



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108836** (13) **C2**  
(51) МПК (2015.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 5/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2011 00366</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Дорей Хайманті (US),</b> <b>Лі Селія (US),</b> <b>Соєрволд Макклейн Тіна М. (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>12.06.2009</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>СЕНТОКОР ОРТО БАЙОТЕК ІНК.,</b> 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, United States of America (US)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.06.2015</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.</b> <b>№115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/061,235</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: LING GU ET AL: "Deregulation of Cdc2 kinase induces caspase-3 activation and apoptosis", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 302, no. 2, 7 March 2003 (2003-03-07) , P. 384-391. ARDEN NILOU ET AL: "Inhibiting the apoptosis pathway using MDM2 in mammalian cell cultures", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 97, no. 3, June 2007 (2007-06), P.601-614.
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>13.06.2008</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>11.04.2011, Бюл.№ 7</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.06.2015, Бюл.№ 12</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>PCT/US2009/047185, 12.06.2009</b>	

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СЕКРЕТОВАНОГО БІЛКА В ПІДЖИВЛЮВАНІЙ КУЛЬТУРІ КЛІТИН ЯЄЧНИКІВ КИТАЙСЬКОГО ХОМ'ЯЧКА**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу одержання секретованого білка в підживлюваній культурі клітин яєчників китайського хом'ячка (CHO), що включає культивування лінії клітин CHO, яка надекспресує MDM2, E1B19K і один або декілька генів, що кодують секретований білок, де титр одержаного секретованого білка складає щонайменше 600 мг/л на 23 день підживлюваної культури клітин.

UA 108836 C2



## Галузь винаходу

Даний винахід належить до способу підвищення життєздатності і продукції секретованих білків в підживлюваних культурах еукаріотичних клітин.

## Передумови створення винаходу

5 Культури клітин ссавців є системами, які вибираються для виробництва багатьох рекомбінантних білків, завдяки їх здатності до синтезу білків з необхідними посттрансляційними модифікаціями. З ростом потреб у виробництві виникає серйозна мотивація до підвищення ефективності виробничого процесу шляхом збільшення виходу продукту. Досягнення виходу біологічних діючих речовин близько декількох грамів на літр в комерційному виробничому процесі залежить від оптимізації як інженерних методів, так і методик культивування клітин ссавців.

10 Характерною проблемою існуючих безбілкових культур клітин ссавців високої щільності є проблема клітинної смерті, 80 % які в типовому підживлюваному біореакторі відбувається шляхом апоптозу, що виникає у відповідь на дію таких стрес-чинників, як недостача поживних речовин і фактора росту, брак кисню, накопичення токсинів і напруження при зсуві (Goswami et al., *Biotechnol. Bioeng.* 62:632 640 (1999)). Апоптоз лімітує максимальну щільність життєздатних клітин, прискорює настання фази загибелі клітини і потенційно знижує вихід гетерологічних білків (Chiang and Sisk, *Biotechnol. Bioeng.* 91:779-792 (2005); Figueroa et al., *Biotechnol. Bioeng.* 73:211 222 (2001), *Metab. Eng.* 5:230 245 (2003), *Biotechnol. Bioeng.* 85:589 600 (2004); Mercille and Massie, *Biotechnol. Bioeng.* 44:1140 1154 (1994)).

20 Апоптоз зумовлений дією складної мережі сигнальних шляхів, що починаються як в середовищі клітини, так і у зовнішньому середовищі, кульмінацією яких є активація каспаз, що відіграють ключову роль в протіканні кінцевих стадій клітинної смерті. Існує досвід використання різних способів запобігання апоптозу для підтримки життєздатності клітин в ході тривалих виробничих циклів з використанням культур клітин ссавців (Arden and Betenbaugh, *Trends Biotechnol.* 22:174 180 (2004); Vives et al., *Metab. Eng.* 5:124 132 (2003)). Зміна позаклітинного середовища шляхом додавання до культурального середовища факторів росту, гідролізатів і лімітуючих поживних речовин призводить до підвищення продукції білка і скорочення апоптозу (Burteau et al., *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 39:291-296 (2003); Zhang and Robinson, *Cytotechnology* 48: 59-74 (2005)). Інші дослідники зверталися до хімічних і генетичних стратегій з метою інгібування сигнального каскаду апоптозу з середовища клітини (Sauerwald et al., *Biotechnol. Bioeng.* 77:704-716 (2002), *Biotechnol. Bioeng.* 81:329-340 (2003)). Дослідники виявили, що надекспресія генів, які мають підвищену активність в ракових клітинах, може продовжити життєздатність клітин, що вирощуються в біореакторах, шляхом запобігання апоптозу за допомогою впливу на сигнальний каскад на етапах, що передують активації каспаз (Goswami et al., *supra*; Mastrangelo et al., *Trends Biotechnol.* 16:88 95 (1998); Meents et al., *Biotechnol. Bioeng.* 80:706 716 (2002); Tey et al., *J Biotechnol.* 79:147 159 (2000) and *Biotechnol. Bioeng.* 68:31 43 (2000)).

