31	94.99	0.80	132.81	1.12
триптофан	159.32	0.78	16.00	0.08	28.99	0.14
Тирозин · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	560.81	2.15	103.79	0.40	145.10	0.56
валін	505.36	4.32	93.99	0.80	131.17	1.12
<b>Вітаміни</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>
біотин	2.00	8.21	0.20	0.82	0.36	1.49
кальцію пантотенат	22.02	46.27	2.24	4.71	4.03	8.47
холінхлорид	87.67	630.74	8.98	64.60	16.11	115.92
фолієва кислота	25.95	58.84	2.65	6.01	4.76	10.80
інозит	123.39	685.47	12.60	69.99	22.64	125.79

нікотинамід	19.60	160.70	2.02	16.56	3.61	29.62
піродиксаль·HCl	1.99	9.83	2.00	9.85	1.99	9.83
піридоксин·HCl	18.06	87.67	0.03	0.15	1.67	8.10
рибофлавін	2.20	5.85	0.22	0.59	0.40	1.06
тіамін·HCl	21.51	63.84	2.17	6.44	3.92	11.64
вітамін B12	6.93	5.12	0.78	0.58	1.34	0.99
<b>Неорганічні солі</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>
CaCl <sub>2</sub>	115.78	1.04	116.09	1.05	115.78	1.04
KCl	310.94	4.17	311.77	4.18	310.94	4.17
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70.81	0.50	70.99	0.50	70.81	0.50
NaCl	1104.96	18.92	5539.00	94.85	3704.96	63.44
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	636.33	4.61	62.49	0.45	114.33	0.83
MgSO <sub>4</sub>	48.70	0.41	48.83	0.41	48.70	0.41
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.03	95.00			8.60	95.00
MgCl <sub>2</sub>	28.53	0.30	28.61	0.30	28.53	0.30
NaHCO <sub>3</sub>	2000.00	23.81	2440.00	29.04	2440.00	29.04
<b>Мікроелементи</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нМ</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нМ</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нМ</b>
Натрію селеніт	28.00	161.94	5.00	28.92	7.00	40.49
Fe (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	49.86	123.42	50.00	123.75	49.86	123.42
CuSO <sub>4</sub>	2.69	16.80	0.80	5.00	0.97	6.06
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	11.24	45.00			7.49	30.00
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2503.85	9006.64	839.96	3021.45	1542.85	5549.81
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2734.77	9528.82	429.96	1498.12	1383.80	4821.59
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.26	1.51			0.17	1.01
Na <sub>2</sub> Si <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	210.00	739.27			140.00	492.84
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.86	1.50			1.24	1.00
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0.98	8.33			0.65	5.56
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.20	0.74			0.13	0.49
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.18	0.80			0.12	0.53
<b>Інші компоненти</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>
Гідрокортизон	0.23	0.64	0.04	0.10	0.09	0.24
Путресцин·2HCl	6.48	40.22	1.08	6.70	2.48	15.39
лінолева кислота	0.22	0.80	0.04	0.14	0.06	0.20
тіоктова кислота	0.56	2.73	0.10	0.49	0.14	0.69
D-глюкоза (декстроза)	16039.43	89107.92	6150.72	34170.64	11042.24	61345.76
ПВА	2560.00		2400.00		2520.00	
Інсулін	54.00		10.00		14.00	
Натрію піруват	54.85	498.63	55.00	499.95	54.85	498.63

### Результати й висновки

Фігура 1 показує, що темп росту клітин айгра-GDF-8 був подібний і в Середовищі 1, і в Середовищі 2 в експериментах у колбах.

Фігура 2 показує, що в біореакторах, Середовище 1 показало істотне збільшення кінцевої щільності й життєздатності клітин у порівнянні з Середовищем 3. Кінцевий титр також значно збільшився, від 551мг/л для платформного процесу до 976мг/л із Середовищем 1 (дані не показані). Температура була замінена із 37°C на 31°C у день 5. Через несподіваний високий ріст клітин, культури підживлювали щодня після дня 5 або за допомогою 2% за об'ємом 20X Середовища 4 або за допомогою 3% за об'ємом 16X Середовища 4. Таким чином, це не справжній серійний експеримент, як спочатку планувалося. Аспарагін і тіамін додавались в середовища для підживлення, починаючи з дня 10.

При розробці концентрованих серійних середовищ потрібно розглянути кілька можливих проблем. По-перше, концентровані поживні речовини могли б виявитися токсичними для клітин. У середовищах, розроблених у цьому Прикладі, всі поживні речовини й компоненти, як визначено, були нижче меж токсичності (дані не показані).

По-друге, концентровані серійні середовища обов'язково мають більш високу осмолярність ніж неконцентровані середовища, що як показано, чинить шкідливий вплив на ріст й життєздатність клітин. Цю проблему можна усунути шляхом зниження кількості NaCl у початкових середовищах. Крім того, концентровані серійні середовища міс-

тять недостатні рівні глюкози для підтримки росту упродовж усього періоду культивування. Таким чином, культури постачали щодня після дня 5 підживленням у вигляді глюкози.

По-третє, інсулін і глутамін сприйнятливі до деградації протягом 12-денного періоду культивування. Таким чином, культура постачалась цими компонентами на додаток до глюкози.

Нарешті, залізо осаджується із розчину, що містить високі концентрації фосфату при високому рН. Цю проблему можна усунути шляхом додавання заліза наприкінці процесу приготування середовища, після коригування рН до відповідного рівня.

Приклад 2: Розробка концентрованого середовища для підживлення (Середовища 5) для клітин анти-GDF-8 у підживлюваному процесі.

У Прикладі 1 був розроблений серійний процес для культивування клітин анти-GDF-8 з використанням Середовища 1. Через високу щільність клітин, що спостерігалася протягом процесу, було визначено, що постачання поживними речовинами на додаток до глюкози й глутаміну, все ще є вигідним. Однак, підживлення серії за допомогою 8X середовища для підживлення Середовища 4 призвело б до надмірного розведення культури. Щоб обійти цю проблему, були розроблені більше концентровані середовища для підживлення.

Матеріали й методи та результати

В Таблиці 2 зазначається склад Середовища 4A-1, Середовища 4B, Мікроелементи В і Мікроелементи D, що використовуються у композиціях Таблиць 3-7.

Таблиця 2. Склад Середовища 4A-1, Середовища 4B, Мікроелементи В і Мікроелементи D, що використовуються у композиціях Таблиць 3-7.

	Середовище 4 A-1		Середовище 4B		Мікроелемент и В		Мікроелемент и D	
	мг/л	мМ	мг/л	мМ	мг/л	мМ	мг/л	мМ
Амінокислоти								
аланін	17.80	0.20						
аргінін	191.00	1.10						

51

89644

52

аспарагін·H <sub>2</sub> O	135.00	0.90						
аспарагінова кислота			66.50	0.50				
глутамінова кислота			29.40	0.20				
гліцин	15.00	0.20						
гістидин·HCl·H <sub>2</sub> O	73.50	0.35						
ізолейцин	118.00	0.90						
лейцин	170.00	1.30						
лізин·HCl	182.00	1.00						
метіонін	59.60	0.40						
фенілаланін	82.50	0.50						
пролін	69.00	0.60						
серин	158.00	1.50						
треонін	95.20	0.80						
триптофан	32.60	0.16						
гірозин·2Na·2H <sub>2</sub> O			104.00	0.40				
валін	93.60	0.80						
<b>Вітаміни</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>
біотин	0.41	1.68						
кальцію пантотенат	4.50	9.45						
холінхлорид	17.90	128.78						
фолієва кислота			5.30	12.02				
інозит	25.20	140.00						
нікотинамід	4.00	32.79						
піридоксин·HCl	4.10	19.90						
рибофлавін	0.45	1.20						
тіамін·HCl	4.40	13.06						
вітамін B12	1.40	1.03						
<b>Мікроелементи</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нМ</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нМ</b>

53	89644				54			
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$					1.24	1.00		
$\text{CuSO}_4$	0.43	2.69						
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$							7.49	30.00
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$							834	3000
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$					0.17	1.01		
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$					140.00	492.84		
$\text{NH}_4\text{VO}_3$					0.65	5.56		
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$					0.13	0.49		
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$					0.12	0.53		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	230.00	801.39					863	3007
<b>Інші компоненти</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нм</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нм</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нм</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нм</b>
лінолева кислота			42.00	0.15				
тіктова кислота			105.00	0.51				
D-Глюкоза (Декстроза)			10000 00	5555.5 6				

20X Середовище 4.

Перші концентровані середовища були розроблені як 20XСередовище 4. Композиція середовищ для 20X Середовища 4 надається в Таблиці 3.

Таблиця 3. Таблиця середовищ для підживлення 20X Середовища 4.

Части на	Компонент	Кількість	Одиниця
I	Середовище 4А-1	31.120	г/л
	Nucellin™	40.000	мл/л
	Вихідний розчин Г/П	20.000	мл/л
	Вихідний розчин селеніту	2.000	мл/л
	ПВА	2.400	г/л

55	89644	56	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2.610	г/л
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.430	г/л
	Аспарагінова кислота	1.330	г/л
	Глутамінова кислота	0.588	г/л
	Лінолева кислота	0.840	мл/л
	Тіоктова кислота	2.100	мл/л
	Тирозин· 2Na (Mw 225)	1.790	г/л
	1000X Мікроелементи В	6.000	мл/л
	Глюкоза	100.000	г/л
	Глутамін	14.600	г/л
	pH до 7.0		
	Запис осмолярності	1064.000	мОсм
II	Цистеїн (400 мМ)	Додають 108 мл Мікроелементів D, 0.25 г FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O до 280 мл вихідного розчину цистеїну	
III	Фолієва кислота	720 мл 6 мМ фолієвої кислоти	

Примітка: Nucellin™ виготовляється компанією Eli Lilly (Індіанаполіс, IN, США); вихідний розчин Г/П=0,036мг/мл гідрокортизону, 1,08мг/мл путресцину·2HCl.

Композиція середовищ складається з 3 частин: I, II, III. Перша частина - концентрована версія 8XСередовища 4 з індивідуальними компонентами Середовища 4В, окрім фолієвої кислоти через проблеми з розчинністю цього вітаміну. Друга частина - вихідний розчин заліза, Мікроелементи D і кислотний цистеїн, для уникнення можливого осадження заліза при додаванні в частину I. Частина III - вихідний розчин фолієвої кислоти. Частина I додається 2% за об'ємом щодня, починаючи з дня 5, а частини II й III додаються один раз у день 5 разом з частиною I.

Кінцеве значення pH середовищ для підживлення було доведене до 7.0, а осмолярність становила приблизно 1064мОсм. 2% підживлення призведе до зростання глюкози на 2г/л, глутаміну на 2мМ і осмолярності на 14мОсм для культури.

#### 2. 16X Середовище 4.

Для зменшення зростання осмолярності середовища для підживлення змінили із 20X Середовища 4 (2% за об'ємом щодня) до 16XСередовища 4 (3% за об'ємом щодня). Композиція середовищ для 16X Середовища 4 наведена в Таблиці 4.



Таблиця 4. Таблиця середовищ для підживлення 16X Середовища 4.

Частина	Компонент	Кількість	Одиниця
I	Середовище 4A-1	24.896	г/л
	Nucellin™	32.000	мл/л
	Вихідний розчин Г/П	16.000	мл/л
	Вихідний розчин селеніту	1.600	мл/л
	ПВА	2.400	г/л
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2.088	г/л
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.344	г/л
	Аспарагінова кислота	1.064	г/л
	Глутамінова кислота	0.470	г/л
	Ліолева кислота	0.672	мл/л
	Тіоктова кислота	1.680	мл/л
	Тирозин · 2Na (Mw 225)	1.432	г/л
	1000X Мікроелементи В	9.000	мл/л
	Глутамін	6.280	г/л
	pH до 7.0		
	Запис осмолярності	295.000	мОсм
II	Цистеїн (400 мМ)	Додають 108 мл Мікроелементів D, 0.25 г FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O до 280 мл вихідного розчину цистеїну	
III	Фолієва кислота	720 мл 6 мМ фолієвої кислоти	

Примітка: Nucellin™ виготовляється компанією Eli Lilly (Індіанополіс, ІН, США); вихідний розчин Г/П=0,036мг/мл гідрокортизону, 1,08мг/мл путресцину·2HCl.

У цьому модифікованому 16X Середовищі 4 також усунули глюкозу з метою подальшого зменшення осмолярності і надання певної гнучкості підживлення глюкозою. Сумарна осмолярність середовищ для підживлення тепер становить 295мОсм.

### 3. 16X Середовище 4.

В композицію 16X Середовища 4 були внесені зміни. В підживлення додавали вихідний розчин заліза, що призвело до добавки 0,45мкМ з кожним підживленням. Крім цього, знову додали глюкозу, щоб надавати 1,5г/л з кожним підживленням. Композиція середовищ для цього модифікованого 16X Середовища 4 надається в Таблиці 5.

Таблиця 5. Таблиця середовищ для підживлення 16X Середовища 4.

Частина	Компонент	Кількість	Одиниця
I	Середовище 4A-1	24.896	г/л
	Nucellin™	32.000	мл/л
	Вихідний розчин Г/П	16.000	мл/л
	Вихідний розчин селеніту	1.600	мл/л
	ПВА	2.400	г/л
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2.088	г/л
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.344	г/л
	Аспарагінова кислота	1.064	г/л
	Глутамінова кислота	0.470	г/л
	Лінолева кислота	0.672	мл/л
	Тіоктова кислота	1.680	мл/л
	Тирозин · 2Na (Mw 225)	1.432	г/л
	1000X Мікроелементи В	9.000	мл/л
	Глюкоза	50.000	г/л
	Глутамін	7.300	г/л
	pH до 7.0		
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (1 mM вихідний розчин)	15.000	мл/л
	Запис осмолярності	607.000	мОсм
II	Фолієва кислота	720 мл 6 mM фолієвої кислоти	
III	Цистеїн (400 mM)	Додають 108 мл Мікроелементів D, 0.25 г FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O до 280 мл вихідного розчину цистеїну	

Примітка: Nucellin™ виготовляється компанією Eli Lilly (Індіанаполіс, IN, США); вихідний розчин Г/П=0,036мг/мл гідрокортизону, 1,08мг/мл путресцину·2HCl.

#### 4. 16X Середовище 4.

У цьому випадку, середовища для підживлення (16X Середовище 4) були зроблені в комбінованих середовищах замість 3 окремих підживлень як в останніх кількох серіях. Були проведені тести, щоб гарантувати, що фолієва

кислота може бути розчинена при необхідній концентрації й, що ні залізо, ні фолієва кислота не випадають в осад з розчину після зберігання або при 4°C, або при кімнатній температурі упродовж 6 днів. Композиція середовищ для комбінованого 16X Середовища 4 надається в Таблиці 6.

Таблиця 6. Таблиця середовищ для підживлення 16X Середовища 4.

Компонент	Кількість	Одиниця
Середовище 4A-1	24.896	г/л
Nucellin™	32.000	мл/л
Вихідний розчин Г/П	16.000	мл/л
Вихідний розчин селеніту	1.600	мл/л
ПВА	2.400	г/л
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2.088	г/л
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.344	г/л
Аспарагінова кислота	1.064	г/л
Глутамінова кислота	0.470	г/л
Лінолева кислота	0.672	мл/л
Тіоктова кислота	1.680	мл/л
Тирозин · 2Na (Mw 225)	1.432	г/л
Глюкоза	66.700	г/л
Глутамін	7.300	г/л
Фолієва кислота	70.560	мг/л
Кислотний цистеїн (400 мМ)	6.250	мл/л
Вихідний розчин FeSO <sub>4</sub> (1 мМ)	23.000	мл/л
1000x Мікроелементи В	9.000	мл/л
1000x Мікроелементи D	3.300	мл/л
Очікуване рН 6.11	Доводять до 7.0	
Запис осмолярності	724.000	мОсм

**Примітка:** Nucellin™ виготовляється компанією Eli Lilly (Індіанаполіс, ІН, США); вихідний розчин Г/П = 0,036 мг/мл гідрокортизону, 1,08 мг/мл путресцину · 2HCl.

Кінцева осмолярність середовищ становить 724мОсм, із щоденним додаванням глюкози у кількості 2г/л і додаванням глутаміну у кількості 1,5мМ.

#### 5. 12X Середовище 4.

У цьому випадку, кілька змін були внесені у середовища для підживлення. Використовувався порошок Середовища 4В замість додавання кожного індивідуального компоненту в Середовище 4В. Порошок Середовища 4В змішували із глюко-

зою й розчиняли окремо за основних умов, титруючи розчин рН 10,25. Додавали додатковий аспарагін і тіамін, оскільки результати аналізів на амінокислоти і вітаміни показали, що ці два компоненти були вичерпані до кінця підживлюваного процесу. Використання 12X Середовища 4 додатково зменшило зростання осмолярності при підживленні культури. Композиція середовищ для 12X Середовища 4 надається в Таблиці 7.

Таблиця 7. Таблиця середовищ для підживлення 12Х Середовища 4.

Компонент	Кількість	Одиниця
Середовище 4А-1	18.672	г/л
Nucellin™	24.000	мл/л
Вихідний розчин Г/П	12.000	мл/л
Вихідний розчин селеніту	1.200	мл/л
ПВА	2.400	г/л
Аспарагін·Н <sub>2</sub> О	1.620	г/л
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·Н <sub>2</sub> О	1.566	г/л
MgSO <sub>4</sub> ·7Н <sub>2</sub> О	0.258	г/л
Глутамін	5.475	г/л
Тіамін	0.040	г/л
Попередньо розчинене Середовище 4В і глюкоза	~175	мл/л
Кислотний цистеїн (400 мМ)	4.688	мл/л
Записують рН		
Доводять рН до 7.2 за допомогою 5н. НСІ		
Вихідний розчин FeSO <sub>4</sub> (1 мМ)	17.250	мл/л
1000х Мікроелементи В	6.750	мл/л
1000х Мікроелементи D	2.475	мл/л
Записують рН (очікуване 7.18)		
Записують Осм	566.000	
Попередньо розчинене Середовище 4В і глюкоза * (для 1л середовищ для підживлення)		
Вода	150 мл	
Змішують Середовище 4В (14,5 г) із глюкозою (38,3 г)	Додають в	
Доводять рН, використовуючи 25% NaOH до розчинення (рН приблизно 10,25)		

**Примітка:** Nucellin™ виготовляється компанією Eli Lilly (Індіанаполіс, ІН, США);  
вихідний розчин Г/П = 0,036 мг/мл гідрокортизону, 1,08 мг/мл путресцину·2НСІ.

Кінцева осмолярність становить 566мОсм. Щоденне додавання 4% за об'ємом дає приблизне збільшення осмолярності, рівне 8,6, збільшення рівня глюкози, рівне 2г/л і збільшення рівня глутаміну, рівне 1,5мМ. Композиція середовищ 12Х Середовища 4 також відома як Середовище 5. Середовище 5 легко зробити у порівнянні з 20Х Середовищем 4 або 16Х Середовищем 4, і воно є стабільним упродовж більш ніж 10 днів або при кімнатній температурі, або при 4°C (дані не показані).

Приклад 3: Підживлюваний процес з низьким рівнем глутаміну для культури анти-GDF-8 клітин

Клітини СНО потребують для виживання присутності глутаміну у початкових середовищах. Традиційно, початкові рівні глутаміну є високими, і глутамін постачається щодня після дня 5 до кінця підживлюваного процесу. Традиційні підживлювані процеси звичайно призводять до утворення високих рівнів лактату й амонію в клітинних культурах, які, як відомо, мають інгібіторний ефект на ріст клітин, щільність клітин й експресію рекомбінантного білка. Підживлювані процеси, у яких глюкоза повільно додається до культури, як було показано, знижують продукування лактату й поліпшують ріст клітин, щільність клітин й експресію рекомбінантного білка. Однак, попередні способи для здійснення додавання глюкози не є практичними для великомасштабного виробництва. У даному випадку, використовуючи культуральні середовища з нижчими початковими рівнями глутаміну й вилученням глутаміну із підживлення, показано, що продукуються більш низькі рівні амонію й лактату, що обумовлює збільшення життєздатності клітин. Додатково, у культурах з низьких рівнем глутаміну, збільшується експресія рекомбінантного білка, і зменшується кінцева осмолярність.

Матеріали й методи

Штами й середовища: клітини анти-GDF-8 культивувались в підживлюваному режимі в Середовищі 1 в 1л Біореакторі.

Умови культивування: Клітини вирощувались упродовж дванадцяти днів в 1л Біореакторі. Температура була змінена із 37°C на 31°C або в день 4, або в день 5 залежно від росту клітин. Випробовувались три підживлювані процеси: звичайний (контрольний) процес, процес без підживлення глутаміном й процес з низьким рівнем глутаміну. Доцільні деталі цих процесів перелічені в Таблиці 8 і Таблиці 9.

Таблиця 8. Підживлюваний процес в 1л Біореакторах процесом без підживлення глутаміном.

	Контрольний процес	Процес без підживлення глутаміном
Початкові середовища	13 мМ	13 мМ
Глутамін (мМ)		
Підживлення глутаміном	5 мМ у День 4	Відсутність підживлення глутаміном
Середовища для підживлення	Середовище 5 (із 37,5 мМ глутаміном)	Середовище 5 без глутаміну
Схема підживлення	4% щодня від Дня 5	4% щодня від Дня 5
Зміна температури на 31°C	День 4	День 5

Таблиця 9. Підживлюваний процес в 1л Біореакторах із процесом з низьким рівнем глутаміну

	Контрольний процес	Процес з низьким рівнем глутаміну
Початкові середовища	13 мМ	4 мМ
Глутамін (мМ)		
Підживлення глутаміном	5 мМ у День 4	Відсутність підживлення глутаміном
Середовища для підживлення	Середовище 5 (із 37,5 мМ глутаміном)	Середовище 5 без глутаміну
Схема підживлення	4% щодня від Дня 5	4% щодня від Дня 5
Зміна температури на 31°C	День 4	День 5

Аналіз зразків: Щодня відбирались зразки із культур і аналізувались на щільність клітин, життєздатність клітин, рівні лактату, глутаміну і амонію. Титр експресованого антитіла анти-GDF-8 також визначався щодня.

Результати й висновки

Фігура 3 показує щільність клітин культур, вирощених або в умовах без підживлення глутаміном, або в контрольних підживлюваних умовах. В обох випадках щільність клітин була подібною в ході експерименту.

Фігура 4 показує відсоток життєздатності клітин в культурах, вирощених або в умовах без підживлення глутаміном, або в контрольних підживлюваних умовах. Культура без підживлення глутаміном показала помітно вищу життєздатність клітин до кінця експерименту, починаючи з дня 6.

Фігура 5 показує рівні амонію в культурах, вирощених або в умовах без підживлення глутаміном, або в контрольних підживлюваних умовах. Культура без підживлення глутаміном показала виражене зменшення рівнів амонію до кінця експерименту, починаючи з дня 4.

Фігура 6 показує рівні лактату в культурах, вирощених або в умовах без підживлення глутаміном, або в контрольних підживлюваних умовах. Рівні лактату були дещо нижчими в культурі без підживлення глутаміном у ході всього експерименту.

Фігура 7 показує титр антитіла анти-GDF-8 в культурах, вирощених або в умовах без підживлення глутаміном, або в контрольних підживлюваних умовах. Кінцевий титр антитіла анти-GDF-8 був вищим в культурі без підживлення глутаміном.

Фігура 8 показує щільність клітин культур, вирощених або в умовах з низьким рівнем глутаміну, або в контрольних підживлюваних умовах. В обох випадках, щільність клітин була подібною в ході експерименту.

Фігура 9 показує життєздатність клітин в культурах, вирощених або в умовах з низьким рівнем глутаміну, або в контрольних підживлюваних умовах. В обох випадках, життєздатність клітин була подібною в ході експерименту.

Фігура 10 показує рівні амонію в культурах, вирощених або в умовах з низьким рівнем глутаміну, або в контрольних підживлюваних умовах. Культура з низьким рівнем глутаміну показала помітне зменшення рівнів амонію у ході всього експерименту.

Фігура 11 показує рівні лактату в культурах, вирощених або в умовах з низьким рівнем глутаміну, або в контрольних підживлюваних умовах. Культура з низьким рівнем глутаміну показала помітне зменшення рівнів лактату у ході всього експерименту, починаючи з дня 4.

Фігура 12 показує титр антитіла анти-GDF-8 в культурах, вирощених або в умовах з низьким рівнем глутаміну, або в контрольних підживлюваних умовах. Кінцевий титр антитіла анти-GDF-8 був вищим в культурі з низьким рівнем глутаміну.

Разом ці результати вказують на те, що зменшення рівня глутаміну є вигідним для клітинних культур, знижуючи рівень продукування амонію, збільшуючи життєздатність клітин й збільшуючи титр експресованого антитіла анти-GDF-8. Крім того, у культурах з низьким рівнем глутаміну, спостерігаються низькі рівні лактату, можливо, через зменшення норми споживання глюкози. Зменшення рівнів амонію і лактату також впливає на зниження сумарної осмолярності. Як відомо, підвищена осмолярність також чинить інгібуючий ефект на ріст й життєздатність клітин. Низькі початкові рівні глутаміну разом з вилученням підживлення глутаміном також позитивно впливають на зменшення рівня амонію, що утворюється внаслідок неферментативного розщеплення глутаміну під час зберігання середовищ. Вилучення глутаміну у вигляді підживлення також спрощує процес культивування клітин анти-GDF-8.

Приклад 4. Відповідь на дози заліза клітин анти-GDF-8 у Середовищі 1 і Середовищі 2.

Середовище 1 є набагато більш концентрованим на поживні речовини ніж Середовище 2. Щоб уникнути проблем із дефіцитом заліза упродовж клітинної культури, визначались оптимальні рівні заліза для росту клітин в Середовищі 1.

Матеріали й методи

Клітини анти-GDF-8 культивували в чашках для одного пропускання або в Середовищі 1, або в Середовищі 2. Концентрації заліза цих середовищ змінювали шляхом додавання різних кількостей вихідного розчину заліза. Кінцеві щільності клітин визначали за допомогою CEDEX.

Результати й висновки

Фігура 13 показує відповідь на дози Fe клітин анти-GDF-8 у Середовищі 1 і Середовищі 2, що містять різні концентрації заліза. У Середовищі 2 щільність клітин була відносно постійною для концентрацій заліза у межах від 3мкМ до 15мкМ. У Середовищі 1 щільність клітин збільшується зі збільшенням концентрації заліза, проте досягає максимуму приблизно після 5мкМ. Це розходження могло відбутися через високий вміст поживних речовин у Середовищі 1, що могло знизити доступність заліза для клітин як наслідок процесів хелатоутворення із залізом в середо-

вищах. Ці результати вказують на те, що рівні заліза повинні бути підтримуватися вище 5мкМ, щоб уникнути проблем із дефіцитом заліза у Середовищі 1.

Приклад 5. Заміна глутамату на глутамін в процесі в біореакторі.

Були виконані три експерименти для випробування ефектів заміни глутамату на глутамін в процесі культивування клітин анти-Льюїс Y.

Матеріали й методи

Експерименти проводились в 10л біореакторах при pH 7,1, 30% розчиненого кисню і початковій температурі, що становила 37°C, із зміною на 31°C у день 5. Барботуючими газами і газами, що займали вільний простір над культурою, були 88% суміші 93% повітря/7% CO<sub>2</sub> і 12% кисню. Початковими середовищами у всіх експериментах було Середовище 1, що містить глутамін. Середовища для підживлення й схема підживлень, включаючи додаткові підживлення глюкозою й глутаміном, показані у Таблиці 10. Колонки, позначені «Глутамат», підживлювали модифікованим Середовищем 5, що не містить глутаміну, проте містить молярну концентрацію глутамату, рівну молярній концентрації глутаміну в стандартному Середовищі 5. Колонки, позначені «глутамін», підживлювали стандартним Середовищем 5.

Таблиця 10. Схема підживлень.

День	9040-44		9040-56		9040-64	
	Глутамат 1	Глутамін 1	Глутамат 2	Глутамін 2	Глутамат 3	Глутамін 3
0						
1						
2						
3						
4		5 мМ глн		5 мМ глн	3 г/л глюк3	7.7 мМ глн 2.9 г/л глюк
5	3.6 г/л глюк	5 мМ глн 5.5 г/л глюк	3.5 г/л глюк	5 мМ глн 6 г/л глюк	3 г/л глюк	3 г/л глюк
6	12 % 16XSеред овище 4	12 % 16XSередови ще 4	17% Середовищ е 5	17 % 16XSередо вище 4	29% Середовищ е5	29% Середовищ е5
7		4 мМ глн				
8						
9		2.5 г/л глюк				
10	10 % 16XSеред овище 4	10 % 16XSередови ще 4	8% Середовищ е5	5 % 16XSередо вище 4		

71		89644			72	
11		1 г/л глюк				
12						
13		1 г/л глюк				

#### Результати й висновки

У межах кожного експерименту щільність клітин є подібною до показаної на Фігурі 14. Щільності клітин є низькими в експериментах «Глутамін 2» і «Глутамат 2» через відхилення рН до приблизно 6.7 у день 3 процесу. Зниження щільності між днем 6 і 7 у експериментах «Глутамін 3» і «Глутамат 3» відбувається внаслідок підживлення 29% середовищем у день 6.

Фігура 15 показує життєздатність клітин культур, що отримували підживлення глутаматом і глутаміном. Життєздатності залишалися вищими протягом другої половини процесу в біореакторах, що містили культури, які отримували підживлення глутаматом.

В Експерименті 1 титр анти-Льюїс Y подібний між культурами, що отримували підживлення глутаматом і глутаміном. Фігура 16 показує, що в Експериментах 2 і 3, титри анти-Льюїс Y є нижчими в реакторах, що отримували підживлення глутаміном. Більш низький титр анти-Льюїс Y, що спостерігається у цих реакторах, міг відзначитися через високі рівні продукowanego лактату, як показано на Фігурі 17.

Біореактори, які функціонували із глутаматом у середовищах для підживлення, мають нижчу концентрацію амонію (Фігура 18) і більш низьку осмолярність (Фігура 19).

Тест ELISA на зв'язування використовувався для випробування активності зразків із експериментів «Глутамін 1» і «Глутамат 1». Активності були подібними: 110% від еталону для зразка Глутамін 1 і 122% від еталону для зразка Глутамат 1 (дані не показані).

Заміна глутамату на глутамін в цих експериментах не має істотного ефекту на щільність клітин. Однак, життєздатність клітин є нижчою в біореакторах, що отримували підживлення глю-

таміном. Амоній, лактат і осмолярність є нижчими в біореакторах, що отримували підживлення глутаматом у порівнянні із тими, що отримували підживлення глутаміном. У середньому, титр анти-Льюїс Y є вищим в біореакторах, що отримували підживлення глутаматом, а активність є по суті однаковою за обох умов.

Приклад 6. Заміна глюкози й глутаміну в процесі культивування клітин анти-Льюїс Y.

Мета цього експерименту полягала в тому, щоб випробувати ефекти заміни глюкози й глутаміну середовищами для підживлення, переліченими нижче в Таблиці 11, при культивуванні клітин анти-Льюїс Y (див. Bogheart et al., Antibody-targeted chemotherapy with the calicheamicin conjugate hu3S193-N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide targets Lewisy and eliminates Lewisy-positive human carcinoma cells and xenografts, Clin. Can. Res. 10:4538-49 (2004)). Визначали щільність клітин, життєздатність клітин, титр анти-Льюїс Y і рівні амонію.

#### Матеріали й методи

Експеримент був виконаний у колбах для струшування на 250мл при початковому об'ємі, що дорівнював 75мл. Всі колби для струшування були засіяні у концентрації  $0,25 \times 10^6$  клітин/мл у Середовищі 2. Колби інкубували при 37°C в 7% CO<sub>2</sub> інкубаторі упродовж 14 днів. У дні 3 і 4, колби підживлювали 5% за об'ємом середовища для підживлення Середовища 6. Склад Середовища 6 представлений в Таблиці 11. У дні 5-13 колби підживлювали 5% за об'ємом одного з розчинів для підживлення, перелічених у Таблиці 12. Кожна умова відтворювалася у дворазовому повторі. Зразки відбирали щодня для підрахунку клітин за допомогою CEDEX і випробувань на амоній, глюкозу і лактат.



Таблиця 11. Склад Середовища 6.

Амінокислоти	мг/л	мМ	Мікроелементи	мкг/л	нМ
аланін	142.48	1.60	Натрію селеніт	40.00	231.35
аргінін	1528.84	8.79	CuSO <sub>4</sub>	3.44	21.51
аспарагін·H <sub>2</sub> O	1080.60	7.20	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	7.49	30.00
аспарагінова кислота	532.40	4.00	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2534	9115
цистин·2HCl	473.00	1.51	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2704	9421
глутамінова кислота	235.38	1.60	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.17	1.01
глутамін	4820.00	33.01	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	140	492.84
гліцин	120.07	1.60	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.24	1.00
гістидин·HCl·H <sub>2</sub> O	588.32	2.80	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0.65	5.56
ізолейцин	944.52	7.21	NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.13	0.49
лейцин	1360.75	10.39	SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.12	0.53
лізин·HCl	1456.80	8.00	AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.20	4.97
метіонін	477.06	3.20	AgNO <sub>3</sub>	0.17	1.00
фенілаланін	660.36	4.00	Ba(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2.55	9.98
пролін	552.31	4.80	KBr	0.12	1.01
серин	1264.70	12.04	CdCl <sub>2</sub> ·2,5H <sub>2</sub> O	2.28	9.99
треонін	762.02	6.40	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.38	10.00
триптофан	260.94	1.28	CrCl <sub>3</sub>	0.32	2.02

75	89644		76		
тирозин·2Na·2H <sub>2</sub> O	832.62	3.19	Na	4.20	100.02
валін	749.21	6.40	GeO <sub>2</sub>	0.53	5.07
			KI	0.17	1.02
<b>Вітаміни</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	RbCl	1.21	10.01
біотин	3.28	0.01	ZrOCl <sub>2</sub> ·8H <sub>2</sub> O	3.22	9.99
кальцію пантотенат	36.02	0.08			
холінхлорид	143.28	1.03	<b>Інші компоненти</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нМ</b>
Фолієва кислота	42.43	0.10	гідрокортизон	288	0.79
Інозит	201.71	1.12	путресцин·2HCl	8000	49.66
нікотинамід	32.02	0.26	лінолева кислота	336.25	1.20
піридоксин·HCl	32.82	0.16	тіоктова кислота	840.63	4.08
рибофлавін	3.60	0.01			
тіамін·HCl	35.22	0.10	<b>Інші компоненти</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>
вітамін B12	11.21	0.01	D-Глюкоза (Декстроза)	33005.99	183.37
			ПВА	2400.00	
<b>Неорганічні солі</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	Nucellin™	80.00	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1635.00	12.02			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	171.98	0.70			

Таблиця 12. Підживлення на дні 5-13. Модифіковане Середовище 6 не містить глюкози або глутаміну.

<b>GluGln</b>	Модифіковане Середовище 6 + 43 г/л глюкози + 4.82 г/л глутаміну (контроль)
<b>Glu</b>	Модифіковане Середовище 6 + 43 г/л глюкози + 4.82 г/л глутамату
<b>GluAsp</b>	Модифіковане Середовище 6 + 43 г/л глюкози + 4.36 г/л аспарагіну
<b>GluGlyGln</b>	Модифіковане Середовище 6 + 43 г/л глюкози + 6.71 г/л гліцилглутаміну
<b>GluGlu</b>	Модифіковане Середовище 6 + 43 г/л галактози + 4.82 г/л глутаміну
<b>GalGlu</b>	Модифіковане Середовище 6 + 43 г/л галактози + 4.82 г/л глутамату
<b>GalGln</b>	Модифіковане Середовище 6 + 43 г/л галактози + 4.36 г/л аспарагіну
<b>GalGlyGln</b>	Модифіковане Середовище 6 + 43 г/л галактози + 6.71 г/л гліцилглутаміну
<b>GalAsp</b>	Середовище 6 + 43 г/л глюкози

#### Результати й висновки

Найвища щільність клітин відзначалась при заміні глутамату або гліцилглутаміну на глутамін в присутності або глюкози, або галактози в середовищах для підживлення. Щільність клітин була зазвичай нижчою в культурах, що отримували підживлення глюкозою/глутаміном, галакто-

зою/глутаміном, або тільки глюкозою (Фігура 20). Кінцева життєздатність була найвищою в культурах, що отримували підживлення тільки глюкозою, друге місце належить культурам, що отримували підживлення глюкозою/глутаматом. Найнижча життєздатність відзначалась у культурах, що отримували підживлення глутаміном або

аспарагіном у комбінації або із глюкозою, або з галактозою (Фігура 21).

Титр у день 14 був найвищим в культурах, що отримували підживлення глюкозою/гліцилглутаміном і глюкозою/глутаматом, і становив приблизно 700мкг/мл. Титр був найнижчим у культурах, що отримували підживлення галактозою/гліцилглутаміном і галактозою/аспарагіном, і становив приблизно 500мкг/мл. Титр у контролі глюкоза/глутамін становив приблизно 570мкг/мл (Фігура 22).

Найнижчі рівні амонію відзначались у колбах, що отримували підживлення глюкозою/глутаматом або тільки глюкозою. Колби, що отримували підживлення галактозою/глутаматом, глюкозою/глутаміном, глюкозою/гліцилглутаміном і глюкозою/аспарагіном, показали проміжні рівні амонію. Колби, що отримували підживлення галактозою/аспарагіном, галактозою/гліцилглутаміном і галактозою/глутаміном, мали найвищі рівні амонію (Фігура 23).

Рівні глюкози залишалися вищими 1г/л у всіх колбах, що отримували підживлення галактозою до дня 11. Від дня 11 до дня 14 глюкоза в цих культурах ніколи не вичерпувалася повністю, залишаючись на рівні від 0,6 до 1г/л, без істотних розходжень між різними культурами.

Рівні глюкози збільшилися у всіх колбах, що отримували підживлення глюкозою або глюкозою у комбінації з іншим субстратом до дня 10. Від дня 10 до дня 14 у цих культурах, рівні глюкози залишалися досить постійними й подібними один до одного. У день 14 приблизно 8,4г/л глюкози залишалося в культурах, що отримували підживлення глюкозою/глутаматом, і приблизно 10,8г/л глюкози залишалося в культурах, що отримували підживлення тільки глюкозою.

Рівні лактату досягли приблизно 2,4г/л у день 5, коли умови були однаковими для всіх клітин, і знижувались по суті до нуля у всіх культурах до дня 14. Рівні лактату були найвищими від дня 10 до дня 14 у контролі глюкоза/глутамін, проте були нижчими 1г/л упродовж цього часу (дані не показані).

Всі умови, що випробовувались в цьому експерименті, призвели до вищої щільності клітин ніж за контрольної умови глюкоза/глутамін. Всі умови, що випробовувались, крім умови галактоза/аспарагін, призвели до більш високої кінцевої життєздатності, ніж або за контрольної умови глюкоза/глутамін, або за умови підживлення галактозою/глутаміном. Титр у контролі глюкоза/глутамін був приблизно 570мкг/мл у порівнянні з приблизно 700мкг/мл за умови підживлення глюкозою/гліцилглутаміном і умови підживлення глюкозою/глутаматом.

Приклад 7. Оцінка серійного процесу з низьким рівнем глутаміну для виробництва анти-GDF-8.

Типові способи підживлюваного виробництва вимагають багаторазового підживлення за період культивування. Ці підживлення призначені для того, щоб замінити поживні речовини в середовищі, що, можливо, були вичерпані клітинами або, можливо, розщепилися упродовж серійного культивування. Ці підживлення створюють ускла-

днення у випадку, коли процес масштабується для використання в більших реакторах, такі як потреба в лопастному пристрої (див. Фігуру 24). Крім того, підживлення розводять ту кількість анти-GDF-8, що вже секретувалася у культуру, і тому впливають на титр врожаю. Використання серійного виробництва дозволило б інокулювати біореактор в повному об'ємі, замість часткового об'єму таким чином, щоб пристосувати підживлення, що нівелювало б потребу у лопастному пристрої і значно знизило будь-який вплив розведення на продуктивність.

Глутамін є однією з найважливіших причин, чому використовується тактика підживлення, оскільки він не стійкий при 37°C, і вважалось, що його необхідно поповнювати протягом серійної культури. Однак, результати Прикладів 2, 5 і 6, у яких випробовувалася стратегія забезпечення низького рівня глутаміну, показали істотне збільшення продуктивності в порівнянні з контрольним реактором, що отримував підживлення глутаміном. Цей результат був об'єднаний із серійним процесом, щоб створити серійний процес з низьким рівнем глутаміну, що випробовувався в цьому Прикладі.

#### Матеріали й методи

Клітини анти-GDF-8 вирощувались в 1л біореакторах упродовж 12 днів відповідно до наступних чотирьох умов росту. Параметри біореактора для всіх умов були однаковими. Розчинений кисень підтримувався на рівні не нижче ніж 23% насичення повітря шляхом барботування повітрям, а рН підтримувався на 7,00 шляхом додавання розчину, що містить натрію бікарбонат в концентрації 0,58М і натрію карбонат в концентрації 0,71М. Температура всіх культур підтримувалась на 37°C протягом перших чотирьох днів. На четвертий день серії температура всіх біореакторів була знижена до 31°C і підтримувалась у цій точці упродовж серії. Контрольні і підживлювані культури підживлювали 8%, 12% і 8% від сумарного об'єму реактора їх відповідними середовищами для підживлення в дні 5, 7 і 10, відповідно.

#### 1) Контроль.

- Середовище 7 середовища для інокуляції (див. Таблицю 13).

- Середовище для підживлення 8, підживлення в дні 5, 7 і 10 (див. Таблицю 13).

- Підживлення 5мМ глутаміну в день 4.

- Зниження температури до 31°C у день 4.

#### 2) Серійно-підживлюваний процес з низьким рівнем глутаміну.

- Середовище 7 середовища для інокуляції тільки з 4мМ глутаміну (див. Таблицю 13).

- Середовище для підживлення 8 без глутаміну, підживлення в дні 5, 7 і 10 (див. Таблицю 13).

- Відсутність підживлення глутаміном в день 4.

- Зниження температури до 31°C у день 4.

#### 3) Серійний процес з низьким рівнем глутаміну.

- Нове серійне середовище середовища для інокуляції тільки з 4мМ глутаміну (див. Таблицю 13).

- Відсутність підживлення.
- Відсутність підживлення глутаміном.
- Зниження температури до 31°C у день 4.
- Додання 5г/л глюкози в день 8.
- 4) Серійний процес з низьким рівнем глутаміну з підживленням в день 8.
- Нове серійне середовище середовища для інокуляції тільки з 4мМ глутаміну (див. Таблицю 13).
- Відсутність підживлення.

- Відсутність підживлення глутаміном.
- Зниження температури до 31°C у день 4.
- Додання 4г глюкози, 375мг аспарагіну, 3мл 1мМ вихідного розчину FeSO<sub>4</sub>, 3,33мл вихідного розчину Nucellin™, 5г/л, 2,57мл вихідного розчину гідрокортизону, 36мг/л і путресцину, 1,0г/л, 0,23мл вихідного розчину натрію селеніту, 50мг/л, і 13,1мг тіаміну в день 8.

Таблиця 13. Склад середовищ, що використовувались.

	ММ	Середовище 7	Середовище 8	Серійні середовища
Амінокислоти		мМ	мМ	мМ
L-аланін	89.0	1.08	2.4	0.2
L-Аргінін	174.0	6.84	13.2	4
L-Аспарагін·H <sub>2</sub> O	150.0	4.76	21.4	7.5
L-аспарагінова кислота	133.0	2.40	6	1.65
L-Цистеїн·HCl·H <sub>2</sub> O	176.0	0.40	0	0.4
L-Цистин·2HCl	313	0.95	1.875	1
L-глутамінова кислота	147.0	1.08	2.4	1.08
L-Глутамін	146.0	13.00	37.5	4
Гліцин	75.0	1.28	2.4	1.54
L-Гістидин·HCl·H <sub>2</sub> O	210.0	1.76	4.2	1.76
L-ізолейцин	131.0	4.76	10.8	2.83
L-Лейцин	131.0	6.52	15.6	4.7
Лізин·HCl	182.0	5.20	12	5.2
L-метіонін	149.0	1.96	4.8	2.6
L-фенілаланін	165.0	2.60	6	2.2
L-пролін	115.0	3.24	7.2	4.1
L-серин	105.0	8.60	18	8.6
L-треонін	119.0	4.32	9.6	3.2
L-триптофан	204.0	0.78	1.92	1.04
L-тирозин 2Na·2H <sub>2</sub> O	261.0	2.16	4.8	1.75
L-валін	117.0	4.32	9.6	4

Вітаміни		мкМ	мкМ	мкМ
Біотин	244.0	8.31	20.4	11
D-Кальцію пантотенат	476.0	46.06	112.8	46.06
холінхлорид	139.0	632.2	1548	840
Фолієва кислота	441.0	58.8	144	58.8
I-інозит	180.0	686	1680	911
нікотинамід	122.0	161.7	396	215
піридоксин·HCl	206.0	88.15	240	88
піридоксаль·HCl	203.0	10	0	10
рибофлавін	376.0	5.37	13.2	1.1
тіамін·HCl	337.0	63.7	274.7	117
вітамін B12	1355.0	4.9	12	7.8
Неорганічні солі				
NaCl	58.5	18.8 мМ		
KCl	74.6	4.2 мМ		4.19 мМ
CaCl <sub>2</sub>	111	1.05 мМ		1.05 мМ
Натрію селеніт	173	27 мкг/л	60 мкг/л	60 мкг/л
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	142	4.68 мМ	11 мМ	4.68 мМ
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	138	0.5 мМ		0.3986 мМ
MgSO <sub>4</sub>	120	1.15 мМ	1.05 мМ	1.15 мМ
MgCl <sub>2</sub>	95	0.3 мМ		0.3 мМ
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	278	9 мкМ	24.675 мкМ	9 мкМ
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	404	0.125 мкМ		0.124 мкМ
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287	9.2 мкМ	17 мкМ	9.2 мкМ
CuSO <sub>4</sub>	160	0.05 мкМ	0.074 мкМ	0.064 мкМ
NaHCO <sub>3</sub>	84	23.8 мМ		23.8 мМ
Інші				
Глюкоза	180	16 г/л	38.3 г/л	15 г/л
Полівініловий спирт		2.56 г/л	2.4 г/л	2.56 г/л

Гідрокортизон	363	0.23 мг/л	0.43 мг/л	0.28 мг/л
Путресцин·2HCl	161	6.4 мг/л	12 мг/л	7.7 мг/л
Натрію піруват	110	500 мкМ		500 мкМ
лінолева кислота	280	0.81 мкМ	1.8 мкМ	0.81 мкМ
тіоктова кислота	206	2.7 мкМ	6 мкМ	2.7 мкМ
Nucellin™		54 мг/л	120 мг/л	50 мг/л
1000x		1.5 мл/л	6.75 мл/л	1.5 мл/л
Мікроелементи В				

#### Результати й висновки

Ріст клітин упродовж перших 4 днів був подібний для контролю й серійних процесів, у той час як у підживлюваному процесі з низьким рівнем глутаміну спостерігалось дещо нижча щільність клітин й вона залишалася трохи нижчою для решти серії. Обидва серійних процеси підтримували більш високі щільності клітин упродовж серії, імовірно через відсутність будь-якого істотного розведення (див. Фігуру 25). Життєздатності всіх культур були однаковими до дня 8. Однак, цікаво відзначити, що в день 11, життєздатність серійного процесу, що не підживлювався, була нижчою ніж в інших трьох біореакторах й трималася значно нижчою до останнього дня. Це свідчить про те, що серійне середовище могло б все ще бути оптимізованим, тому що у серійному процесі з підживленням відзначалася життєздатність, що була такою ж як у серійно-підживлюваних біореакторах (див. Фігуру 26).

Клітини, що культивувались або в серійному процесі з низьким рівнем глутаміну, або в серійно-підживлюваному процесі з низьким рівнем глутаміну, перевищили за продуктивністю ті ж самі клітини, що культивувались у контрольному серійно-підживлюваному процесі. У контрольному серійно-підживлюваному процесі відзначався титр дня збору врожаю, що становив 685мкг/мл, як очікувалось, у той час як у серійно-підживлюваному процесі з низьким рівнем глутаміну спостерігався титр урожаю, рівний 1080мкг/мл, що приблизно на 58% вище ніж контроль. Це нагадує результати, що відзначалися раніше. У серійному процесі з низьким рівнем глутаміну без підживлення спостерігався титр дня збору врожаю, що становив 960мкг/мл, на 40% вищий ніж у контролю, подібний до серійно-підживлюваного процесу з низьким рівнем глутаміну, у той час як у серійному процесі з низьким рівнем глутаміну з підживленням відзначався найвищий титр, що становив 1296мкг/мл. Це - 89% збільшення у порівнянні з контролем (див. Фігуру 27).

При аналізі рівнів інгібіторів для цих чотирьох умов результати показали, що рівні лактату і амонію для всіх трьох процесів з низьким рівнем глутаміну були значно нижчими ніж у випадку контролю. Фактично, після дня 4, ці три умови або припинили продукувати, або почали споживати лактат, у той час як контроль продовжував

продувати лактат упродовж серії (див. Фігуру 28). Як очікувалось, рівні амонію були набагато нижчими в процесах з низьким рівнем глутаміну і зменшувалися після дня 4, у той час як контроль продовжував продукувати амоній (див. Фігуру 29).

У цьому Прикладі, комбінування серійного процесу зі стратегією забезпечення низького рівня глутаміну призвело до 40% покращення продуктивності у порівнянні з контрольным серійно-підживлюваним процесом для клітин анти-GDF-8. Дані також свідчать про те, що з деякою оптимізацією серійного середовища можна досягнути майже 2-кратного покращення продуктивності. Це покращення продуктивності можна віднести на рахунок двох факторів. По-перше, низький рівень глутаміну збільшує продуктивність або безпосередньо, або шляхом утримання концентрації амонію і лактату на дуже низькому рівні. По-друге, через відсутність підживлень, титр не розводиться упродовж серії. Збільшення продуктивності разом з легкістю в обслуговуванні, що притаманна серійному процесові, робить його привабливим вибором для виробництва рекомбінантних поліпептидів.

Приклад 8. Вплив концентрацій глутаміну й аспарагіну у серійних середовищах на процес культивування клітин анти-GDF-8.

У Прикладах 2, 5 і 6 було продемонстровано, що забезпечення низького рівня глутаміну надає переваги підживлюваним культурам у двох клітинних лініях, включаючи збільшення росту клітин, життєздатності клітин й титру, а також зменшення виробництва лактату й амонію. Аспарагін також, як здається, відіграє роль у серійних середовищах.

#### Матеріали й методи

Клітини анти-GDF-8 культивували упродовж дванадцяти днів в 1л біореакторах в модифікованому Середовищі 9 з різними концентраціями глутаміну й аспарагіну. Основний склад Середовища 9 надається в Таблиці 14. Експериментальні зміни в цьому основному складі перелічені в Таблиці 15. Культури інкубували при 37°C упродовж перших 5 днів за винятком Реактора 4, температура якого становила 30°C протягом першого дня через проблеми з контролем температури. Температуру для культур змінили на 31°C у день 6. У день 7 культури підживлювали один раз 5% за об'ємом Середовища 5 без глутаміну. Культу-



ри аналізувались щодня на щільність клітин, титр

анти-GDF-8, рівні лактату і амонію.

Таблиця 14. Склад Середовища 9.

Амінокислоти	мг/л	мМ	Мікроелементи	мкг/л	нМ
аланін	17.80	0.20	Натрію селеніт	69.16	400.00
аргінін	696.00	4.00	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	50.00	123.76
аспарагін·H <sub>2</sub> O	3000.00	20.00	CuSO <sub>4</sub>	10.24	64.00
аспарагінова кислота	219.45	1.65	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	99.88	400.00
цистеїн·HCl·H <sub>2</sub> O	70.40	0.40	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4170	15000
цистеїн·2HCl	468.75	1.50	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2640	9200
натрію глутамат	33.80	0.20	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	33.80	200.00
глутамін	584.00	4.00	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	284.07	1000
гліцин	115.50	1.54	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	247.20	200.00
гістидин·HCl·H <sub>2</sub> O	474.60	2.26	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	2.34	20.00
ізолейцин	570.73	4.36	NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5.26	20.00
лейцин	1030.70	7.87	SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.90	4.00
лізін·HCl	1401.40	7.70	AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.97	4.00
метіонін	387.40	2.60	KBr	0.48	4.00
фенілаланін	507.00	3.07	CrCl <sub>3</sub>	15.83	100.00
пролін	539.50	4.69	Na	0.17	4.00
серин	1052.00	10.02	GeO <sub>2</sub>	0.42	4.00
треонін	564.80	4.75	KI	33.20	200.00
триптофан	274.16	1.34	RbCl	0.48	4.00
тирозин·2Na·2H <sub>2</sub> O	745.75	2.86	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12.37	200.00
валін	749.00	6.40	LiCl	0.17	4.00
Вітаміни	мг/л	мМ	Інші компоненти	мкг/л	нМ
біотин	2.68	0.01	Гідрокортизон	540.00	1.49
кальцію пантотенат	21.92	0.05	Путресцин·2HCl	15000	93.11
холінхлорид	158.46	1.14	лінолева кислота	290.00	1.04
фоліева кислота	25.93	0.06	тіоктова кислота	716.00	3.48
інозит	163.98	0.91			
нікотинамід	26.23	0.22	Інші компоненти	мг/л	мМ
піридоксаль·HCl	2.03	0.01	D-Глюкоза	15000.00	83.33

			(Декстроза)		
піридоксин·HCl	36.13	0.18	ПВА	2560.00	
рибофлавін	2.41	0.01	Nucellin™	50.00	
тіамін·HCl	39.43	0.12	Натрію піруват	55.00	0.50
вітамін B12	21.17	0.02			
<b>Неорганічні солі</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>			
CaCl <sub>2</sub>	116.55	1.05			
KCl	312.90	4.19			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	56.60	0.40			
NaCl	1100.00	18.80			
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	645.84	4.68			
MgSO <sub>4</sub>	138.00	1.15			
MgCl <sub>2</sub>	28.50	0.30			
NaHCO <sub>3</sub>	2000.00	23.81			

Таблиця 15. Умови з аспарагіном і глутаміном, що випробовувались.

	Реактор 1	Реактор 2	Реактор 3	Реактор 4	Реактор 5	Реактор 6
Клітинна лінія	анти-GDF-8					
Середовища	Серійні середовища (Середовище 9)					
Рівні глутаміну	1 мМ	1 мМ	1 мМ	4 мМ	4 мМ	4 мМ
Рівні аспарагіну	8 мМ	12 мМ	20 мМ	8 мМ	12 мМ	20 мМ
Щільність посіву (x10 <sup>6</sup> /мл)	від 0,3 до 0,35					
Середовища для підживлення	Середовище 5 - глутамін, 5% у День 7					
Ді культивування	12					
Зізна температури (37-31°C)	День 6	День 6	День 6	День 5	День 5	День 4



## Результати й висновки

Фігури 30, 31, 32 і 33 показують ріст клітин анти-GDF-8, титр анти-GDF-8, рівні лактату й рівні амонію, відповідно, у ході всіх експериментів за різних експериментальних умов.

За всіх експериментальних умов 4мМ глутамін є кращим ніж 1мМ глутамін на всіх рівнях аспарагіну, що випробовувались. При порівнянних рівнях глутаміну умови з 12мМ і 20мМ аспарагіну є кращими ніж умови з 8мМ аспарагіну. Для всіх умов, що випробовувались, в кінці культивування спостерігалися зменшені рівні лактату і  $\text{NH}_4$ .

Приклад 9. Вплив концентрацій глутаміну й аспарагіну в серійних середовищах на процес культивування клітин анти-GDF-8.

У Прикладі 8 було продемонстровано, що Середовище 9, яке містить початкову, концентрацію, рівну 4мМ глутаміну, має кращу продуктив-

ність ніж середовища, що містять 1мМ глутаміну, незалежно від рівнів аспарагіну. Цей приклад демонструє вплив середовищ, що містять 13мМ рівень глутаміну і різні рівні аспарагіну.

## Матеріали й методи

Клітини анти-GDF-8 культивували упродовж дванадцяти днів в 1л біореакторах в модифікованому Середовищі 9 з різними концентраціями глутаміну й аспарагіну, що представлені в Таблиці 16. Культури інкубували при 37°C протягом перших 3 днів. Після цього температуру культур змінили на 31°C у день 4. У день 7 культури один раз підживили за допомогою 5% за об'ємом Середовища 5 без глутаміну. Культури періодично аналізувались на щільність клітин, життєздатність клітин, рівні лактату, амонію й рівні глутаміну, титр анти-GDF-8 і осмолярність.

Таблиця 16. Умови з аспарагіном і глутаміном, що випробовувались.

	Реактор 1	Реактор 2	Реактор 3	Реактор 4	Реактор 5	Реактор 6
Клітинна лінія	анти-GDF-8					
Середовища	Серійні середовища (Середовище 9)					
Рівні глутаміну	4 мМ	4 мМ	13 мМ	13 мМ	13 мМ	13 мМ
Рівні аспарагіну	20 мМ	20 мМ	20 мМ	12 мМ	12 мМ	8 мМ
Щільність посіву ( $\times 10^6/\text{мл}$ )	від 0,3 до 0,35					
Середовища для підживлення	Середовище 5 без глутаміну, 5% у День 7					
Дні культивування	12					
Зміна температури (37-31°C)	День 4	День 4	День 4	День 4	День 4	День 4

## Результати й висновки

Фігури 34, 35, 36, 37, 38, 39 і 40 показують ріст клітин анти-GDF-8, відсоток життєздатності клітин анти-GDF-8, рівні лактату, рівні амонію, рівні глутаміну, титр анти-GDF-8 і осмолярність,

відповідно, у ході всіх експериментів за різних експериментальних умов.

Серед усіх умов, що випробовувались, тільки Середовище 9, що містить 13мМ глутаміну і 20мМ аспарагіну, показало істотні негативні ефекти на ріст клітин й титр. Глутамін вичерпується у

всіх культурах приблизно у той самий час, незалежно від того, чи починається культура із 4мМ глутаміну, чи з 13мМ. Найвищий титр анти-GDF-8 отриманий у культурах, які містять 13мМ глутаміну і 12мМ аспарагіну. За всіх умов культивування відзначалося зменшення рівнів лактату і амонію в кінці культивування. Рівні амонію були найвищими в культурі, що містить 13мМ глутаміну і 20мМ аспарагіну.

Приклад 10. Вплив рівнів аспарагіну й цистеїну на зменшення рівнів лактату й амонію, що спостерігається, в клітинах анти-GDF-8, які культивуються у Середовищі 9.

У Прикладах 2, 5 і 6 було виявлено, що у культур, вирощених за умов низького рівня глутаміну, відзначається зменшення рівнів лактату і амонію наприкінці процесу культивування. Однак, у культур, вирощених в Середовищі 9 за умов відсутності низького рівня глутаміну, все одно відзначається зменшення рівнів лактату і амонію наприкінці процесу культивування. Цей ефект не

спостерігався в інших середовищах, таких як Середовище 1, в якому низький рівень глутаміну здається необхідним для зменшення рівнів лактату й амонію. Середовище 9 і Середовище 1 відрізняються за рівнями аспарагіну (20мМ у Середовищі 9 проти 11мМ сумарно у Середовищі 1 плюс підживлення) і кислотного цистину (1,5мМ у Середовищі 9 проти 0,95мМ у Середовищі 1). Цей приклад перевіряє, чи були ці два компоненти відповідальними за зменшення рівнів лактату й амонію, що спостерігається наприкінці культивування.

#### Матеріали й методи

Клітини анти-GDF-8 культивували в 1л біореакторах упродовж 12 днів. Клітини спочатку культивували при 37°C, а потім температуру змінили на 31°C у день 4 або день 5 при  $8-10 \times 10^6$ /мл. В Таблиці 17 перелічені різні експериментальні умови, що випробовувались. Зразки відбирали щодня й зберігали для аналізу титру за допомогою ВЕРХ Білка А.

Таблиця 17. Умови з аспарагіном і цистеїном, що випробовувались.

Середовища	Gln (мМ)	Asn (мМ)	Загальний Gln (мМ)	Загальний Asn (мМ)	Підживлення	
Середовище 1	13	5	29	11	Середовище 5, 30% сумарно	5 мМ Gln, день 4
Середовище 1	4	5	4	11	Середовище 5-Gln, 30% сумарно	
Серійні середовища (Середовище 9)	4	20	4	21	Середовище 5-Gln, 5% сумарно	день 7
Середовище 1 + Asn на 5 мМ + Цистеїн на 0.5 мМ	13	10	29	16	Середовище 5, 30% сумарно	5 мМ Gln, день 4
Серійні середовища (Середовище 9)	13	20	29	21	Середовище 5, 30% сумарно	5 мМ Gln, день 4

Примітка: Середовище 5-Gln = Середовище 5 без глутаміну.

#### Результати й висновки

Клітини анти-GDF-8, вирощені в Середовищі 9, демонстрували зменшені рівні лактату і амонію наприкінці процесу культивування, незалежно від того, чи починалися культури із 4мМ глутаміну, чи із 13мМ (див. Фігури 42 і 43). Навпаки, Середо-

вище 1 демонструвало зменшені рівні лактату і амонію наприкінці процесу культивування тільки у випадку, коли культури починалися із 4мМ глутаміну (див. Фігури 42 і 43). Додання надлишкового аспарагіну й цистину до Середовища 1, що містить 13мМ глутаміну, не призвело до зменшення

рівнів лактату й амонію наприкінці процесу культивування (див. Фігури 42 і 43).

У культурах, які показали зменшені рівні лактату і амонію наприкінці процесу культивування (Середовище 1 із 4мМ глутаміну, Середовище 9 із 4мМ глутаміну і Середовище 9 із 13мМ глутаміну), також спостерігалася нижча загальна осмолярність наприкінці процесу культивування (див. Фігуру 47).

Середовище 9 із 4мМ глутаміну продемонструвало найвищий титр анти-GDF-8, друге місце належало Середовищу 9 із підживленням 13мМ глутаміну в день 4 (див. Фігуру 46). Беручи до уваги ефект розведення підживленням, Середовище 9, що містить 4мМ глутаміну, мало титр анти-GDF-8, еквівалентний до Середовища 9, що містить 13мМ глутаміну.

Приклад 11. Вплив рівнів амінокислот й вітамінів на зменшення рівнів лактату й амонію, що спостерігається, в клітинах анти-GDF-8, що культивуються у Середовищі 9.

У Прикладі 10 випробовується, чи була різниця в рівнях аспарагіну й цистеїну між Середовищем 1 і Середовищем 9 причиною зменшення рівнів лактату й амонію, що спостерігається на-

прикінці процесу культивування в Середовищі 9, що не характеризувалося низьким рівнем глутаміну. Було встановлено, що ці фактори не відповідали за зменшення, що спостерігається. Середовище 1 і Середовище 9 також відрізняються за своїми концентраціями амінокислот й вітамінів. У цьому прикладі випробовується, чи відбувається це зменшення, що спостерігається, внаслідок різниці в концентраціях амінокислот і вітамінів між цими двома середовищами.

#### Матеріали й методи

Клітини анти-GDF-8 культивували в 1л біореакторах упродовж 12 днів. Клітини спочатку культивували при 37°C, а потім температуру змінили на 31°C у день 4 при  $8 \cdot 10^6$ /мл. В Таблиці 18 перелічені різні експериментальні умови, що випробовувались. Амінокислоти, вітаміни, гідрокортизон і путресцин, мікроелементи E (склад, перелічений в Таблиці 19) і залізо додавали до різних експериментальних умов Середовища 1, таким чином, щоб рівні цих компонентів дорівнювали рівням у Середовищі 9. Зразки відбирали щодня й зберігали для аналізу титру за допомогою ВЕРХ Білка А.

Таблиця 18. Умови з вітамінами і амінокислотами, що випробовувались.

Середовища	Gln (мМ)	Asn (мМ)	Підживлення	День 5	День 7	День 10	День 11
Середовище 1	13	5	Середовище 5 30% сумарно 5 мМ Gln, Середов день 4	8% ище 5	12% ще 5	8% ище 5	
Середовище 1+AA	13	15	Середовище 5 30% сумарно 5 мМ Gln, Середов день 4	8% ище 5	12% ще 5	8% ище 5	
Середовище 1+Vit, Г/П, E, Fe	13	5	Середовище 5 30% сумарно 5 мМ Gln, Середов день 4	8% ище 5	12% ще 5	8% ище 5	4г/л глюкоз и
Середовище 1+всі	13	15	Середовище 5 30% сумарно 5 мМ Gln, Середов день 4	8% ище 5	12% ще 5	8% ище 5	4г/л глюкоз и
Середовище 9 з 13 мМ Gln	13	20	Середовище 5 30% сумарно 5 мМ Gln, Середов день 4	8% ище 5	12% ще 5	8% ище 5	

Примітка: AA = Амінокислоти, Г/П: = 0.036 мг/мл гідрокортизону, 1.08 мг/мл путресцину·2HCl, E: Мікроелементи E.

Таблиця 19: Склад Мікроелементів Е.

Мікроелементи	мкг/л	нм
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	123.60	100.00
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.48	2.00
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.18	100.00
$\text{CrCl}_3$	7.92	50.00
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	49.94	200.00
$\text{GeO}_2$	0.21	2.00
$\text{KBr}$	0.24	2.00
$\text{KI}$	16.60	100.00
$\text{LiCl}$	0.08	2.00
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.90	100.00
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	142.03	500.00
$\text{NaF}$	0.08	2.00
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	1.17	10.00
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.63	10.00
$\text{RbCl}$	0.24	2.00
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.45	2.00
Натрію селеніт	34.58	200.00

## Результати й висновки

Всі умови, що випробовувались, показали зменшені рівні лактату й амонію наприкінці процесу культивування за винятком Середовища 1, яке містить додані амінокислоти, вказуючи на те, що збільшені рівні амінокислот в Середовищі 9 у порівнянні із Середовищем 1, ймовірно, не є причиною зменшення рівнів лактату й амонію (див. Фігури 49 і 50). Однак, Середовище 1, що містить додані вітаміни, гідрокортизон і путресцин, мікроелементи Е і залізо, показало нижчі рівні лактату й амонію наприкінці процесу культивування в порівнянні із Середовищем 1, що містить додані амінокислоти (див. Фігури 49 і 50). Це вказує на те, що ці компоненти можуть бути причиною зменшення, яке спостерігається в Середовищі 9.

Для культур, вирощених в Середовищі 1, що містить додані вітаміни, гідрокортизон і путресцин, мікроелементи Е і залізо, відзначались найнижчі рівні амонію протягом експерименту внаслідок нижчих сумарних кількостей аспарагіну й глутаміну в початкових середовищах (див. Фігуру 50).

Приклад 12. Вплив рівнів вітамінів, мікроелементів Е і заліза на зменшення рівнів лактату й

амонію, що спостерігається у клітинах анти-GDF-8, які культивуються у Середовищі 9.

У Прикладі 11 було встановлено, що збільшені рівні вітамінів, гідрокортизону й путресцину, мікроелементів Е і заліза в Середовищі 9 по відношенню до Середовища 1 могли б бути причиною зменшення рівнів лактату й амонію, що спостерігається наприкінці процесу культивування. У цьому випадку, ці компоненти випробовувались індивідуально й у комбінації з метою визначення, який з них є причиною зменшення, що спостерігається (якщо такий взагалі є).

## Матеріали й методи

Клітини анти-GDF-8 культивували в 1л біореакторах упродовж 12 днів. Клітини спочатку культивували при 37°C, а потім температуру змінили на 31°C у день 4 при  $8 \cdot 10^6$  клітин/мл, за винятком Середовища 1, що містить мікроелементи Е, для якого зміна відбувалася в день 4 при приблизно  $6 \cdot 10^6$  клітин/мл. В Таблиці 20 перелічені різні експериментальні умови, що випробовувались. Гідрокортизон і путресцин додавали до всіх умов Середовища 1 таким чином, що рівні цих компонентів дорівнювали рівням у Середовищі 9. Вітаміни, мікроелементи Е (склад, перелічений в Таблиці 19) і залізо додавали до різних експери-

ментальних умов Середовища 1 таким чином, що рівні цих компонентів дорівнювали рівням у Се-

редовищі 9. Зразки відбирали щодня й зберігали для аналізу титру за допомогою ВЕРХ Білка А.

Таблиця 20. Умови з амінокислотами й вітамінами, що випробовувались.

Середовища	Gln (mM)	Asn (mM)	Підживлення	Зміна темпл.	День 4	День 5	День 7	День 10
Середовище 1+Fe	13	15	Середовище 5 30% сумарно	день 4	5 mM Gln, день 4	8%	12%	8%
Середовище 1+E	13	15	Середовище 5 30% сумарно	день 4	5 mM Gln, день 4	8%	12%	8%
Середовище 1+Vit	13	15	Середовище 5 30% сумарно	день 4	5 mM Gln, день 4	8%	12%	8%
Середовище 1+Fe+E	13	15	Середовище 5 30% сумарно	день 4	5 mM Gln, день 4	8%	12%	8%
Середовище 1+Fe+Vit	13	15	Середовище 5 30% сумарно	день 4	5 mM Gln, день 4	8%	12%	8%
Середовище 1+E+Vit	13	15	Середовище 5 30% сумарно	день 4	5 mM Gln, день 4	8%	12%	8%
Середовище 9 з 13 mM Gln	13	20	Середовище 5 30% сумарно	день 4	5 mM Gln, день 4	8%	12%	8%

Примітка: Е: Мікроелементи Е.

#### Результати й висновки

Із всіх умов, що випробовувались, тільки Середовище 9, що містить 13mM глутаміну, і Середовище 1, що містить мікроелементи Е, показали зменшені рівні лактату й амонію наприкінці процесу культивування (див. Фігури 54 і 55). Необхідно відзначити, що зменшені рівні, які спостерігалися для Середовища 1, що містить мікроелементи Е, могли відзначатися внаслідок того, що зміна температури для цієї культури була проведена, коли цільність клітини становила приблизно  $6 \times 10^6$  клітин/мл.

Середовище 9, що містить 13mM глутаміну, показало вищий титр анти-GDF-8 ніж будь-яка композиція Середовища 1.

Приклад 13. Порівняння Середовищ 1, 3 і 9 щодо росту клітин й титру анти-GDF-8.

Цей експеримент був виконаний з метою визначення різниці росту клітин й титру анти-GDF-8, використовуючи Середовища 1, 3 і 9.

#### Матеріали й методи

Клітини анти-GDF-8 культивували в різних середовищах й за умов підживлення, як перелічено в Таблиці 21. Відповідна інформація щодо середовищ перелічена в Таблиці 22. Клітини вирощували в 1л біореакторах упродовж 12 днів і змінили температуру із 37°C на 31°C у день 4.

Таблиця 21. Умови щодо середовищ й підживлень, що випробовувались.

			Підживлення						
Середовища	Asn	Gln	День 3	День 4	День 5	День 6	День 7	День 10	День 11
Середовище 3	14 мМ	4 мМ	3.3 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln	10 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln
Середовище 3	14 мМ	4 мМ	3.3 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln	10 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln	3.3 %, Середовище 5-Gln
Середовище 1	14 мМ	4 мМ			8 %, Середовище 5-Gln		12 %, Середовище 5-Gln	8 %, Середовище 5-Gln	
Середовище 9	20 мМ	4 мМ				5 %, Середовище 5-Gln			

**Примітка:** Середовище 5-Gln - Середовище 5 без глутаміну.

Таблиця 22. Коротка інформація про середовища.

Середовища	Asn	Gln	Підживлення	АА (Початково) / (Сумарно)	Іон/сумарно АА
Середовище 3	14 мМ	4 мМ	34% Середовище 5-Gln	34 мМ/64 мМ	1.75
Середовище 9	20 мМ	4 мМ	5% Середовище 5-Gln	91.4 мМ/94.3 мМ	.72
Середовище 1	14 мМ	4 мМ	31,6 % Середовище 5-Gln	78 мМ/96.4 мМ	.74

**Примітка:** Середовище 5-Gln - Середовище 5 без глутаміну.

#### Результати й висновки

Клітини анти-GDF-8, що культивувались в Середовищі 9, показали найвищу щільність клітин й титр анти-GDF-8, у той час як клітини анти-GDF-8, що культивувались в Середовищі 3, показали найнижчу щільність клітин й титр анти-GDF-8 (див. Фігури 57 і 58). Той факт, що Середовище 9 демонструє кращі результати ніж Середовище 1 вказує на те, що краще забезпечити компоненти середовищ в початкових середовищах замість того, щоб постачати їх шляхом багаторазових підживлень. Додатково, той факт, що обидва Середовище 1 і Середовище 9 мають кращу продуктивність ніж Середовище 3, вказує на те, що забезпечення амінокислот у концентраціях, більших ніж приблизно 70мМ, забезпечує кращі результати ніж забезпечення амінокислот у концен-

траціях, менших ніж приблизно 70мМ. Нарешті, забезпечення амінокислот у концентраціях, більших ніж приблизно 70мМ у початкових середовищах призводить до отримання найвищих щільностей клітин і титрів (порівняйте Середовище 9 проти Середовища 1).

Приклад 14. Статистичний аналіз оптимальних сумарних рівнів глутаміну й аспарагіну в Середовищі 9 для клітинної культури анти-GDF-8 в біореакторах.

#### Матеріали й методи

Клітини анти-GDF-8 вирощувались в біореакторах, й температуру змінювали із 37°C на 31°C у дні, зазначені в Таблиці 23. Кінцеві титри підлягали Т-Тесту для визначення оптимального рівня глутаміну окремо й оптимального рівня сумарного комбінованого глутаміну й аспарагіну. В

Таблиці 23 підсумовані деякі доречні експериментальні умови й кінцеві результати для клітин

анти-GDF-8, вирощених у Середовищі 9.

Таблиця 23. Доречні експериментальні умови й кінцеві результати для клітин анти-GDF-8, вирощених у Середовищі 9.

Середовища	Gln (mM)	Asn (mM)	День зміни	Піджив-лення	Титр (мкг/мл)	Титр/1200	Сумар- ний Gln	Сумар- ний Asn	Сумар- ний Gln+Asn
Середовище 9	1	8	6	5 %, Середовище 5-Gln	615.2	0.51	1	9	10
Середовище 9	1	8	6	5 %, Середовище 5-Gln	857.1	0.71	4	9	13
Середовище 9	1	12	6	5 %, Середовище 5-Gln	947	0.79	1	13	14
Середовище 9	4	12	4	5 %, Середовище 5-Gln	1184	0.99	4	13	17
Середовище 9	4	20	4	5 %, Середовище 5-Gln	769.6	0.64	1	21	22
Середовище 9	4	8	5	5 %, Середовище 5-Gln	1262.6	1.05	13	9	22
Середовище 9	4	20	4	5 %, Середовище 5-Gln	1198	1.00	4	21	25
Середовище 9	4	20	4	5 %, Середовище 5-Gln	1321.1	1.10	4	21	25
Середовище 9	4	20	4	5 %, Середовище 5-Gln	1162.4	0.97	4	21	25
Середовище 9	13	20	4	5 %, Середовище 5-Gln	1436.6	1.20	4	21	25
Середовище 9	15	12	4	5 %, Середовище 5-Gln	1638.6	1.37	13	13	26
Середовище 9	13	12	4	5 %, Середовище 5-Gln	1606.7	1.34	13	13	26
Середовище 9	13	20	4	5 %, Середовище 5-Gln	1075.91	0.90	13	21	34
Середовище 9	13	20	4	5 %, Середовище 5-Gln	1058.4	0.88	13	21	34
Середовище 9	13	20	4	5 %, Середовище 5-Gln	1075.91	0.90	15	21	36

	103			89644	104				
Средовище 9	13	5	4	Asn, Gln, 5 %, Середовище 5-Gln	974.52	0.81	28.5	11	39.5
Средовище 9	13	20	4	Asn, Gln, 5 %, Середовище 5-Gln	831.81	0.69	28.5	26	54.5
Средовище 9	13	20	4	Середовище 5, 30% сумарно, 5 mM Gln	975.4	0.81	28.5	26	54.5
				день 4					
Средовище 9	13	20	4	Середовище 5, 30% сумарно, 5 mM Gln	973.5	0.81	28.5	26	54.5
				день 4					

Примітка: Середовище 5-Gln - Середовище 5 без глутаміну.

Результати й висновки

Фігура 59 показує екстрапольовані титри анти-GDF-8 для різних рівнів глутаміну окремо й сумарного комбінованого глутаміну й аспарагіну. Таблиця 24 показує результати Т-Тесту, що порівнює нормалізований титр рівнів глутаміну від 2 до 15мМ і рівнів глутаміну поза цим діапазоном. В Таблиці 25 показані результати Т-Тесту, що порівнює нормалізований титр комбінованих рівнів глутаміну й аспарагіну від 16 до 36мМ і комбінованих рівнів глутаміну й аспарагіну поза цим діапазоном.

Обидва результати Т-Тесту вказали на істотну різницю в титрах анти-GDF-8 між двома групами, які порівнювались. Культури, вирощені в Середовищі 9, що містить від 2 до 15мМ глутаміну і від 16 до 36мМ комбінованого глутаміну і аспарагіну, показали вищі титри анти-GDF-8 ніж культури, вирощені в середовищах із рівнем глутаміну і комбінованими рівнями глутаміну і аспарагіну, які потрапили поза межі цього діапазону. У всіх експериментах рівні аспарагіну були більшими ніж 9мМ.

Таблиця 24. Результати Т-Тесту, що порівнюють нормалізований титр умов

2мМ<Gln<15 мМ проти Gln>15 мМ, Gln<2 мМ.

Нормалізований титр	Gln>15, Gln<2	2<Gln<15
Середнє значення	0.724649917	1.033147493
Дисперсія	0.013326655	0.036834109
Спостереження	7	12
Об'єднана дисперсія	0.028537361	
Гіпотетична середня різниця	0	
df	17	
t стат	-3.839791986	
P (T <=t) односторонній критерій	0.000656219	
t критичний односторонній критерій	1.739606432	
P (T <=t) критерій на основі подвійної вибірки	0.001312438	
t критичний критерій на основі подвійної вибірки	2.109818524	



Таблиця 25. Результати Т-Тесту, що порівнюють нормалізований титр умов

16 mM&lt;Gln+Asn &lt;36 mM проти Gln+Asn&gt;36 mM, Gln+Asn &lt; 16 mM.

Нормалізований титр	Asn+Gln> 36, Asn+Gln <16	16 <Asn+Gln <36
Середнє значення	0.735066584	1.027071104
Дисперсія	0.012061148	0.041504987
Спостереження	7	12
Об'єднана дисперсія	0.031113044	
Гіпотетична середня різниця	0	
df	17	
t стат	-3.480816823	
P (T <=t) односторонній критерій	0.001430281	
t критичний односторонній критерій	1.739606432	
P (T <=t) критерій на основі подвійної вибірки	0.002860561	
t критичний критерій на основі подвійної вибірки	2.109818524	

Приклад 15. Вплив середовища на клітинну культуру.

Цей приклад досліджував продуктивність трьох змін середовища клітинної культури в проміжному масштабі, використовуючи культури посіву високої щільності. Всі випробовувані середовища, як очікували, показали покращення у порівнянні з середовищем Фази 1 (Середовище 10, що підживлюється середовищами для підживлення Середовища 11), базуючись на даних дрібномасштабного біореактора.

Матеріали й методи

Клітини CHO, що експресують гуманізоване моноклональне антитіло IgG1 пептиду анти-Абета, ("клітини анти-Абета"), випробовувались в різних середовищах, як показано в Таблиці 26 (див. Basi et al., Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide, WO02/46237). Нижня точка встановлення рН становила 7,0, що

контролювалося за допомогою 0,95M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+0,05M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, за винятком Фази 1, яку контролювали за допомогою розчину, що містить 0,58M натрію бікарбонату і 0,71M натрію карбонату. Розчинений кисень контролювали на 30%, шляхом барботації, за потребою, повітрям, швидкість перемішування становила 60 обертів на хвилину, а середовище для підживлення представляло собою Середовище 5 (з або без глутаміну, як зазначено). Всі культури вирощувались в 130л масштабі, за винятком 03P49B501, що вирощувалась в 500л масштабі. У підсумку, Середовище 1 збагачене всіма поживними речовинами, без врахування відносних норм поглинання, у той час як Середовище 12 було збалансоване за рахунок видалення очевидного непотрібних поживних речовин з нераціонально збагаченої версії. Склад Середовищ 10, 11 і 12 перелічений в Таблиці 27.

Таблиця 26. Початкове середовище, кількості підживлень й джерела посіву для експериментальних операцій.

Серія №	Опис	Початкове середовище	Кількість підживлень	Підживлювали Gln?	Джерело посіву	Щільність посіву (життєзд/мл)
1	Фаза 1	Середовище 10	38% *	Так	Хвильові мішки	0.2 x 10 <sup>6</sup>
2	Збагачене середовище,	Середовище 1	16%	Так	Хвильові мішки	0.2 x 10 <sup>6</sup>

107		89644		108		
	високий Gln (1)					
3	Збагачене серед, високий Gln (2)	Середовище 1	16%	Так	Хвильові мішки	$0.2 \times 10^6$
4	Збагачене серед, нижчий Gln	Середовище 1	15%	Ні	Хвильові мішки	$0.2 \times 10^6$
5	Збалансоване серед, низький Gln (1)	Середовище 12	10%	Ні	Хвильові мішки	$0.2 \times 10^6$
6	Збаланс.серед, низький Gln (2)	Середовище 12	9%	Ні	Хвильові мішки	$0.2 \times 10^6$
7	Збаланс.серед, низький Gln, щільний посів	Середовище 12	5%	Ні	Біореактор високої щільності	$2.0 \times 10^6$

\*процес Фази 1 підживлювали Середовищем 12, що є не настільки збагаченим як Середовище 5.

Таблиця 27. Склад Середовищ 10, 11 і 12.

	Середовище 10		Середовище 11		Середовище 12	
Амінокислоти	мг/л	мМ	мг/л	мМ	мг/л	мМ
аланін	24.87	0.28	142.48	1.60	17.80	0.20
аргінін	423.43	2.43	1528.84	8.79	696.00	4.00
аспарагін·H <sub>2</sub> O	173.90	1.16	1080.60	7.20	1500.00	10.00
аспарагінова кислота	52.72	0.40	532.40	4.00	219.45	1.65
цистеїн·HCl·H <sub>2</sub> O	70.01	0.40			70.40	0.40
цистеїн·2HCl	62.09	0.20	470.00	1.50	312.50	1.00
глутамінова кислота	41.08	0.28	235.38	1.60		
натрію глутамат					33.80	0.20
глутамін	1162.40	7.96	6000.00	41.10	584.00	4.00
гліцин	35.92	0.48	120.07	1.60	115.50	1.54
гістидин·HCl·H <sub>2</sub> O	75.27	0.36	588.32	2.80	369.60	1.76
ізолейцин	151.90	1.16	944.52	7.21	370.73	2.83
лейцин	172.69	1.32	1360.75	10.39	615.70	4.70

109

89644

110

лзвн·HCl	218.38	1.20	1456.80	8.00	946.40	5.20
метіонін	53.55	0.36	477.06	3.20	387.40	2.60
фенілаланін	98.81	0.60	660.36	4.00	363.00	2.20
пролін	96.40	0.84	552.31	4.80	471.50	4.10
серин	273.07	2.60	1264.70	12.04	903.00	8.60
теонін	132.81	1.12	762.02	6.40	380.80	3.20
триптофан	28.99	0.14	260.94	1.28	212.16	1.04
прозин·2Na·2H <sub>2</sub> O	145.10	0.56	832.62	3.19	456.75	1.75
вчлін	131.17	1.12	749.21	6.40	468.00	4.00
<b>Вітаміни</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мкМ</b>
біотин	0.36	1.49	3.28	13.45	2.68	11.00
кільцію пантотенат	4.03	8.47	36.02	75.67	21.93	46.06
холінхлорид	16.11	115.92	143.28	1030	116.76	840.00
фолієва кислота	4.76	10.80	42.43	96.22	25.93	58.80
інозит	22.64	125.79	201.71	1120	163.98	911.00
нікотинамід	3.61	29.62	32.02	262.44	26.23	215.00
придоксаль·HCl	1.99	9.83			2.03	10.00
придоксин·HCl	1.67	8.10	32.82	159.31	18.13	88.00
рибофлавін	0.40	1.06	3.60	9.58	0.41	1.10
тіамін·HCl	3.92	11.64	35.22	104.51	39.43	117.00
вітамін B12	1.34	0.99	11.21	8.27	10.57	7.80
<b>Неорганічні солі</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>
CaCl <sub>2</sub>	115.78	1.04	113.27	1.02	116.55	1.05
KCl	310.94	4.17			312.90	4.19
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			1640.00	12.06		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70.81	0.50			56.60	0.40
NaCl	3704.96	63.44				
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	114.53	0.83			645.84	4.68
MgSO <sub>4</sub>	48.70	0.41			138.00	1.15
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.60	0.03	170.00	0.69		
MgCl <sub>2</sub>	28.53	0.30			28.50	0.30

111

89644

112

$\text{NaHCO}_3$	1220.00	14.52			2000.00	23.81
<b>Мікроелементи</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нм</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нм</b>	<b>мкг/л</b>	<b>нм</b>
Натрію селеніт	7.00	40.49	40.00	231.35	53.65	310.27
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	49.86	123.42			50.00	123.76
$\text{CaSO}_4$	0.97	6.06	3.44	21.51	10.00	62.50
$\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	7.49	30.00	7.49	30.00	49.94	200.00
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1542	5549	2534	9115	3366	12000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1383	4821	2704	9421	2640	9198
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.17	1.01	0.17	1.01	16.90	100.00
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	140	492.84	140.00	492.84	142.03	500.00
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.24	1.00	1.24	1.00	123.60	100.00
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0.65	5.56	0.65	5.56	1.17	10.00
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.13	0.49	0.13	0.49	2.63	10.00
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.12	0.53	0.12	0.53	0.45	2.00
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			1.20	4.97	0.48	2.00
$\text{AgNO}_3$			0.17	1.00		
$\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$			2.55	9.98		
KBr			.12	1.01	0.24	2.00
$\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$			2.28	9.99		
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			2.38	10.00		
$\text{CrCl}_3$			0.32	2.02	7.92	50.00
NaF			4.20	100.02	0.08	2.00
$\text{GeO}_2$			0.53	5.07	0.21	2.00
KI			0.17	1.02	16.60	100
RbCl			1.21	10.01	0.24	2.00
$\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$			3.22	9.99		
$\text{H}_3\text{BO}_3$					6.18	100.00
LiCl					0.08	2.00
<b>Інші компоненти</b>	<b>мкг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мкг/л</b>	<b>мкМ</b>	<b>мкг/л</b>	<b>мкМ</b>
Гідрокортизон	86.40	.24	288.00	0.79	360.00	0.99
Путресцин-2HCl	2480	15.39	8000	49.66	10000	62.07

лінолева кислота	56.69	0.20	336.25	1.20	290.00	1.04
тіоктова кислота	141.71	0.69	840.63	4.08	716.00	3.48
<b>Інші компоненти</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>	<b>мг/л</b>	<b>мМ</b>
D-Глюкоза (Декстроза)	11042.24	61.35	43005.99	238.92	15000.00	83.33
ПВА	2520.00		2400.00		2560.00	
Nucellin™	14.00		80.00		50.00	
Натрію піруват	54.85	0.50			55.00	0.50

#### Результати й висновки

Зміни середовищ призводили до стійкого покращення упродовж цих експериментів. З точки зору росту, життєздатності клітин, зменшення рівнів лактату, зменшення рівнів амонію і титру, зменшені рівні глутаміну були кращими ніж підвищені (див. Фігури 60-64), а збалансоване (серійне) середовище було кращим ніж збагачене середовище (Середовище 1, див. Фігури 60-64). Культури, що розпочиналися з інокуляції високої щільності показали більш високий кінцевий титр, ніж культури, що розпочиналися з матеріалів для інокуляції нижчої щільності (див. Фігуру 64).

На відміну від того, що спостерігалось в дрібномасштабних біореакторах, перше середовище (Середовище 1 з високим Gln) призводило до утворення більше низьких титрів ніж у випадку оригінального процесу (див. Фігуру 64). Також не відзначалося жодного зсуву в поглинанні лактату після температурної зміни (див. Фігуру 62). Це свідчить, що може існувати деяка чутливість щодо масштабу у випадку цього середовища. Цей висновок підтримується маломасштабними (2L) паралельними операціями, які були здійснені разом із цими експериментами проміжного масштабу (дані не показані). Більш пізні композиції середовищ, що містять менше глутаміну не були чутливими до масштабу, принаймні в цих експериментах (див. Фігури 60-65). Дубльовані процеси (Серії 2 і 3 та Серії 5 і 6) показують дуже гарну відтворюваність від операції до операції (див. Фігури 60-65), збільшуючи довірчий інтервал для всіх даних, зібраних у цій кампанії.

Приклад 16. Виробництво TNFR-Ig з використанням Середовища 9.

#### Матеріали й методи

Клітини CHO, що експресують димерний злитий білок, який складається з позаклітинної зв'язуючої ліганд частини людського 75-кілодальтонного (p75) рецептору фактора некрозу пухлини (TNFR), зв'язаної із частиною Fc IgG1 ("клітини TNFR-Ig"), були посіяні при високій щільності із перфузійного біореактора й розведені до концентрації  $3 \times 10^6$  життєздатних клітин/мл у

Середовищі 9 упродовж етапу виробничого біореактора.

#### Результати й висновки

Фігури 66, 67, 68, 69, 70, 71 і 72 показують ріст клітин, життєздатність клітин, залишкову глюкозу, рівні глутаміну, концентрацію лактату, концентрацію амонію і відносний титр продукту, відповідно. У діапазоні незначних модифікацій до процесу, всі умови призвели до гарного росту клітин, високої життєздатності клітин і високого сумарного кінцевого титру.

Для всіх умов цього експерименту, інгібіторний побічний продукт метаболізму лактат або споживався, або його концентрація зберігалась на одному рівні, що свідчило про те, що виробництво лактату припинилося. Подібним чином для інгібіторного метаболіту амонію рівні спочатку підвищувалися, але в певний час після зміни температури, амоній починав споживатися клітинами. У цьому Прикладі, клітинні культури TNFR-Ig підлягали дії хімічних індуктантів натрію бутирату і HMBА.

Приклад 17. Порівняння умов культивування великого і малого масштабу

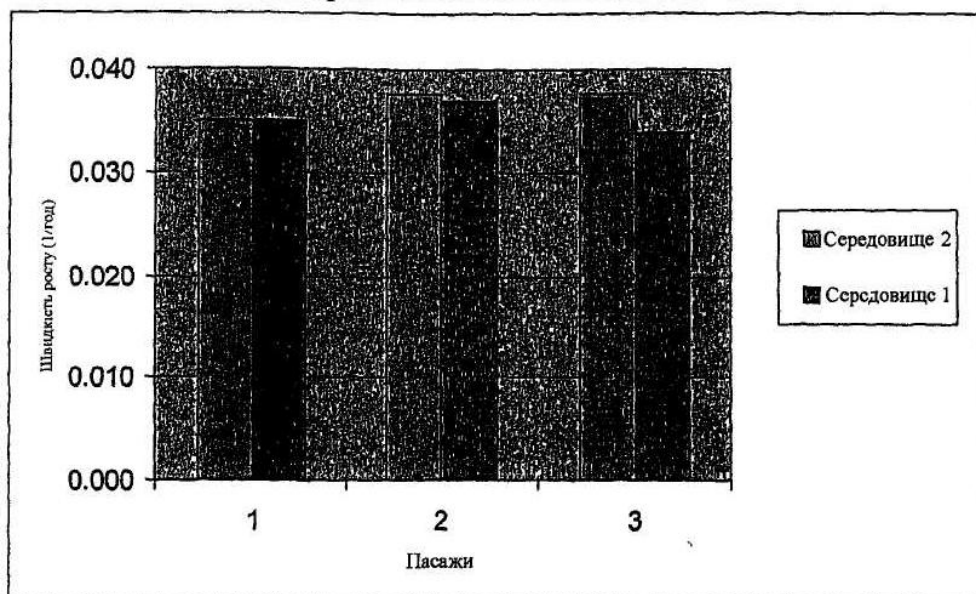
#### Матеріали й методи

З метою визначення, чи впливав обсяг культури на релевантні характеристики культури, клітини анти-GDF-8 вирощували або в невеликих 1-літрових біореакторах, або у великомасштабних 6000-літрових біореакторах. Клітини вирощували при 37°C і температуру змінювали на 31°C у день 4.

#### Результати й висновки

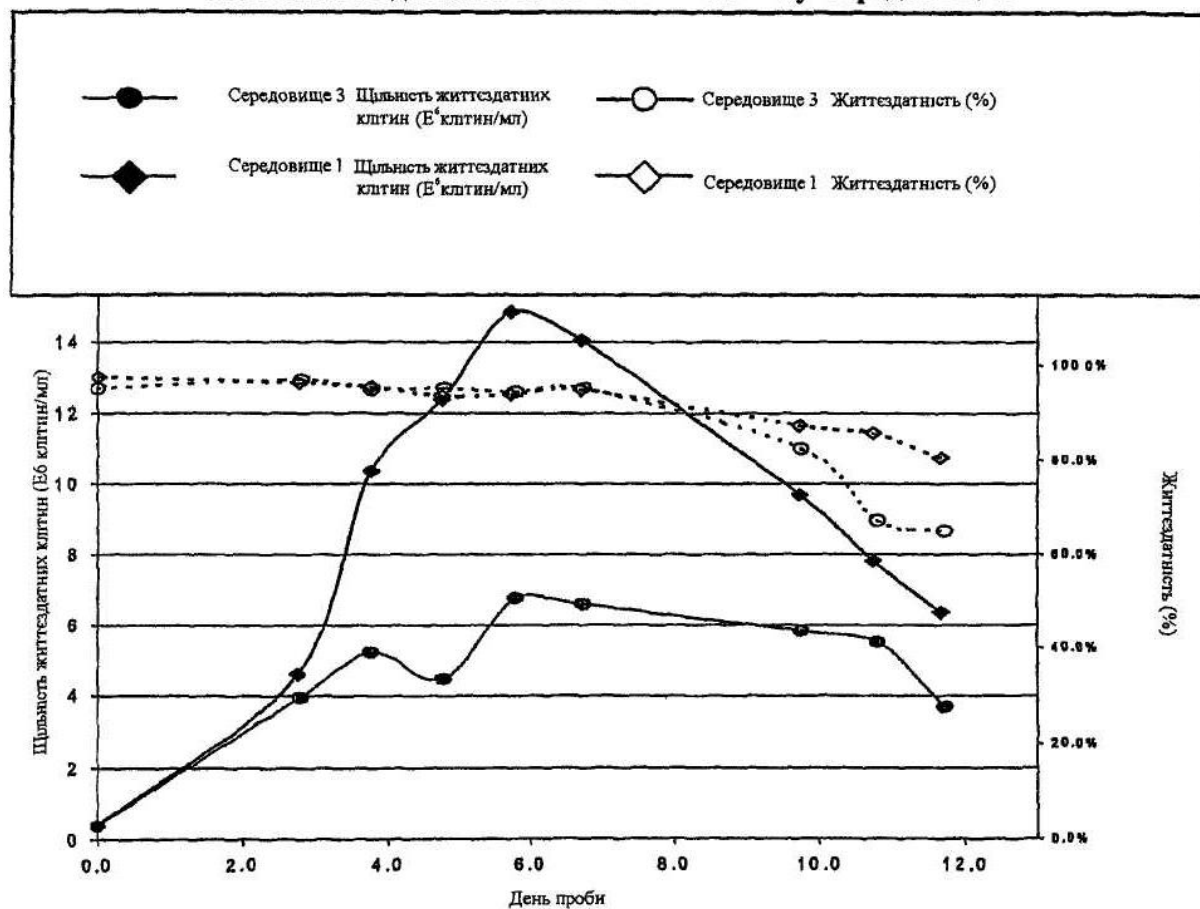
Як можна помітити на Фігурах 73, 74, 75 і 76 (які показують щільність клітин, титр, рівні лактату й рівні амонію, відповідно), не спостерігалось жодних релевантних розходжень між 6000-літровими великомасштабними й 1-літровими невеликими культурами щодо цих характеристик. І рівні лактату, і рівні амонію почали зменшуватися після зміни температури в день 4. Цей приклад демонструє, що обсяг культури не впливає на щільність клітин, життєздатність клітин, рівні лактату й рівні амонію у випадку, коли для культур створені однакові умови росту.

**Порівняння Середовища 1 і Середовища 2 у колбах для струшування з використанням клітин анти-GDF-8**



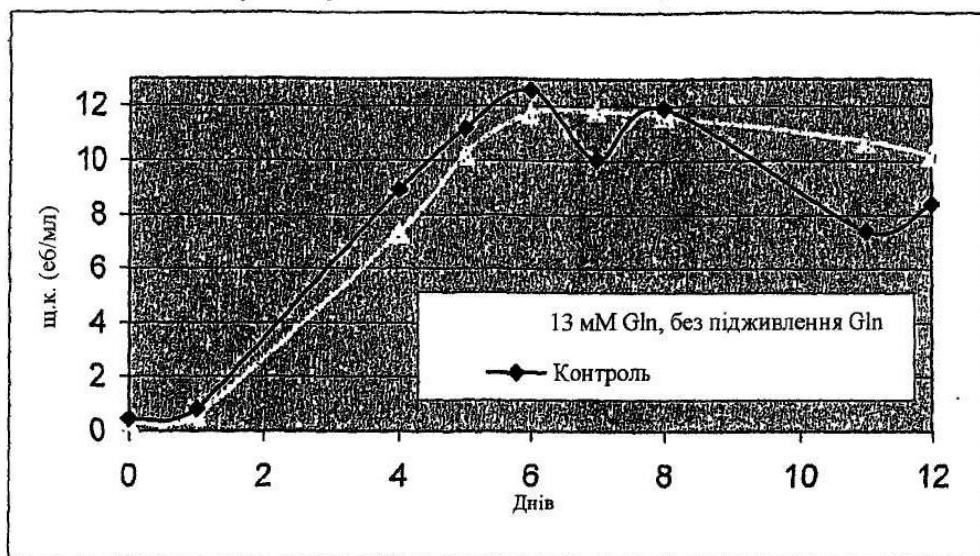
**ФІГ. 1**

**Ріст і життєздатність клітин анти-GDF-8 у Середовищі 1**



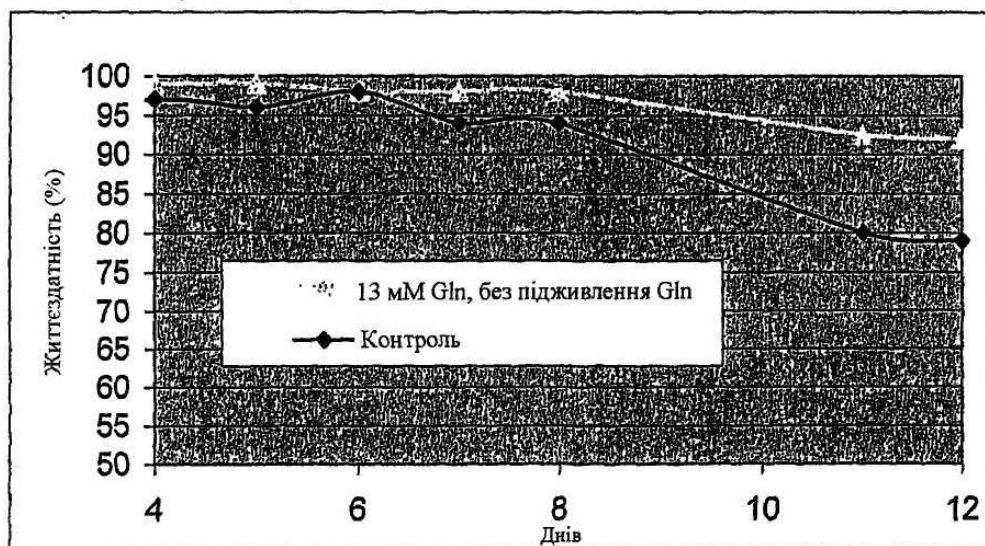
**ФІГ. 2**

Ріст клітин клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном



ФІГ. 3

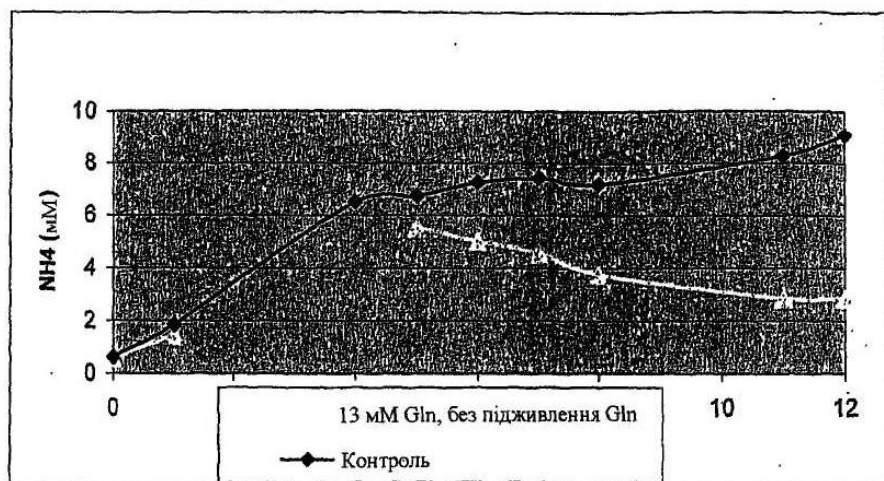
Життєздатність клітин клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном



ФІГ. 4

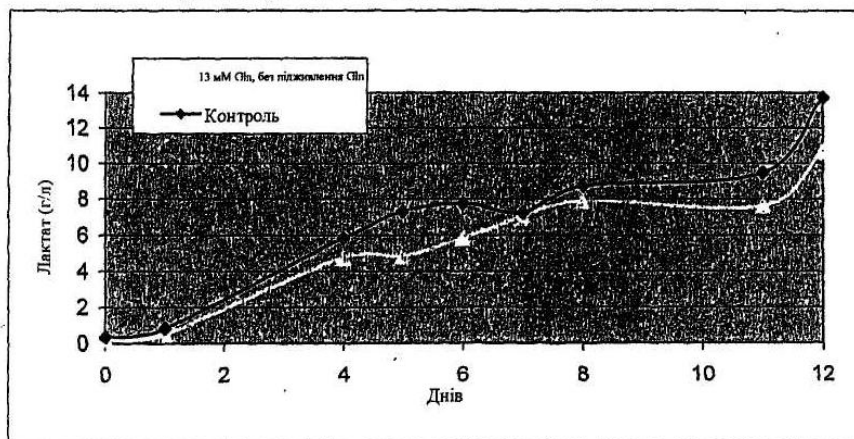


Рівні амонію клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном



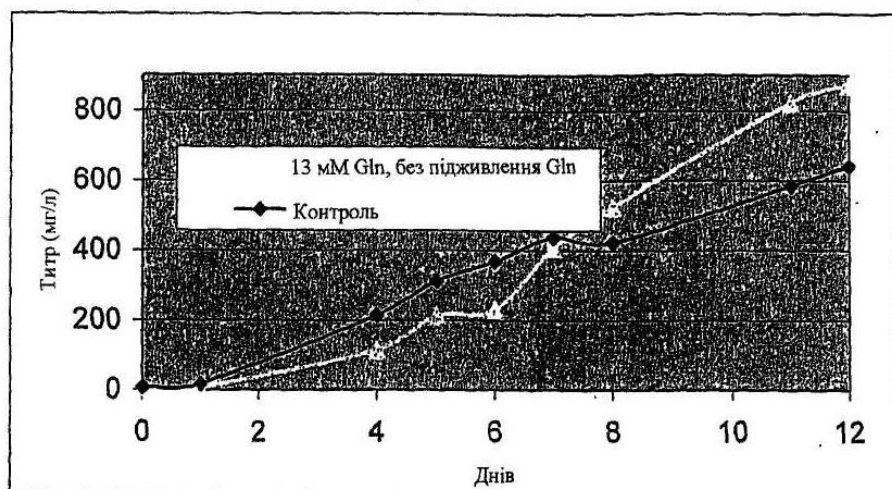
ФІГ. 5

Рівні лактату клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном



ФІГ. 6

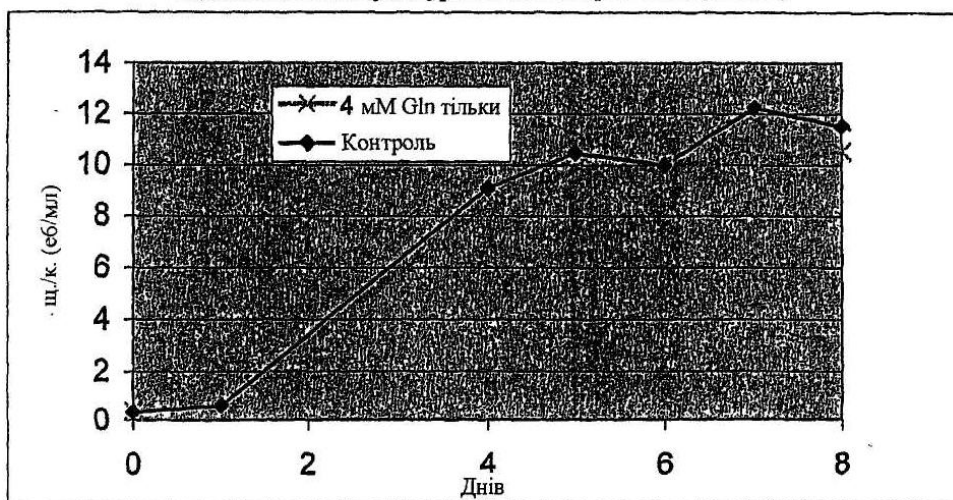
Титр анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах культивування без підживлення глутаміном



ФІГ. 7

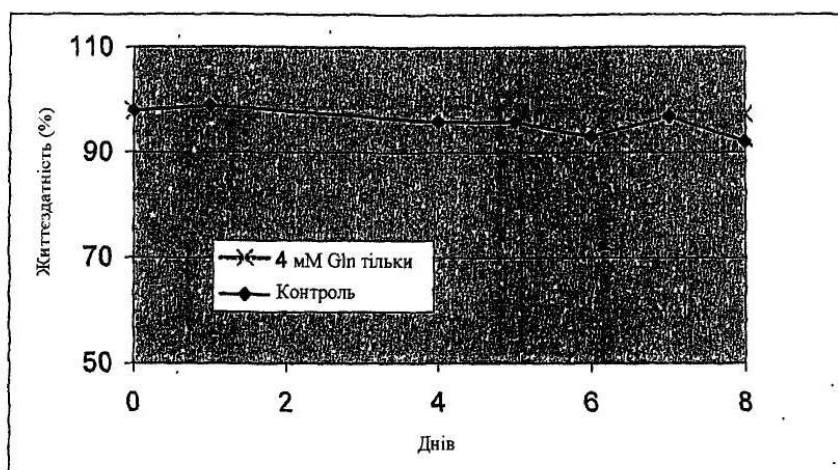


Щільність клітин клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну



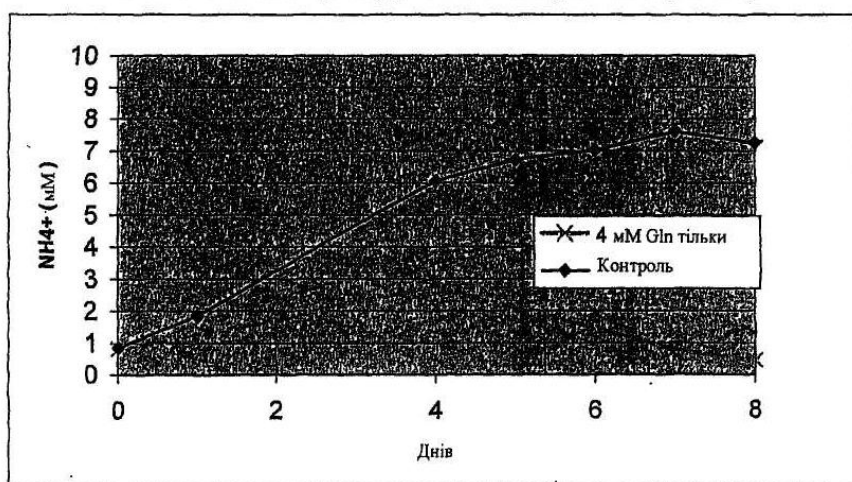
ФІГ. 8

Життєздатність клітин клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну



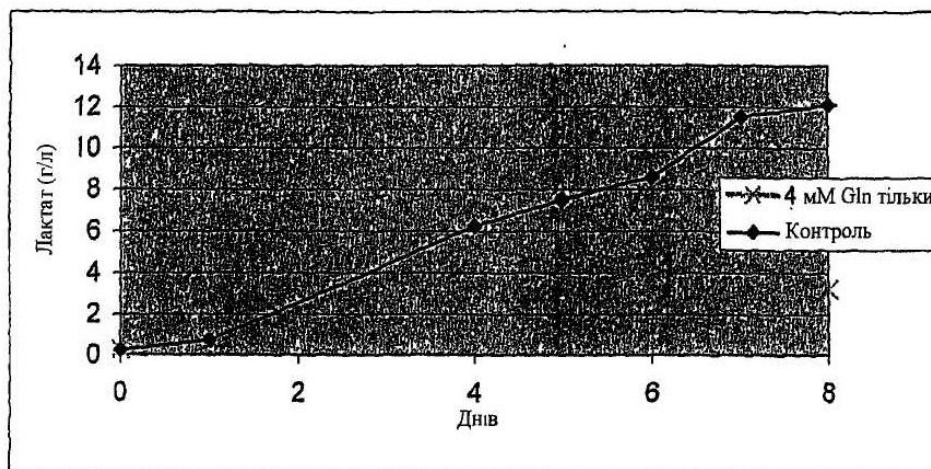
ФІГ. 9

Рівні амонію клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну



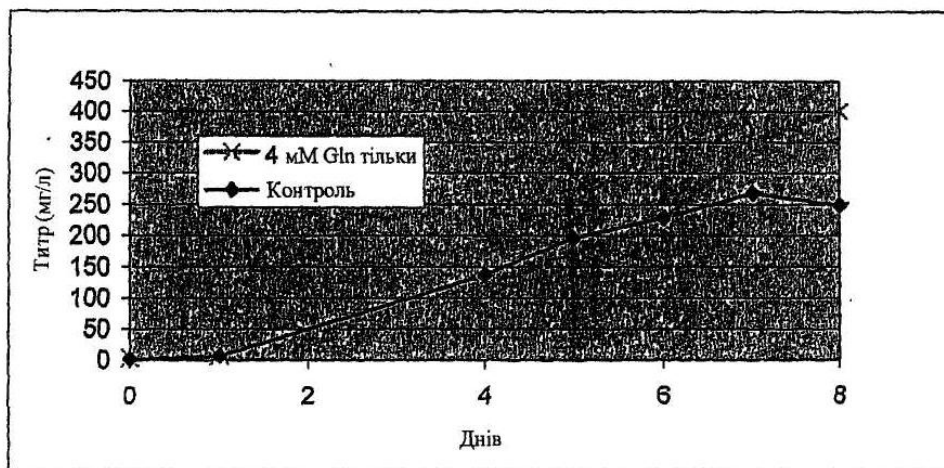
ФІГ. 10

Рівні лактату клітинних культур анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну



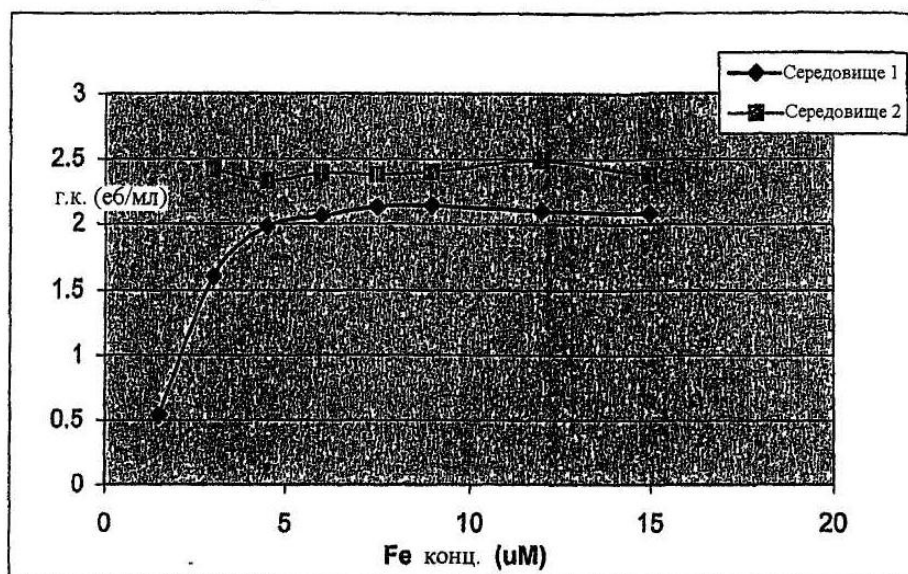
ФІГ. 11

Титр анти-GDF-8 у контрольних умовах й умовах підживлюваної культури з низьким рівнем глутаміну



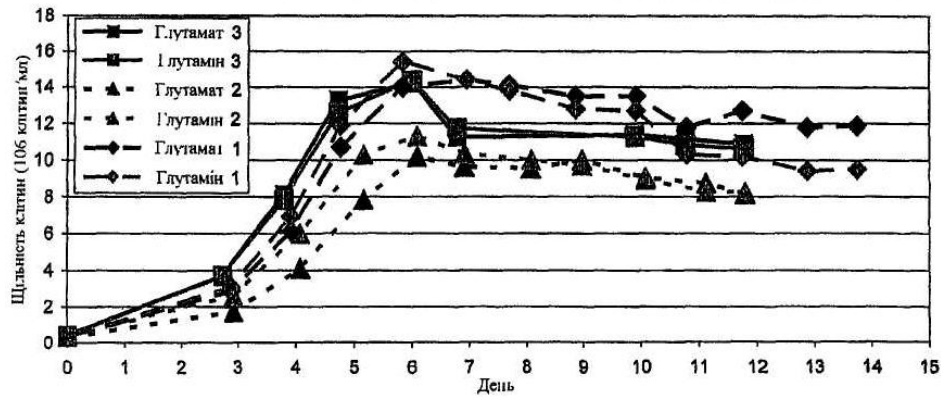
ФІГ. 12

Відповідь на дози заліза клітин анти-GDF-8 у Середовищі 1 і Середовищі 2



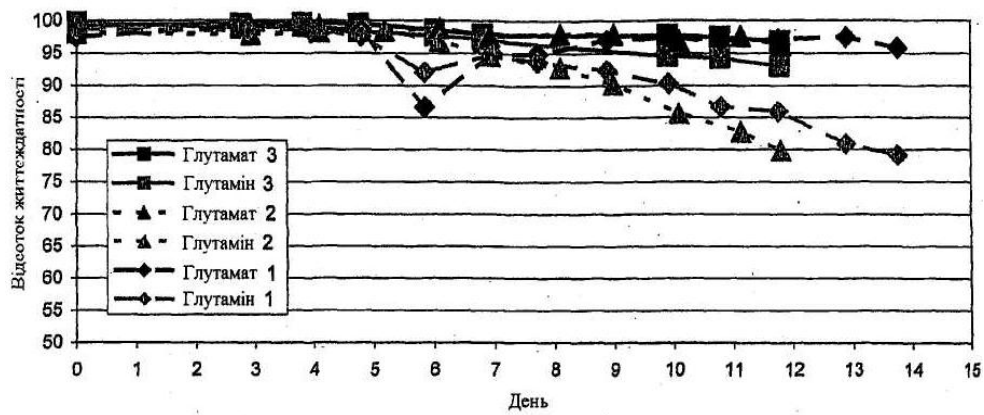
ФІГ. 13

## Щільність клітин культур з підживленням глутаматом і глутаміном



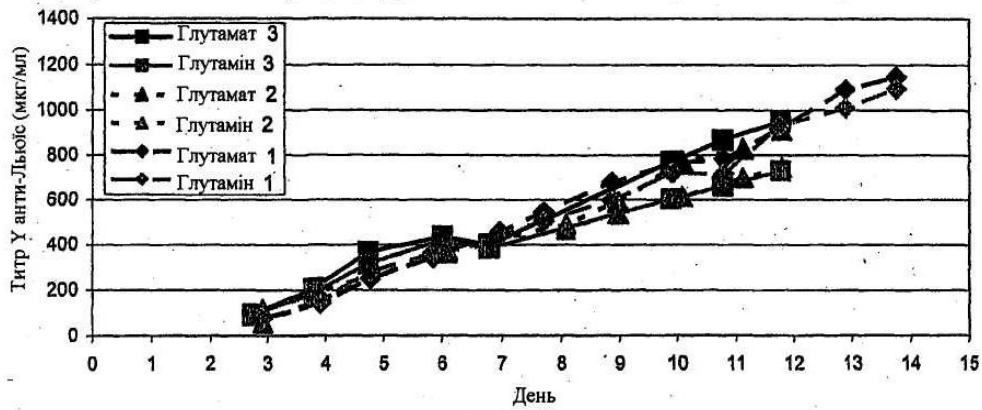
ФІГ. 14

## Життєздатність клітин культур з підживленням глутаматом і глутаміном



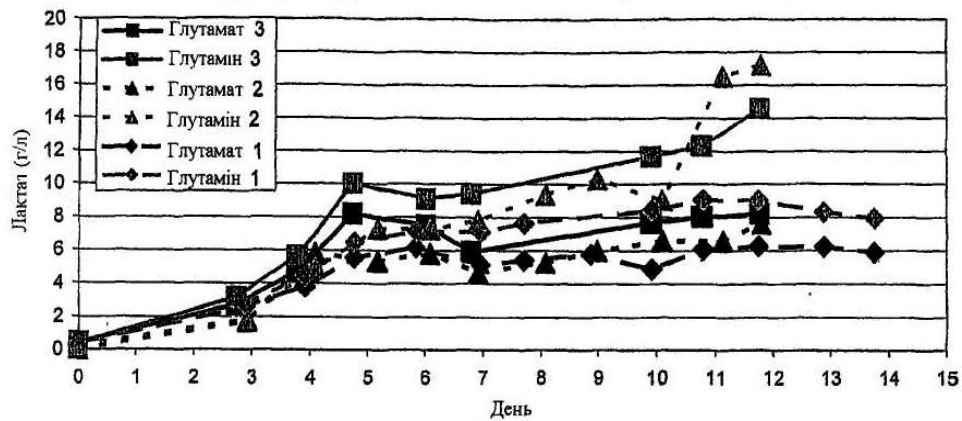
ФІГ. 15

## Титр анти-Льюїс Y у культурах з підживленням глутаматом і глутаміном



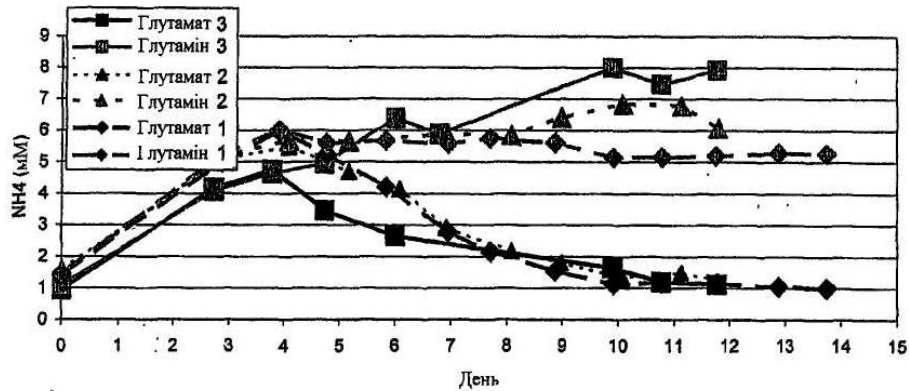
ФІГ. 16

## Рівні лактату у культурах з підживленням глутаматом і глутаміном



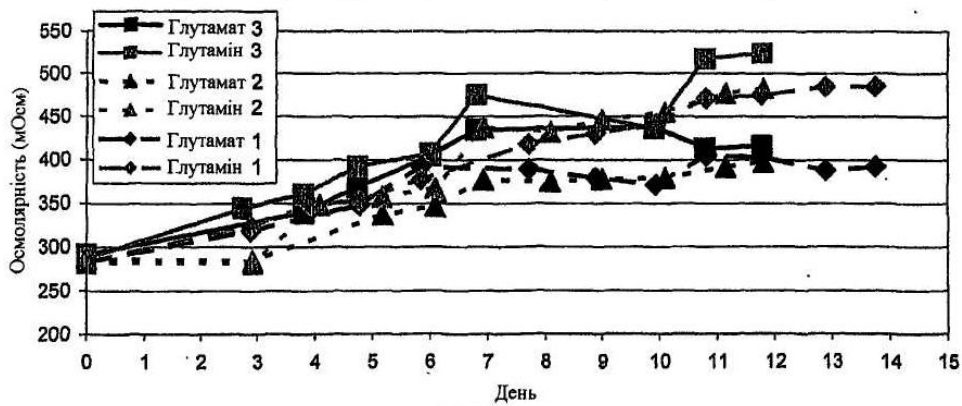
ФІГ. 17

## Рівні амонію у культурах з підживленням глутаматом і глутаміном



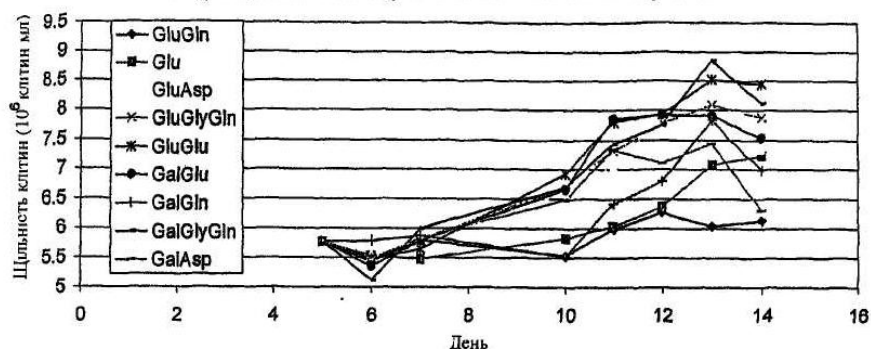
ФІГ. 18

## Осмолярність культур з підживленням глутаматом і глутаміном



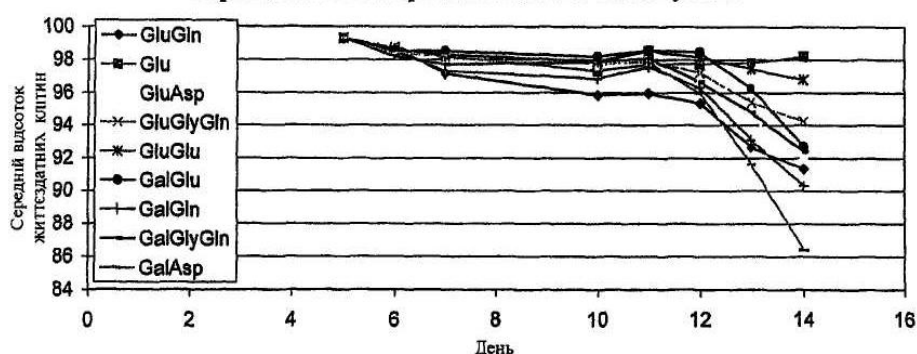
ФІГ. 19

Щільність клітин. Кожен графік – це середнє із двох колб для струшування, вирощених з використанням тих самих умов



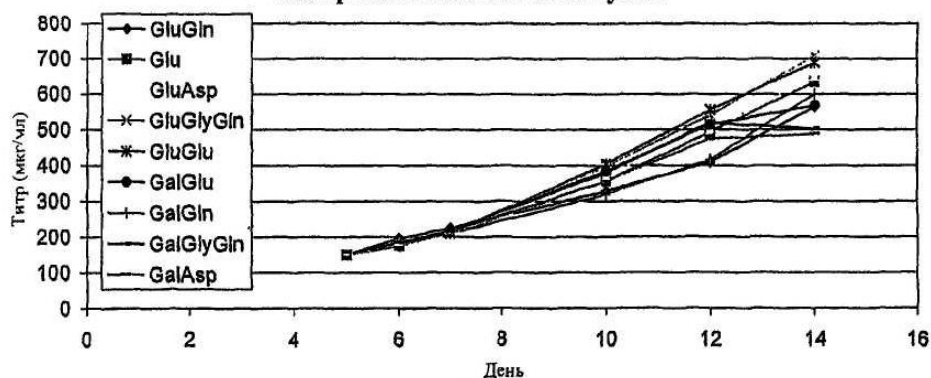
ФІГ. 20

Життєздатність клітин. Кожен графік – це середнє із двох колб для струшування, вирощених з використанням тих самих умов.



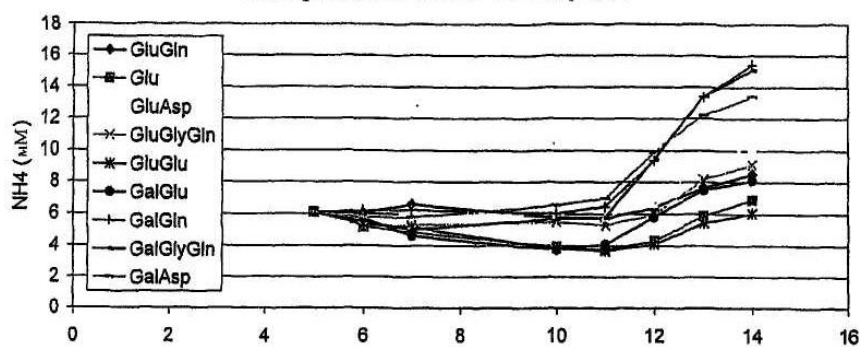
ФІГ. 21

Середній титр. Кожен графік – це середнє із двох колб для струшування, вирощених з використанням тих самих умов



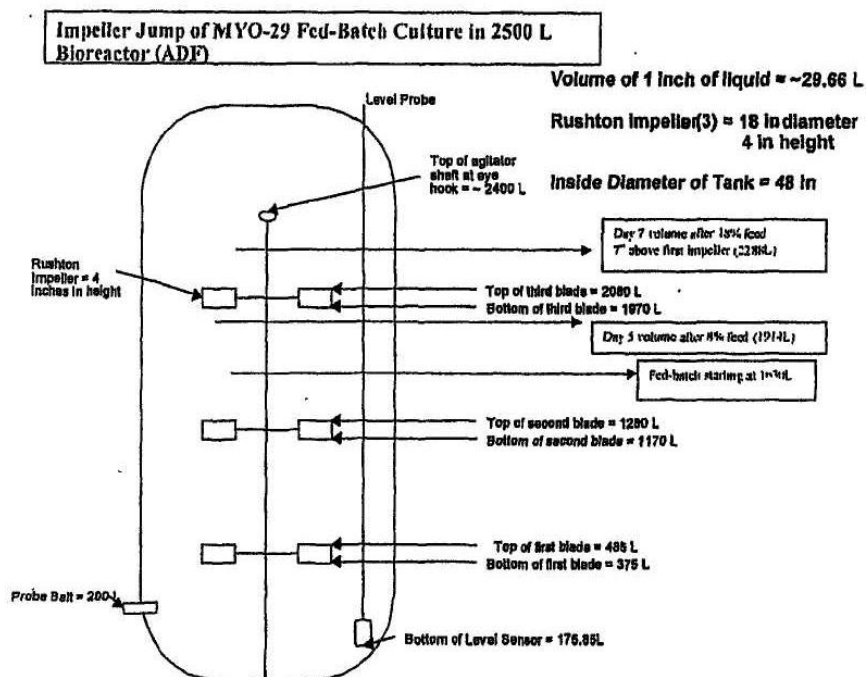
ФІГ. 22

Рівні амонію. Кожен графік – це середнє із двох колб для струшування, вирощених з використанням тих самих умов



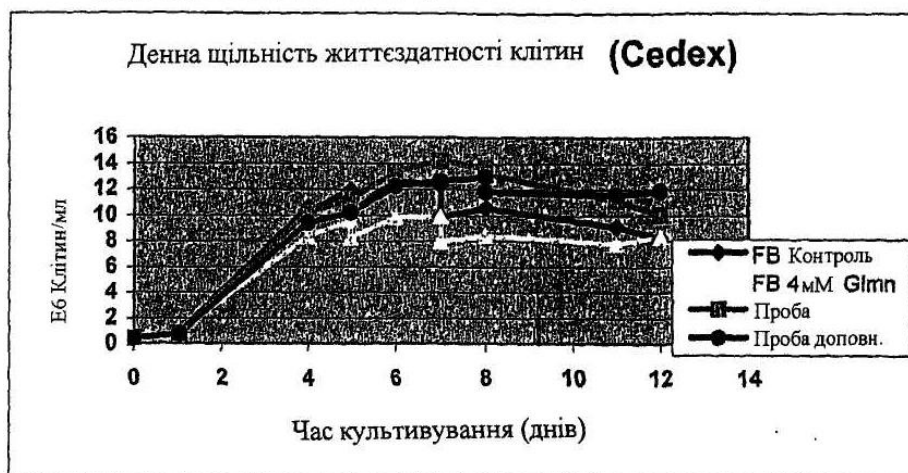
ФІГ. 23

# Лопастний пристрій, що використовується у серійно-підживлюваних культурах



ФІГ. 24

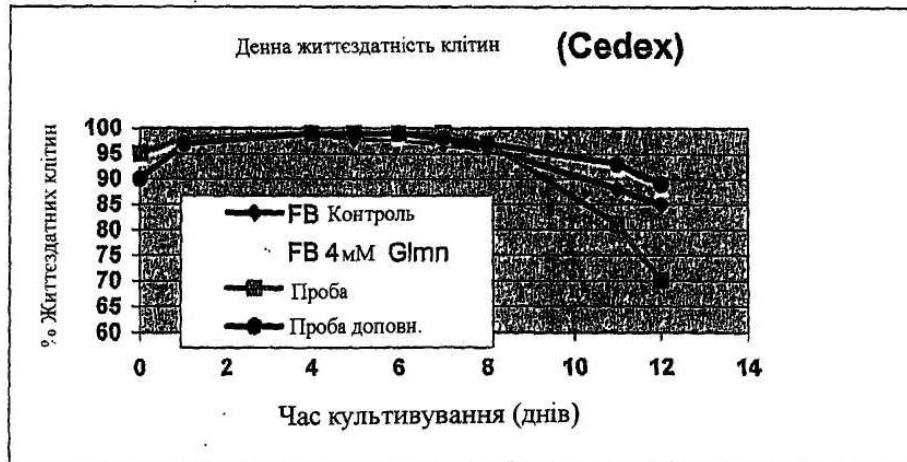
Ріст клітин анти-GDF-8 за різних експериментальних умов



ФІГ. 25

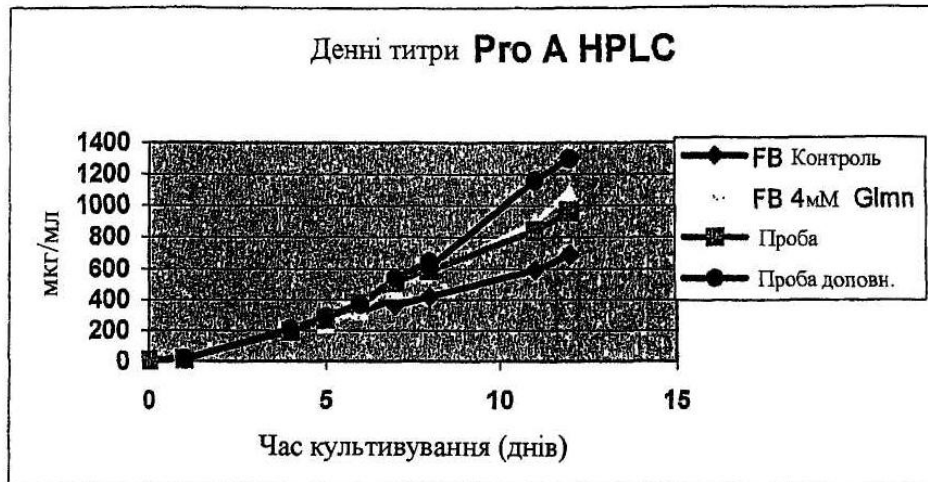


## Життєздатність клітин анти-GDF-8 за різних експериментальних умов



ФІГ. 26

## Титр анти-GDF-8 за різних експериментальних умов



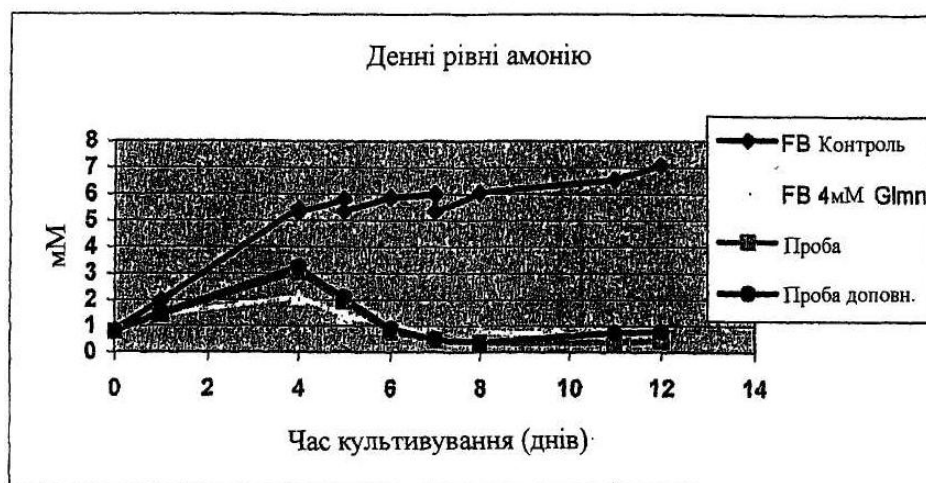
ФІГ. 27

## Рівні лактату культур анти-GDF-8 за різних експериментальних умов



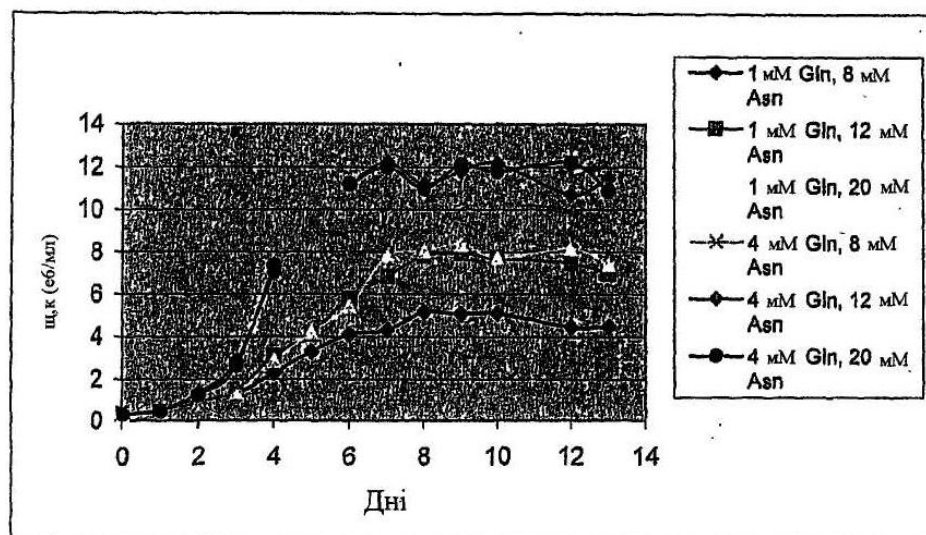
ФІГ. 28

Рівні амонію культур анти-GDF-8 за різних експериментальних умов



ФІГ. 29

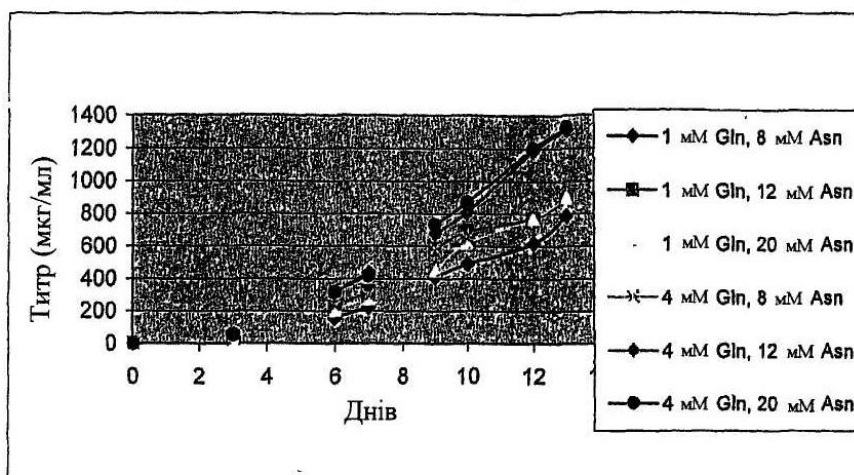
Ріст клітин анти-GDF-8 за різних експериментальних умов



ФІГ. 30

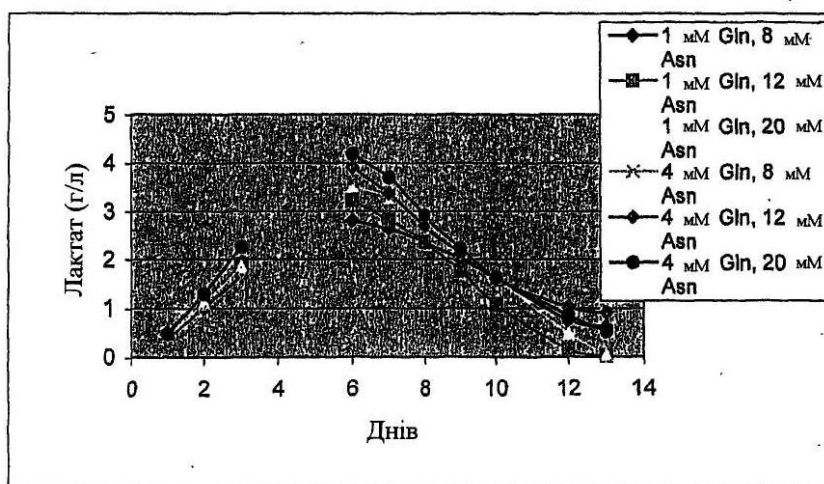


## Титр анти-GDF-8 за різних експериментальних умов



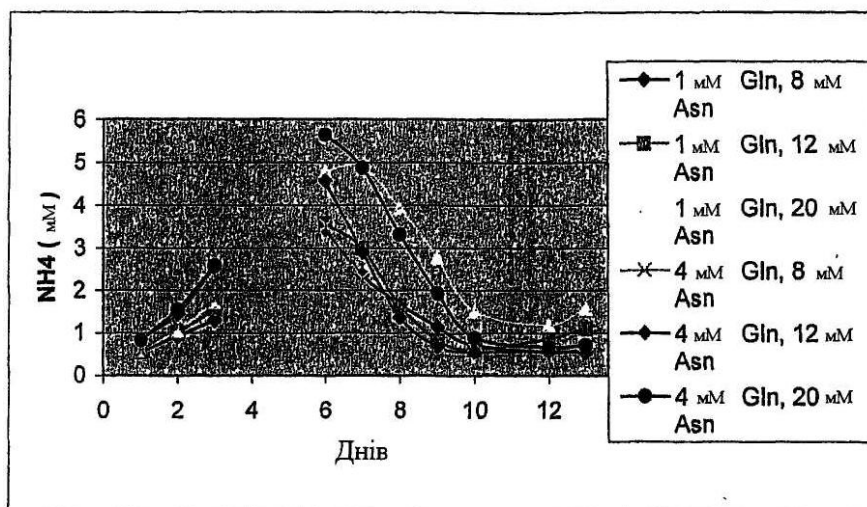
ФІГ. 31

## Рівні лактату культур анти-GDF-8 за різних експериментальних умов



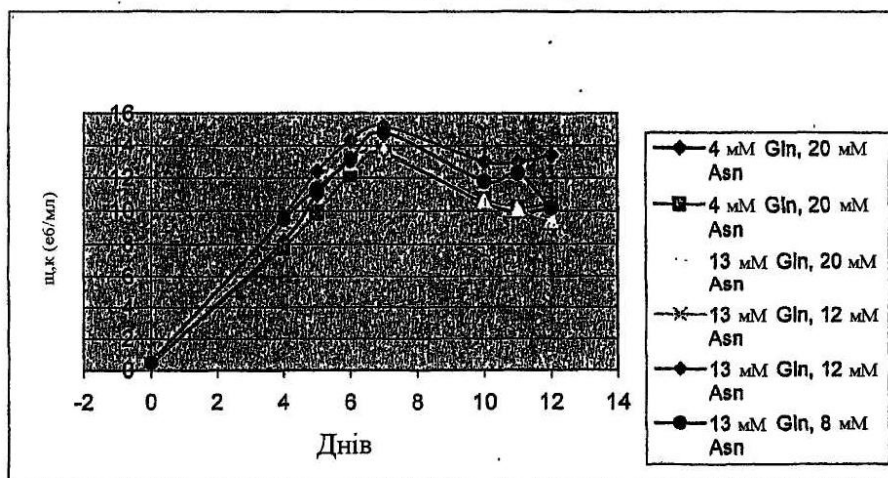
ФІГ. 32

## Рівні амонію культур анти-GDF-8 за різних експериментальних умов



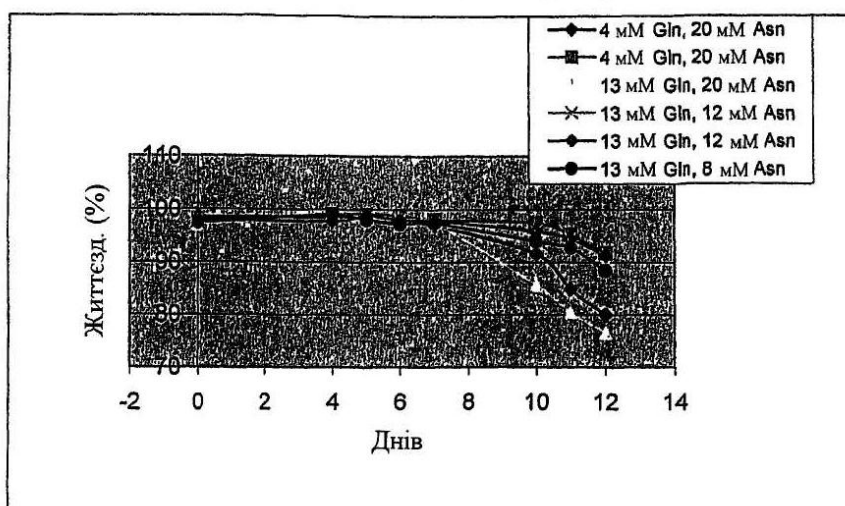
ФІГ. 33

Ріст клітин анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні  
глутаміну й аспарагіну



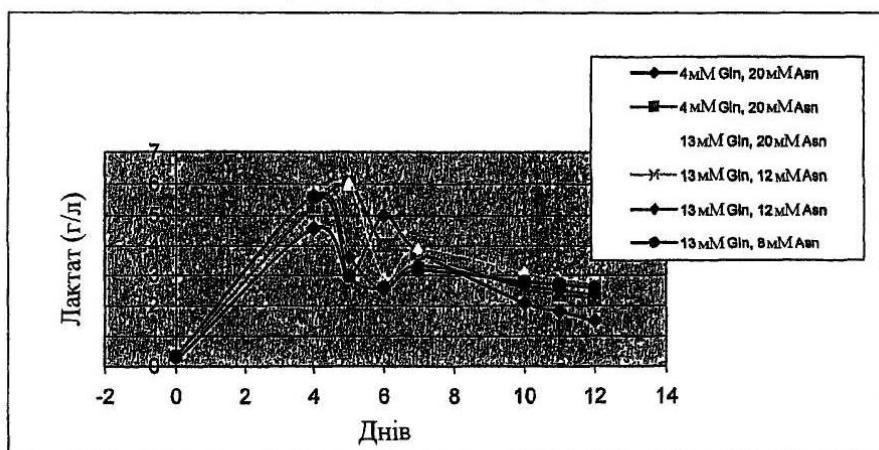
ФІГ. 34

Життєздатність клітин анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить  
різні рівні глутаміну й аспарагіну



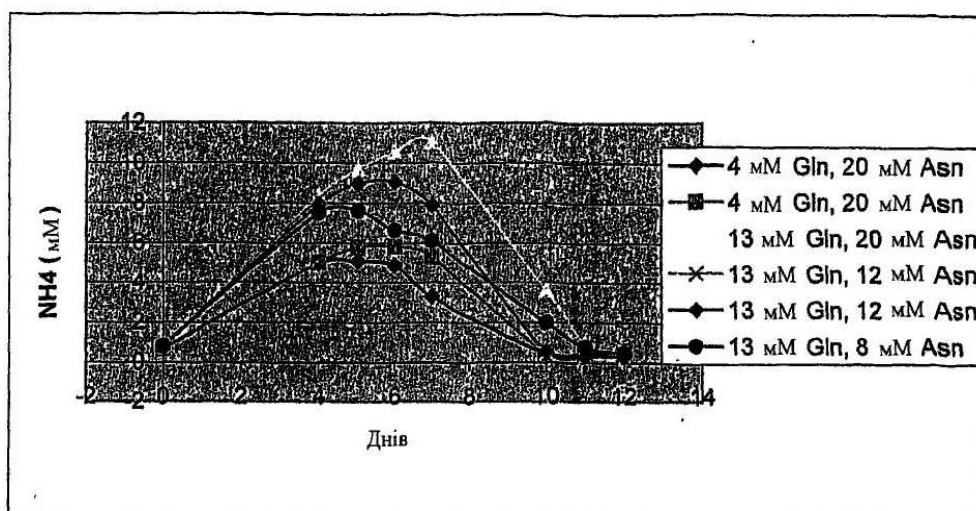
ФІГ. 35

Рівні лактату культур анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну



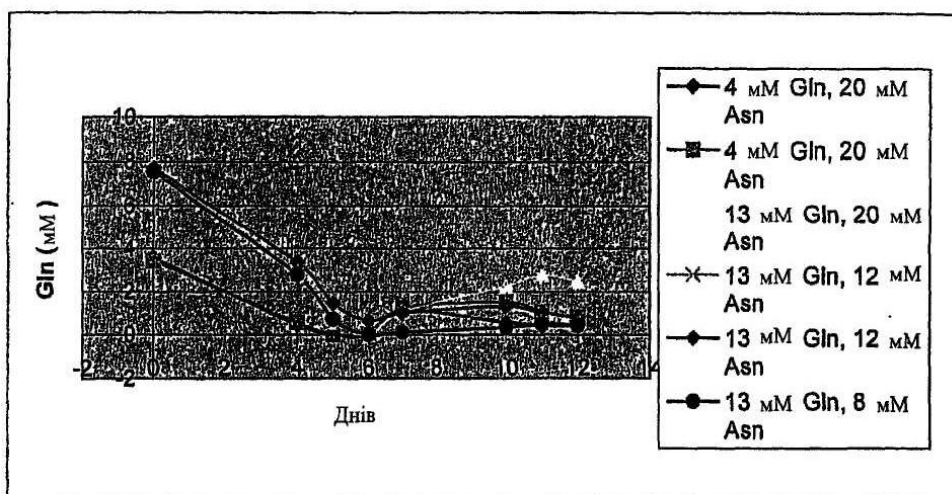
ФІГ. 36

Рівні амонію культур анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну



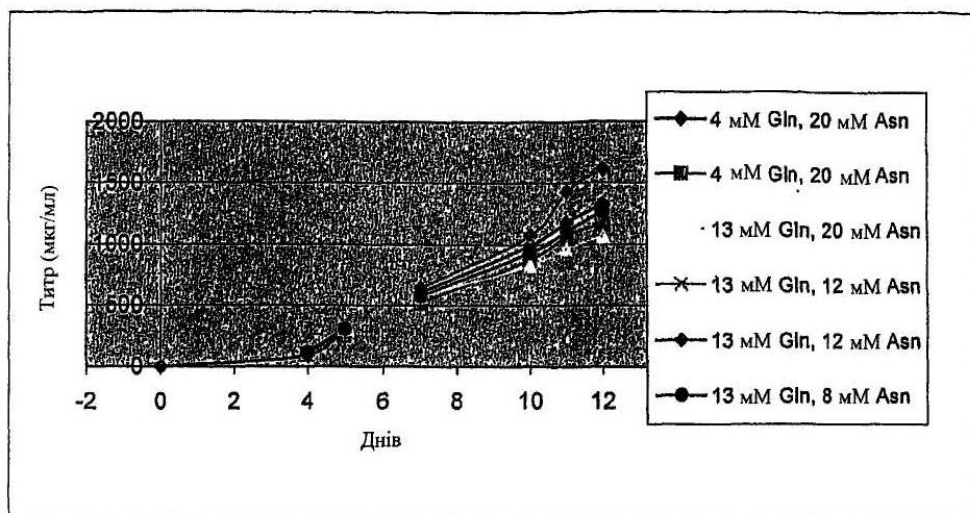
ФІГ. 37

Рівні глутаміну культур анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну



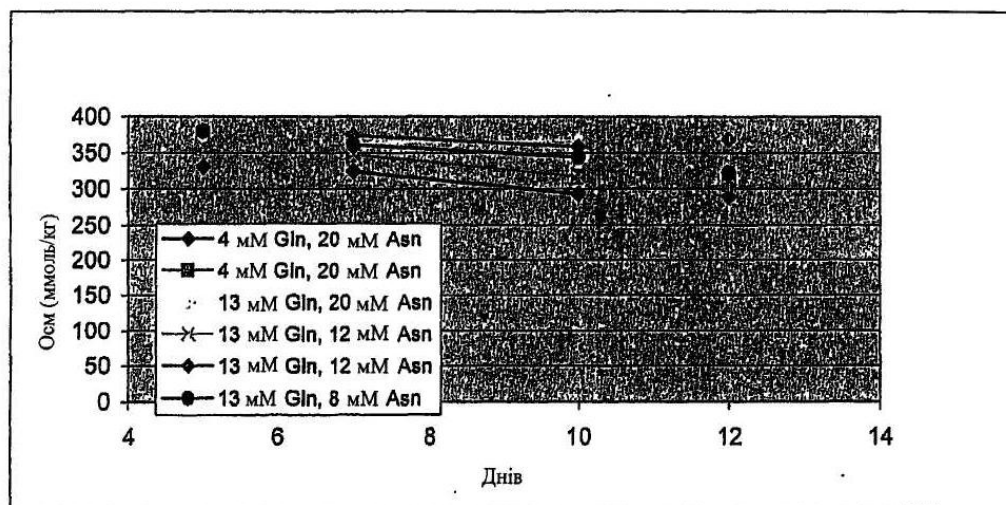
ФІГ. 38

Титр анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну



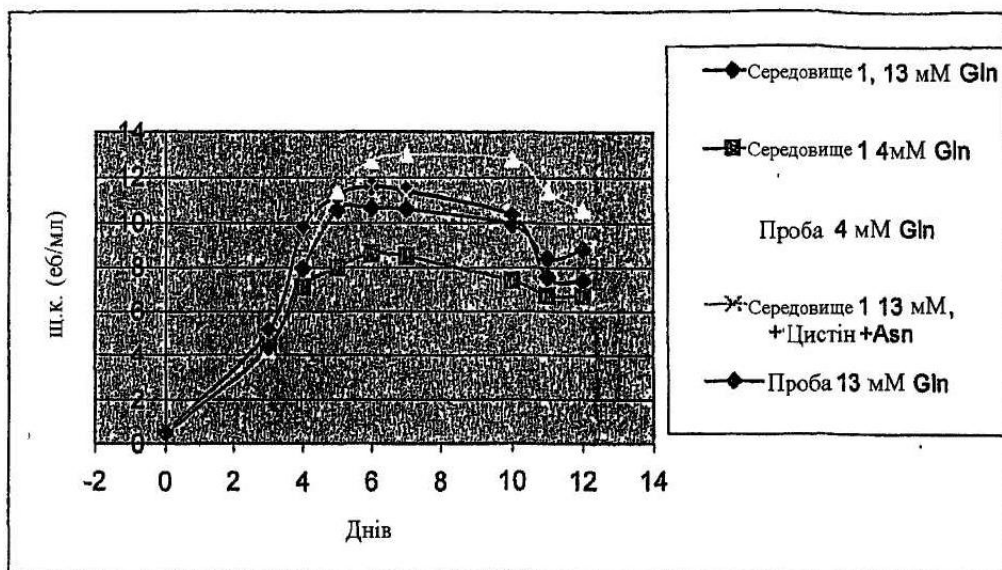
ФІГ. 39

Осмолярність культур анти-GDF-8 у модифікованому Середовищі 9, що містить різні рівні глутаміну й аспарагіну



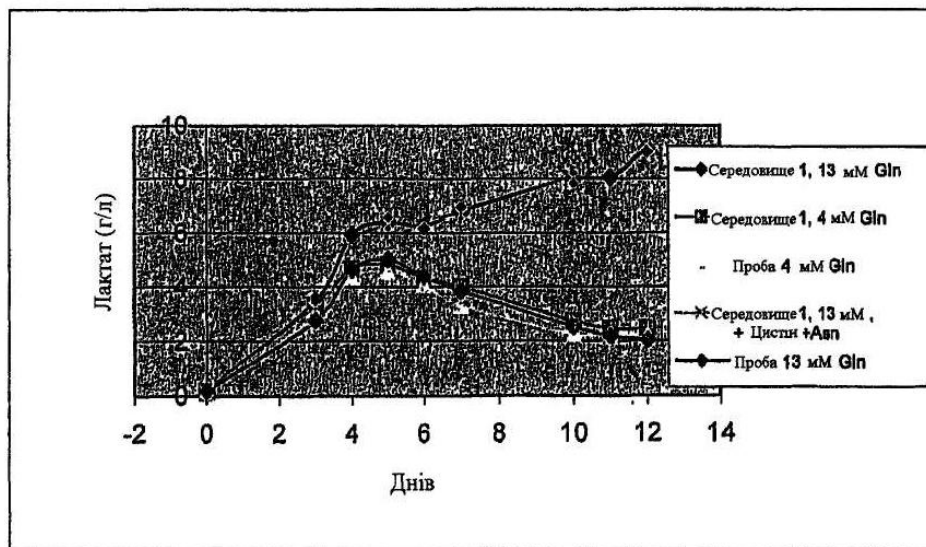
ФІГ. 40

Ріст клітин анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну



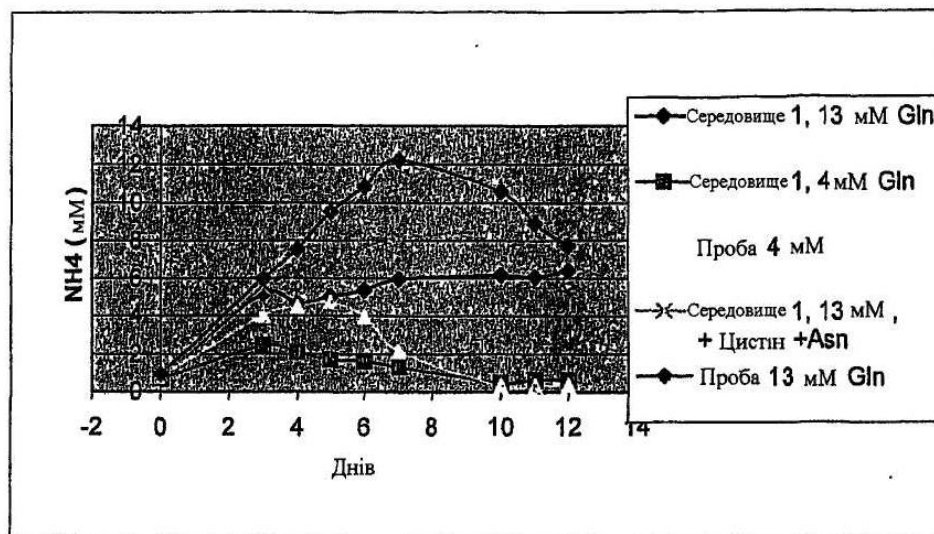
ФІГ. 41

Рівні лактату культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну



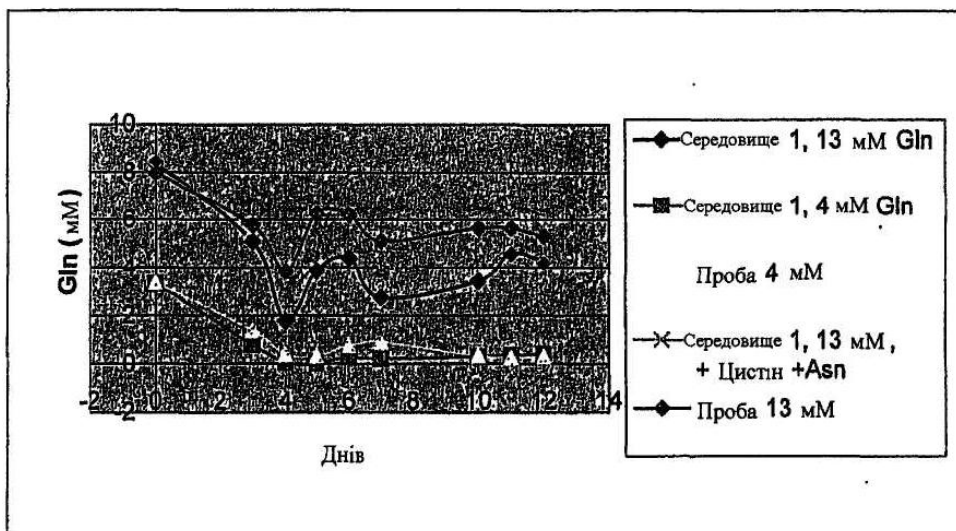
ФІГ. 42

Рівні амонію культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну



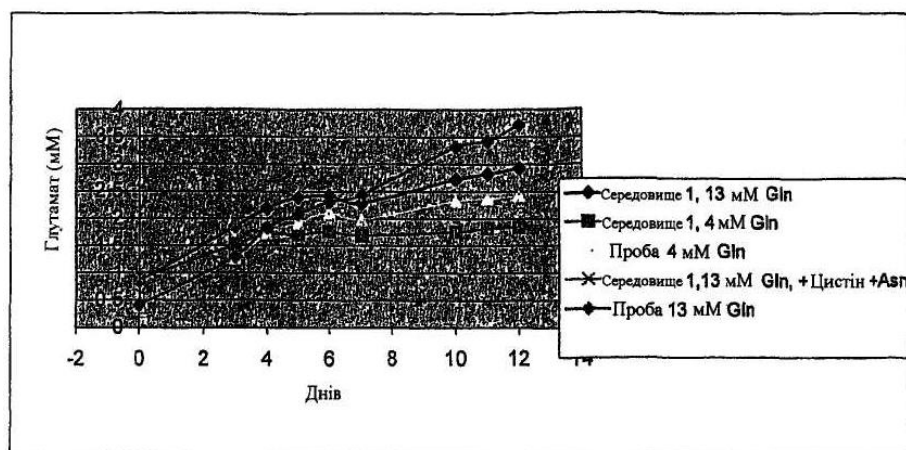
ФІГ. 43

Рівні глутаміну культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну



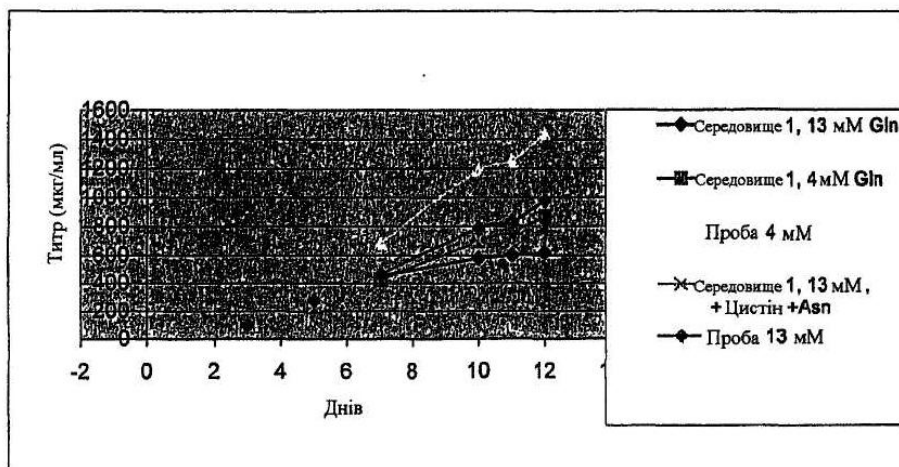
ФІГ. 44

Рівні глутамату культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну



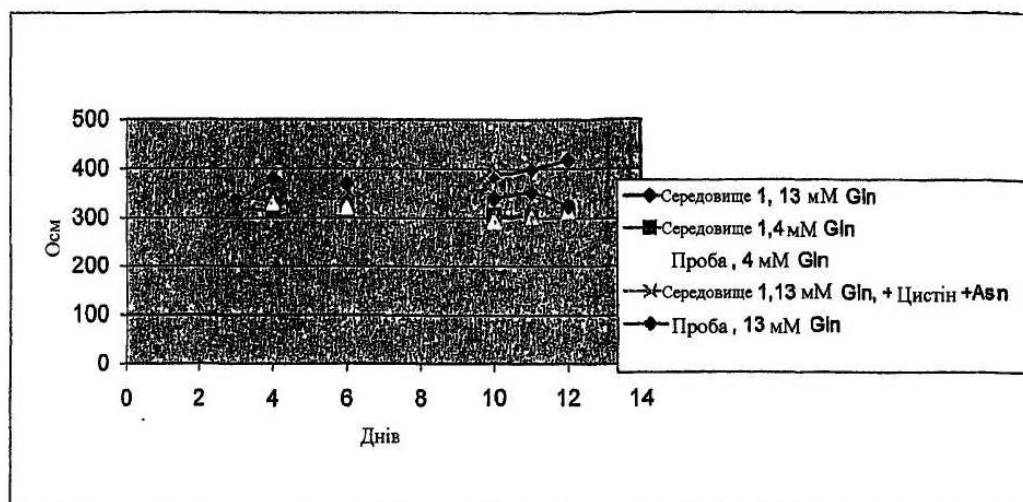
ФІГ. 45

Титр анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну



ФІГ. 46

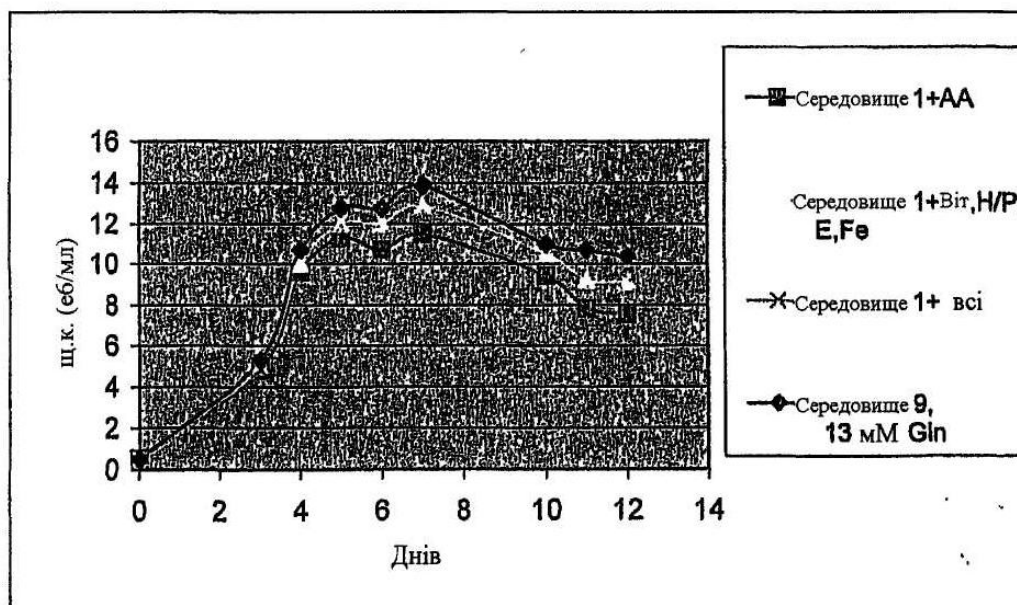
Осмолярність культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні аспарагіну й цистеїну



ФІГ. 47

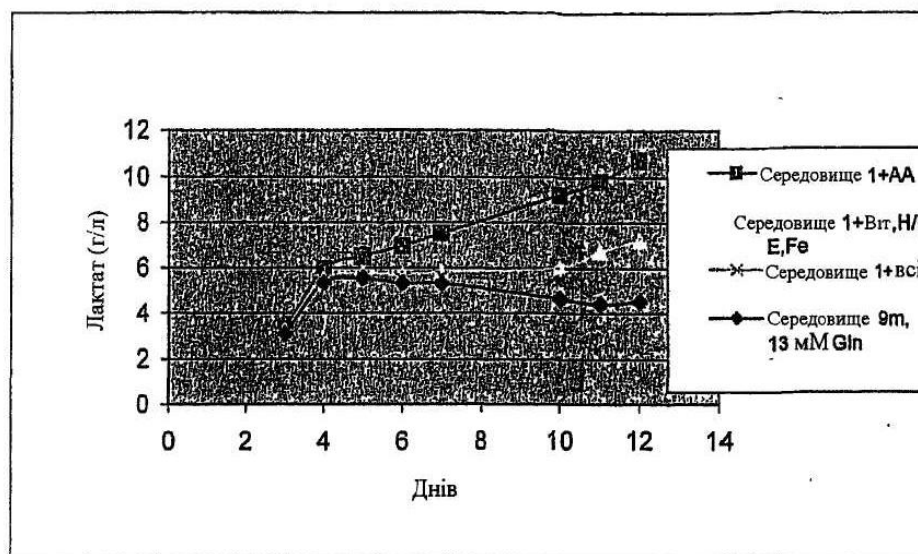


Ріст клітин анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів



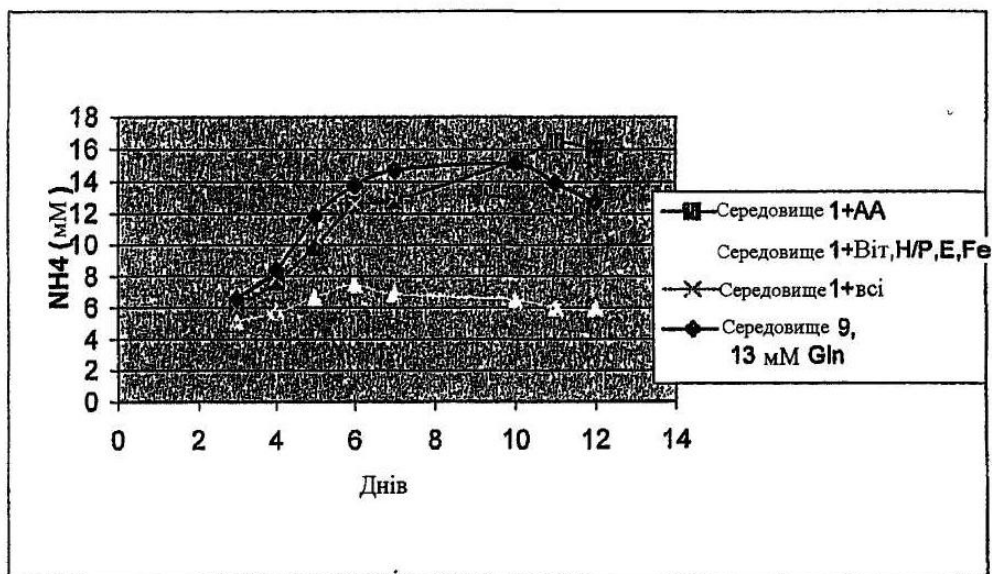
ФІГ. 48

Рівні лактату культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів



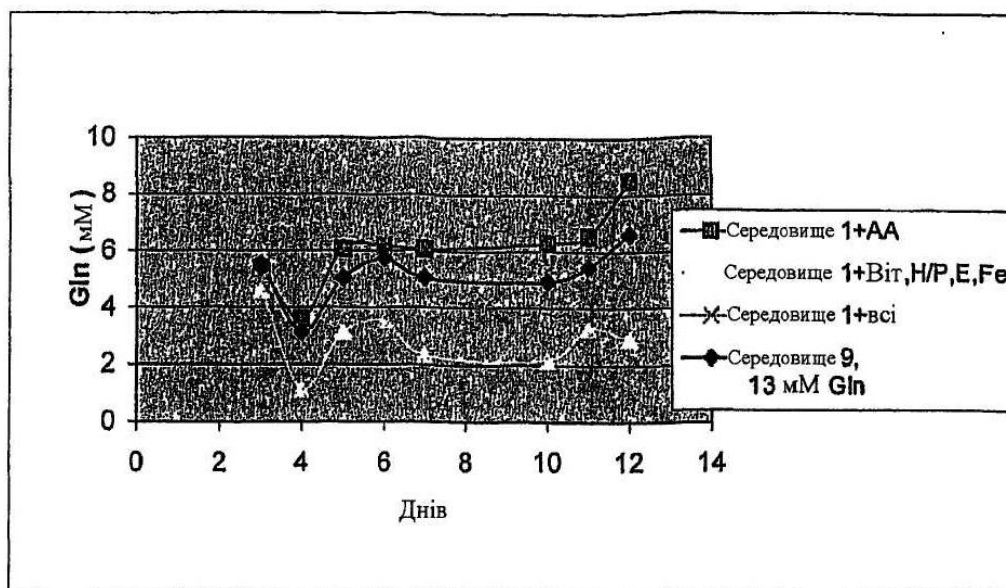
ФІГ. 49

Рівні амонію культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів



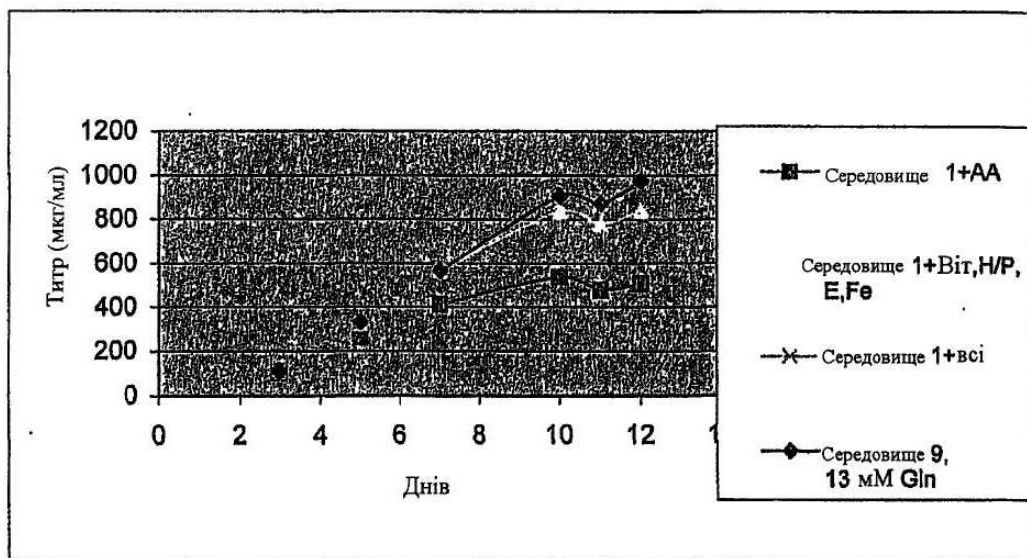
ФІГ. 50

Рівні глутаміну культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів



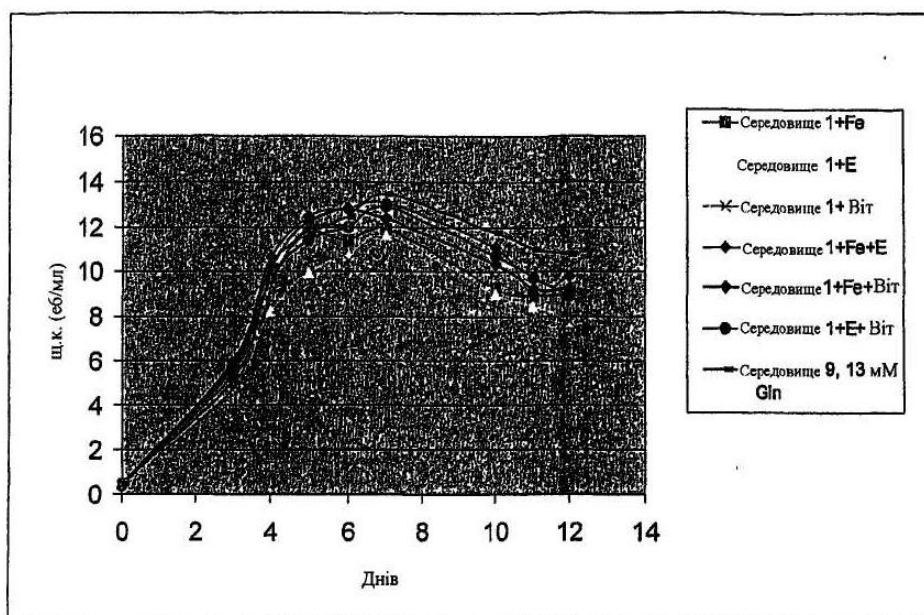
ФІГ. 51

Титр анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні амінокислот і вітамінів



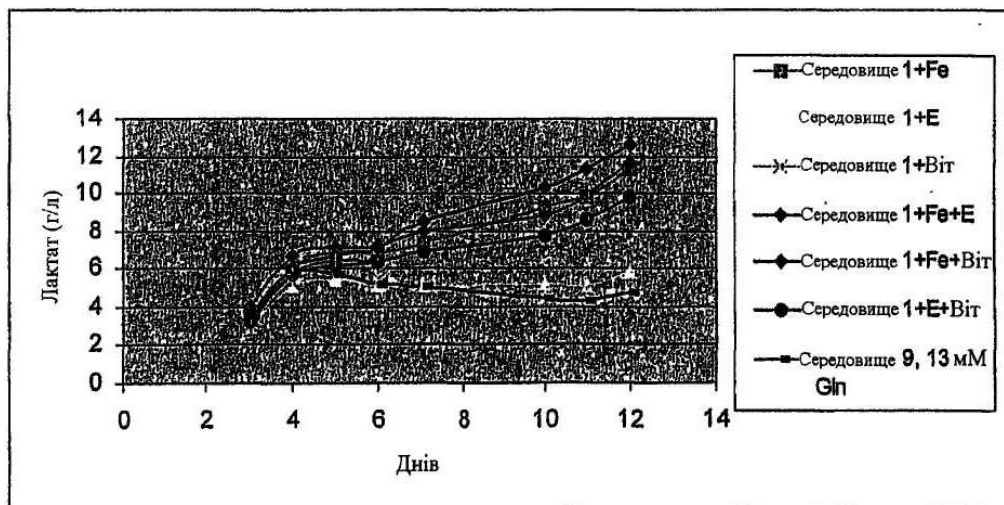
ФІГ. 52

Ріст клітин анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні вітамінів, мікроелементів E і заліза



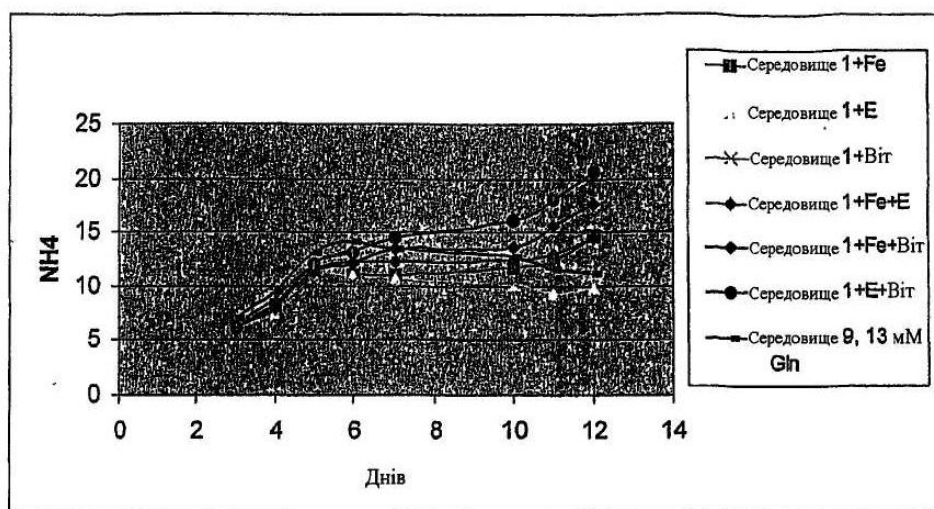
ФІГ. 53

Рівні лактату культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні вітамінів, мікроелементів E і заліза



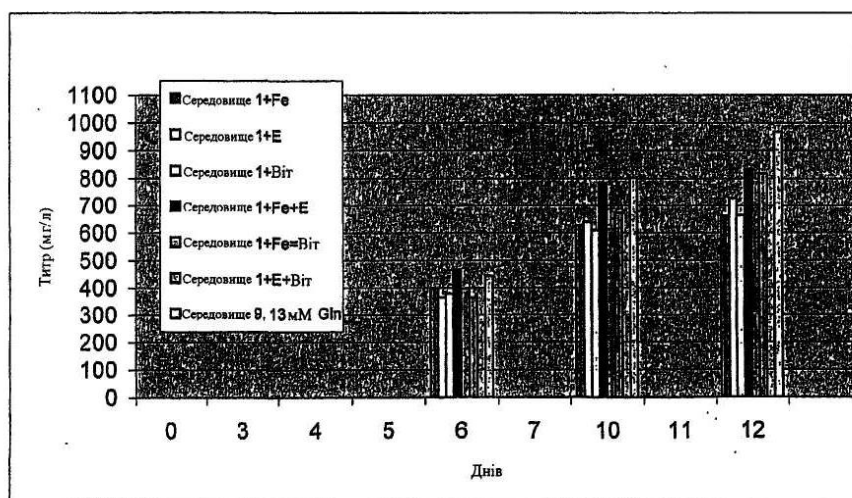
ФІГ. 54

Рівні амонію культур анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні вітамінів, мікроелементів E і заліза



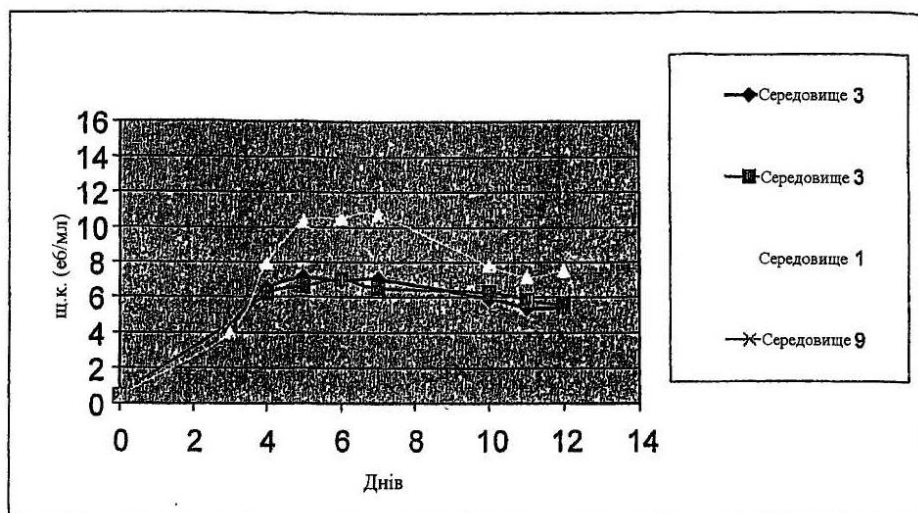
ФІГ. 55

Титр анти-GDF-8 у середовищах, що містять різні рівні вітамінів, мікроелементів E і заліза



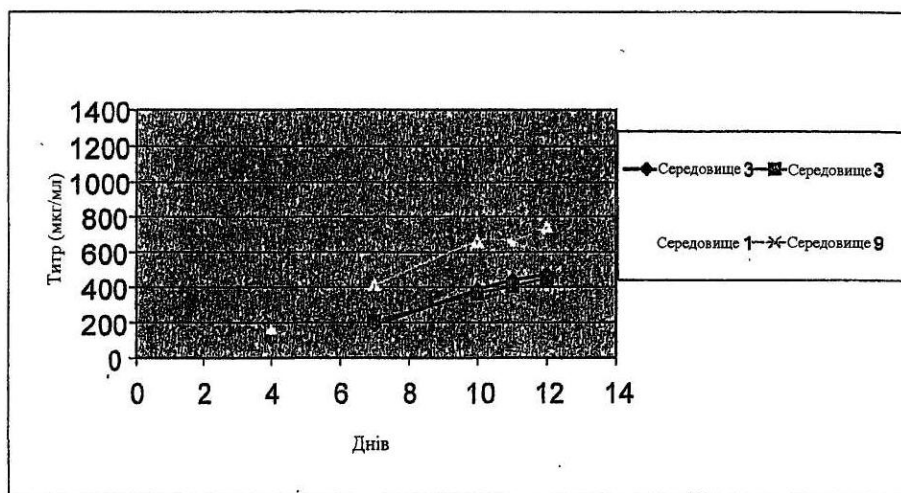
ФІГ. 56

Ріст клітин анти-GDF-8 у Середовищах 1, 3 і 9



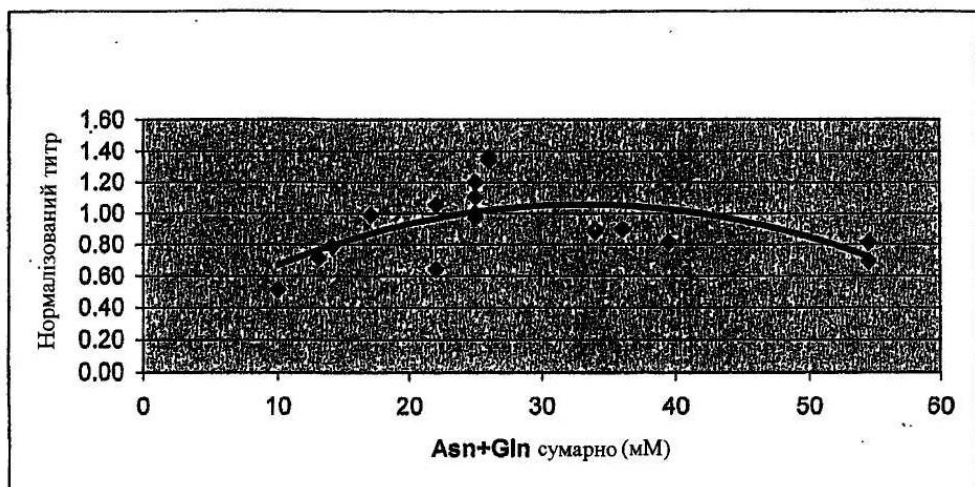
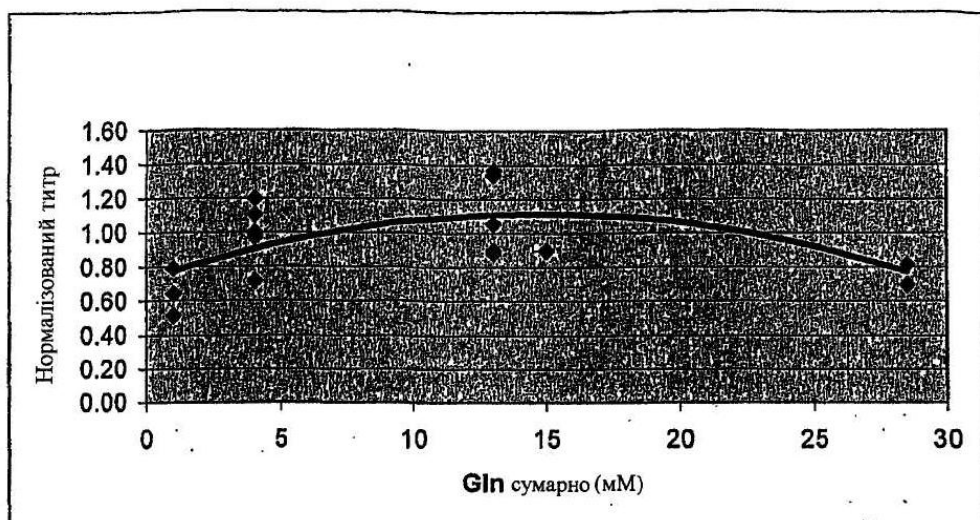
ФІГ. 57

## Титр анти-GDF-8 у Середовищах 1, 3 і 9



ФІГ. 58

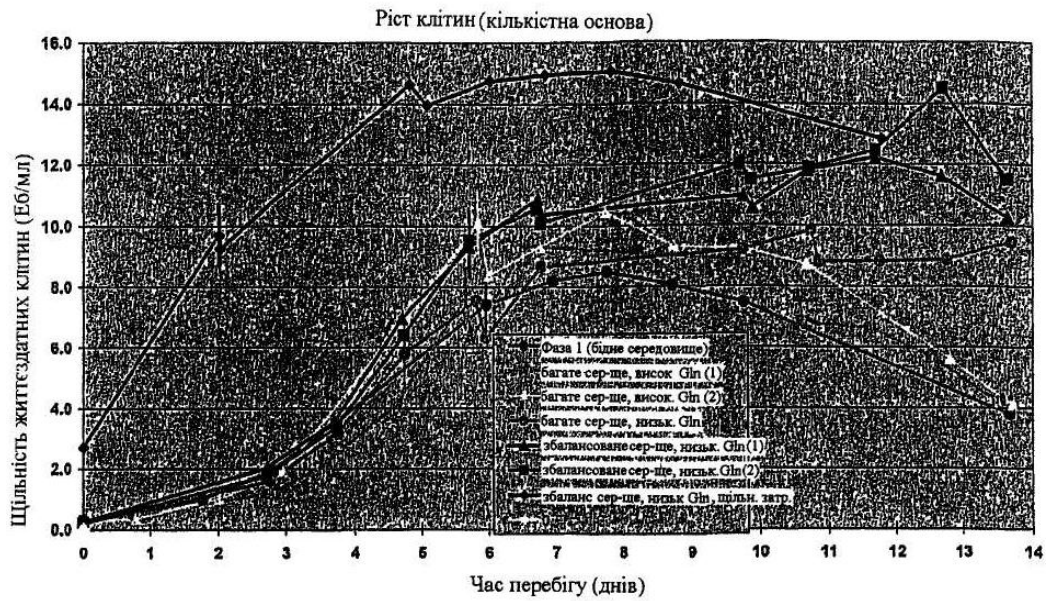
Екстрапольовані титри анти-GDF-8 для різних рівнів глутаміну окремо й сумарного об'єднаного глутаміну й аспарагіну



ФІГ. 59

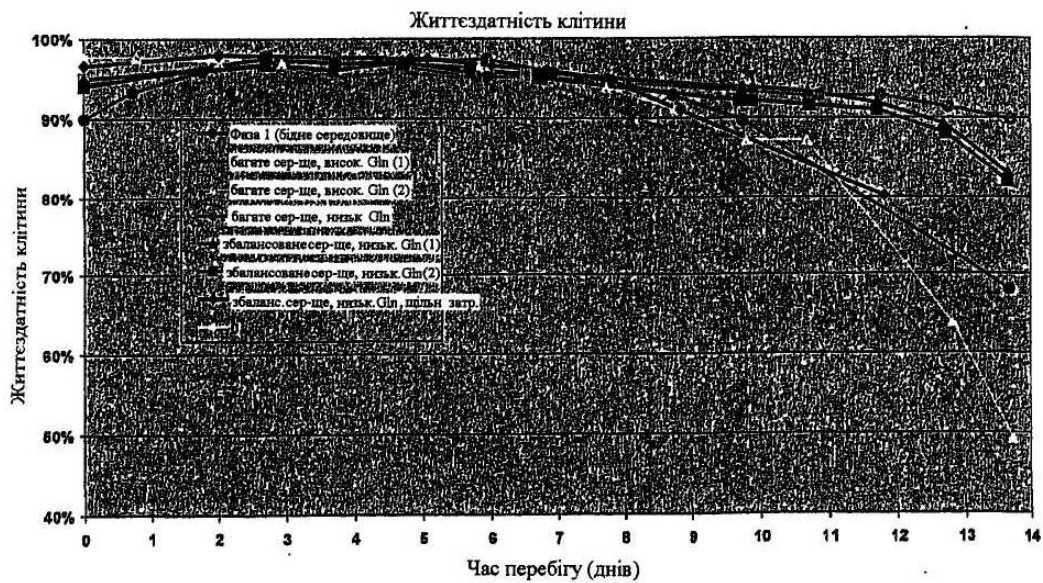


## Ріст клітин анти-АБета за різних умов середовищ, що випробовуються



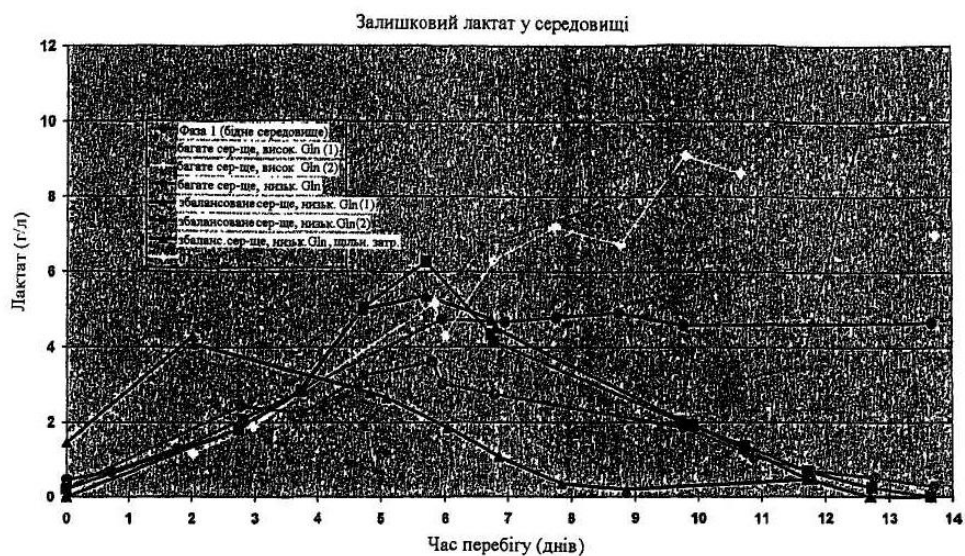
ФІГ. 60

## Життєздатність клітин анти-АБета за різних умов середовищ, що випробовуються



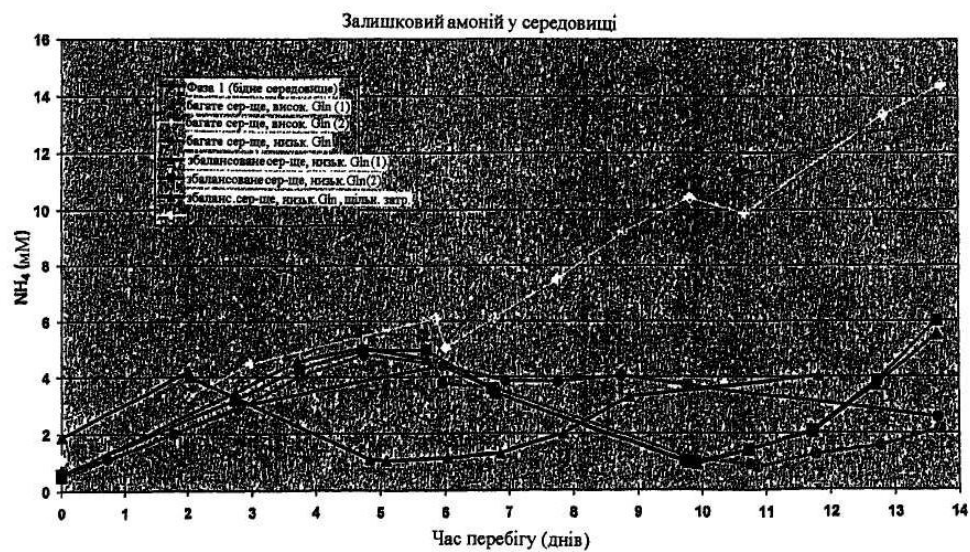
ФІГ. 61

Рівні лактату культур анти-АБета за різних умов середовищ, що випробовуються



ФІГ. 62

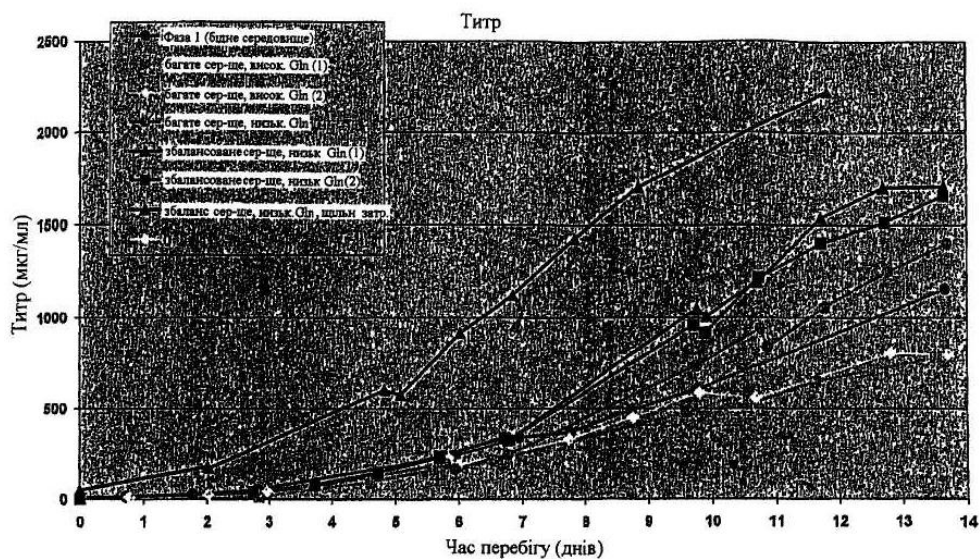
Рівні амонію культур анти-АБета за різних умов середовищ, що випробовуються



ФІГ. 63

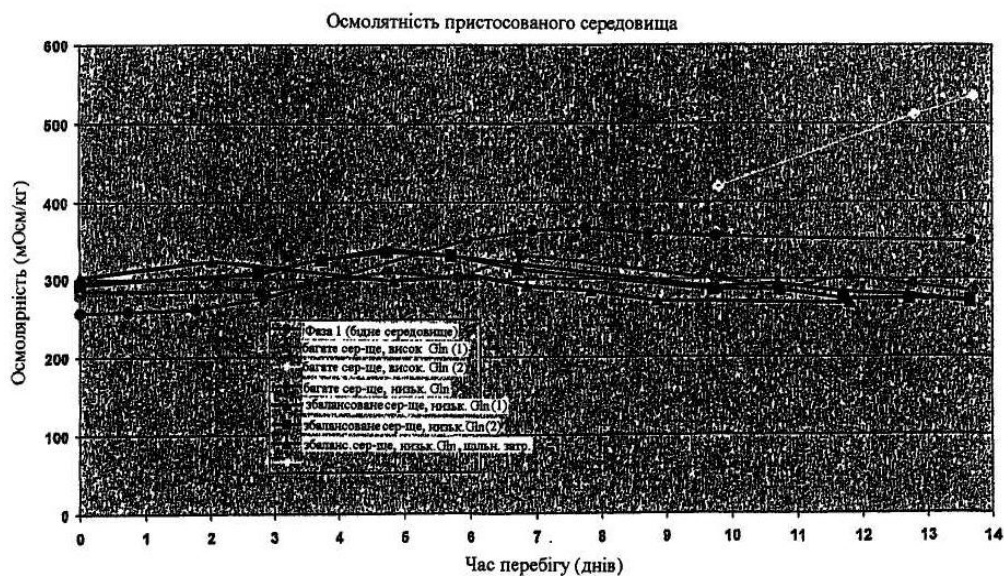


# Титр анти-АБета за різних умов середовищ, що випробовуються



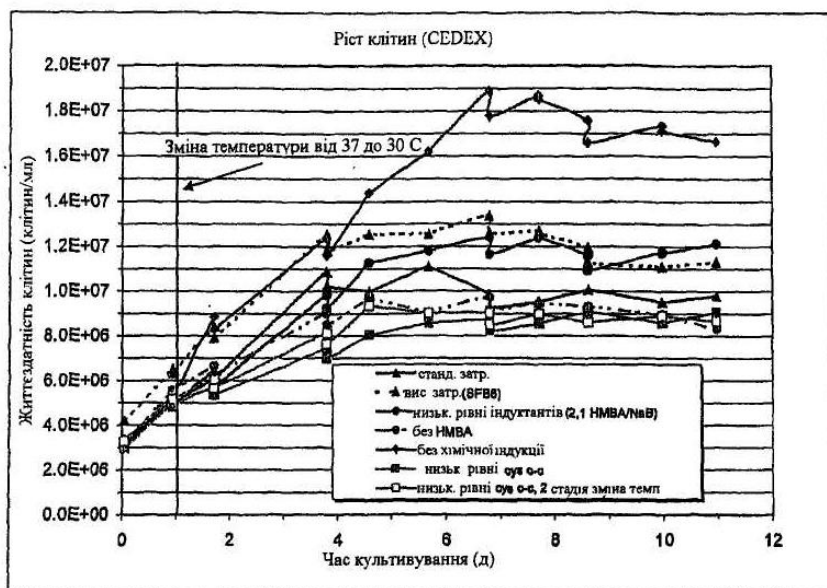
ФІГ. 64

# Осмолярність культур анти-АБета за різних умов середовищ, що випробовуються



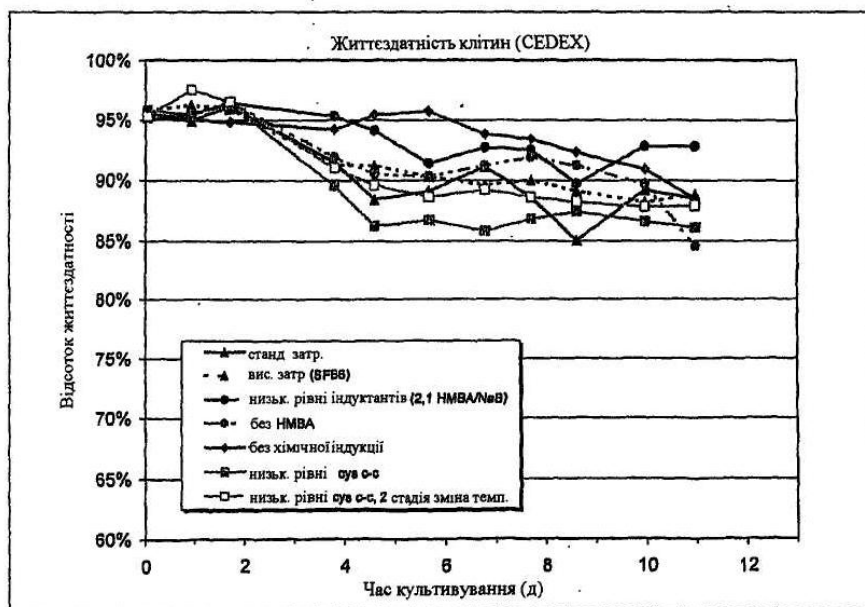
ФІГ. 65

Ріст клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов



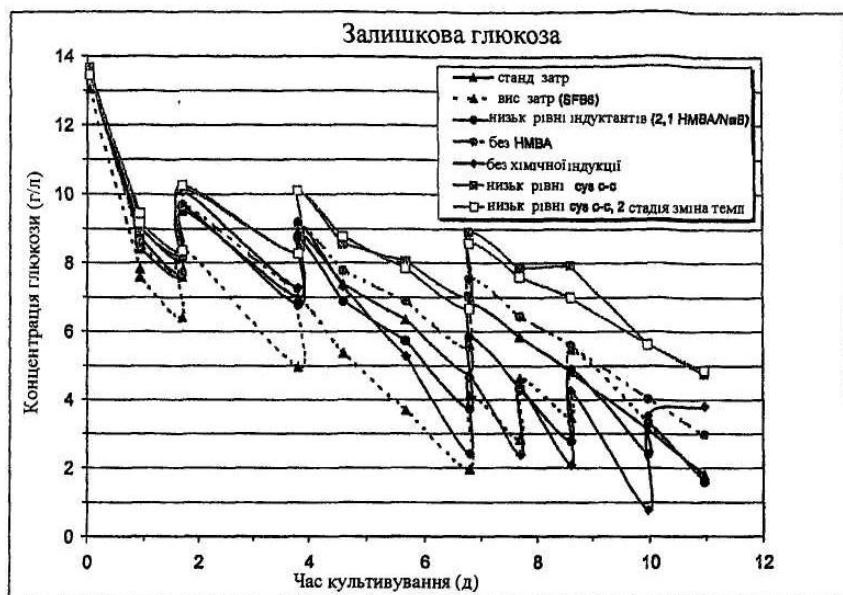
ФІГ. 66

Життєздатність клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов



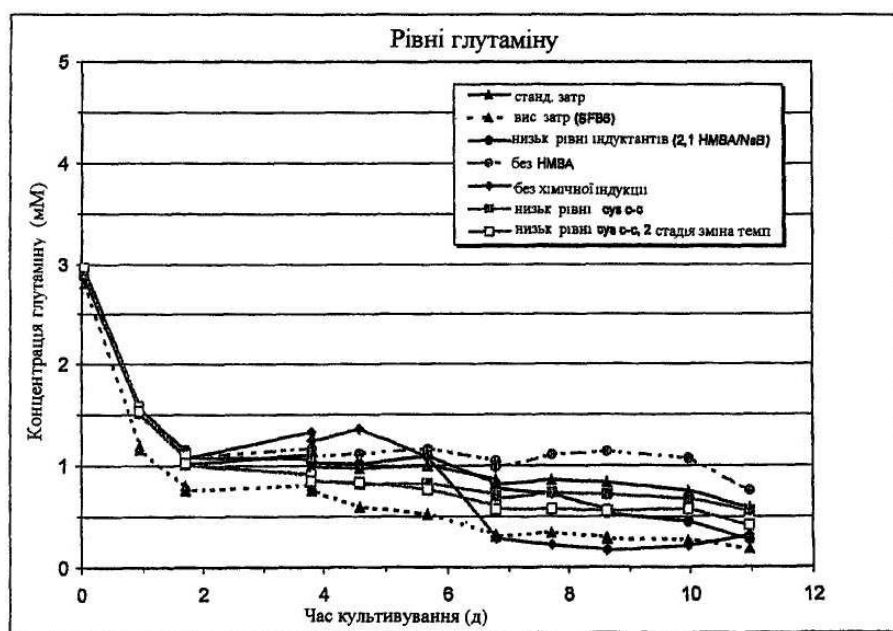
ФІГ. 67

**Залишкова глюкоза в культурах клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов**



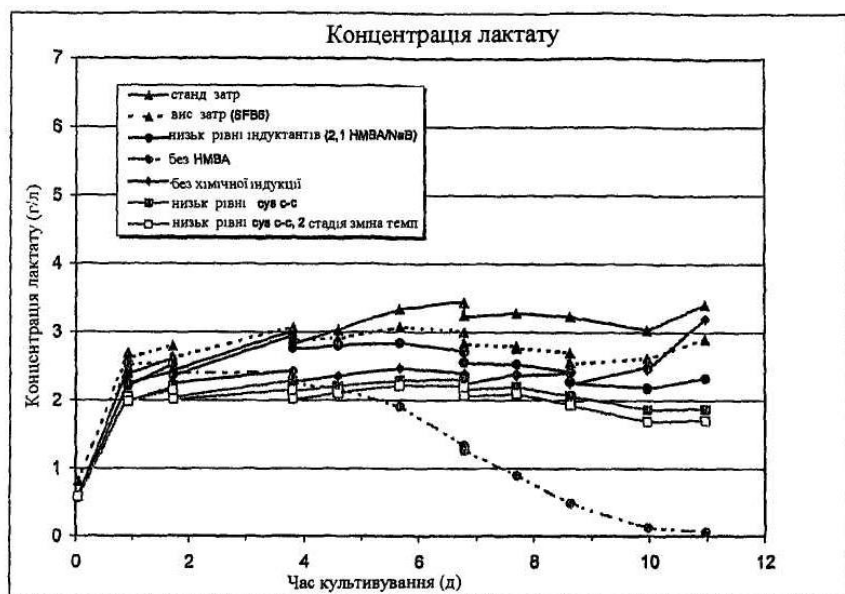
**ФІГ. 68**

**Рівні глутаміну в культурах клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов**



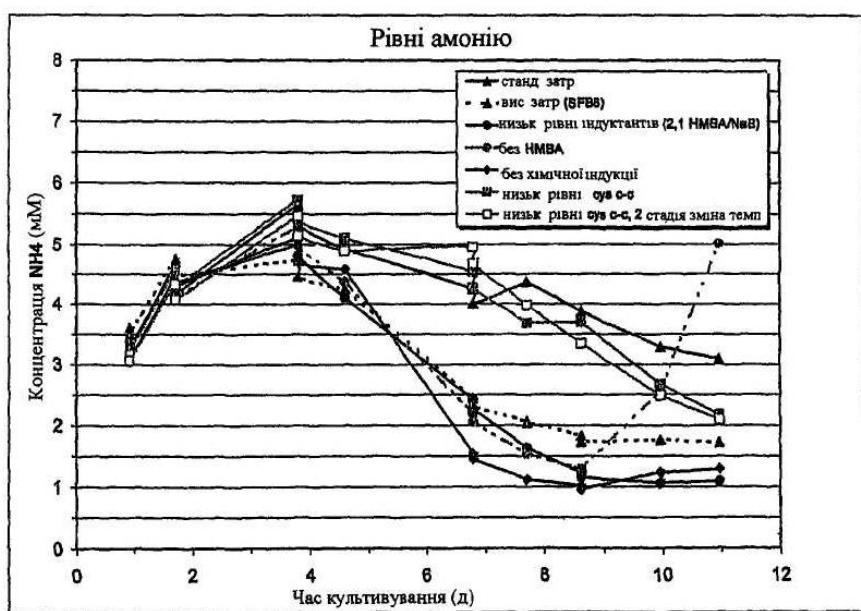
**ФІГ. 69**

Концентрація лактату в культурах клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов



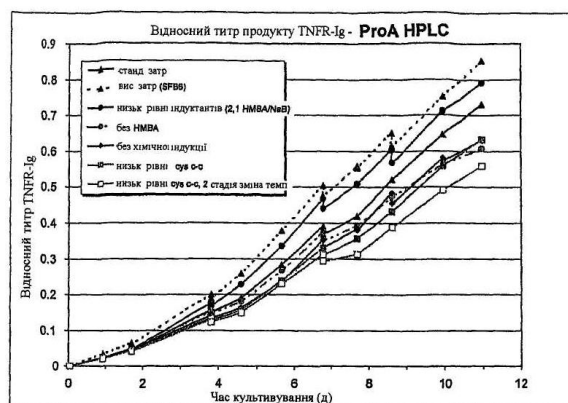
ФІГ. 70

Рівні амонію в культурах клітин, що експресують TNFR-Ig за різних експериментальних умов



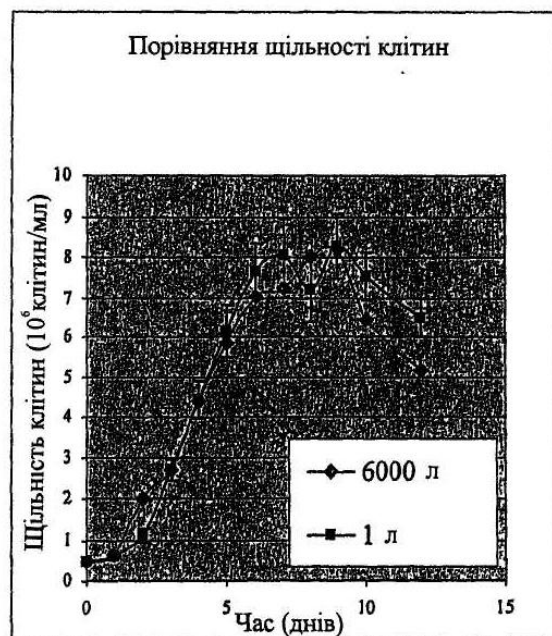
ФІГ. 71

Відносний титр TNFR-Ig за різних експериментальних умов



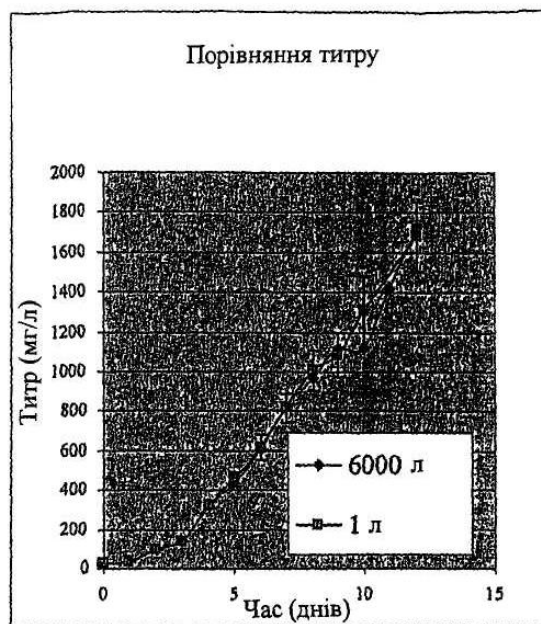
ФІГ. 72

Щільності клітин анти-GDF-8, вирощених в 6000 л і 1 л біореакторах



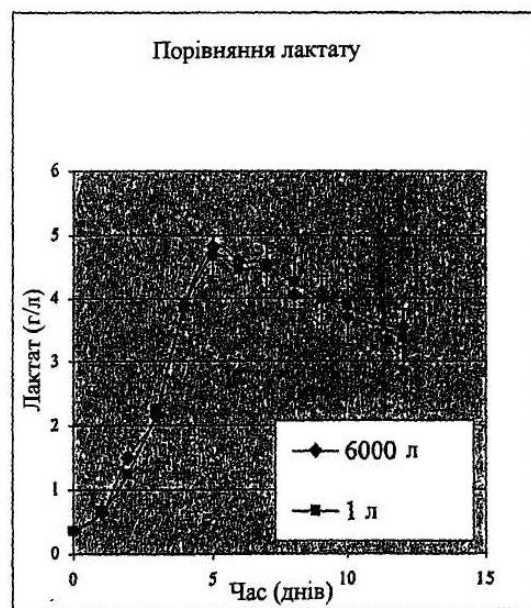
ФІГ. 73

## Титри анти-GDF-8 клітин, вирощених в 6000 л і 1 л біореакторах

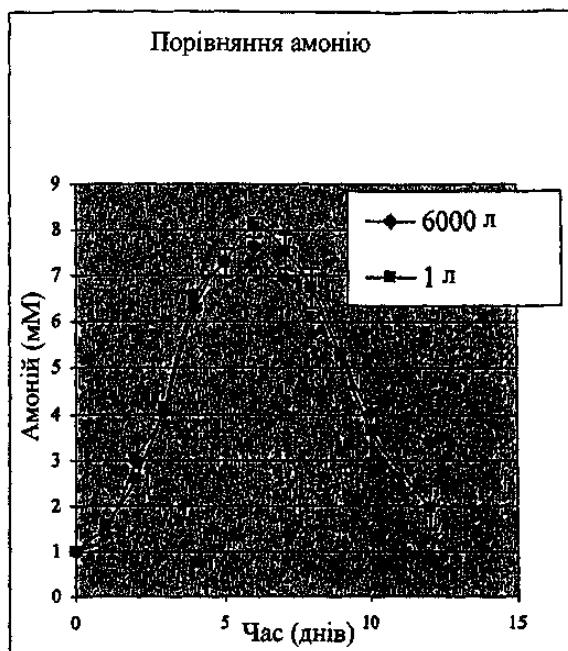


ФІГ. 74

Рівні лактату клітин анти-GDF-8, вирощених в 6000 л і 1 л біореакторах



ФІГ. 75

**Рівні амонію клітин анти-GDF-8, вирощених в 6000 л і 1 л біореакторах****ФІГ. 76**