40 Анти-апоптозні гени, що функціонують в мітохондріальному апоптичному шляху, можна розділити на три групи: 1) гени, які діють на ранніх етапах даного шляху, наприклад, члени сімейства білків Bcl-2; 2) гени, які діють в середині шляху і зумовлюють руйнування або інгібування апоптосомного комплексу, наприклад, Aven; 3) гени, які діють на пізніх етапах шляху, наприклад, інгібітори каспаз, XIAP. Функціональність більшості перерахованих генів досліджувалася за допомогою їх надекспресії в експресійних системах ссавців, і в деяких випадках був виявлений ефект комбінованої надекспресії двох або більше генів, задіяних на різних етапах сигнального шляху. Прикладами можуть бути 1) адитивний ефект Bcl-XL і мутантного XIAP з делецією (XIAP $\Delta$ ) в клітинах яєчника китайського хом'ячка (CHO) (Figueroa et al., *Metab. Eng.* 5:230 245 (2003)); 2) E1B-19K і Aven в клітинах нирок хом'ячка (BHK) (Nivitchanyong et al., *Biotechnol. Bioeng.* 98:825-841 (2007)); 3) Bcl-XL, Aven і XIAP $\Delta$  (Sauerwald et al., *Biotechnol. Bioeng.* 81:329-340 (2003)).

50 Одним з основних активаторів апоптозного каскаду є білок p53. Варіантом механізму, за допомогою якого p53 активує апоптоз, є збільшення експресії групи генів про-апоптозних білків, включаючи BNIP3 (Yasuda et al., *J. Biol. Chem.* 273:12415-21 (1998)). Таким чином, підвищення продукції p53 може бути одним з основних чинників, що запускають апоптоз. p53 може руйнуватися в клітинах за допомогою убіквітин-опосередкованого шляху деградації через MDM2 (Bond et al., *Current Cancer Drug Target* 5:3-8 (2005)). Таким чином, надекспресія MDM2 потенційно може знижувати рівень p53 і, отже, інгібувати апоптоз. Раніше було показано, що в присутності стресових сигналів клітини лінії CHO, для яких характерна надекспресія MDM2, мають здатність до більш тривалого виживання в культурі в порівнянні з диким типом CHO (в культурі напівбезперервного типу) (Arden et al., *Biotechnol. Bioeng.* 97:601-614 (2007)).

Описані вище різні підходи, направлені на підвищення продукції білка, застосовуються з різним ступенем успішності. Проте, існує постійна необхідність в розробці способів підвищення продукції білків, особливо у великих промислових масштабах.

Короткий опис малюнків

5 ФІГ. 1. Профілі росту клітинних ліній, отриманих шляхом ко-трансфекції Bcl-2Δ, MDM-2 і XIAPΔ.

ФІГ. 2. Профілі росту клітинних ліній, отриманих шляхом ко-трансфекції Bcl-XL, MDM-2 і XIAPΔ.

10 ФІГ. 3. Профілі росту клітинних ліній, отриманих шляхом ко-трансфекції E1B19K і MDM-2. А) Щільність життєздатних клітин; В) Інтегрована щільність життєздатних клітин; С) Зниження активності каспази 3/7

ФІГ. 4. Профілі росту клітинних ліній, в яких проведена трансфекція MDM2<sup>D300A</sup> в культурі напівбезперервного типу у струшуваній колбі.

А. Хазяїном при трансфекції були клітини 1013A

15 В. Хазяїном при трансфекції були клітини C1835A

ФІГ. 5. Профілі росту клітин лінії 1013A, яким проведена трансфекція DM2<sup>D300A</sup> в культурі напівбезперервного типу у струшуваній колбі. А) Щільність життєздатних клітин; В) % життєздатність.

ФІГ. 6. Титри антитіл в ході культивування клітин лінії CHO в підживлюваній культурі.

20 Короткий опис винаходу

Одним з об'єктів винаходу є спосіб підвищення життєздатності клітин в підживлюваній культурі клітин ссавців, що включає культивування ліній клітин ссавців, яка надекспресує MDM2<sup>D300A</sup>.

25 Також об'єктом винаходу є спосіб підвищення життєздатності клітин в підживлюваній культурі клітин ссавців, що включає культивування ліній клітин ссавців, яка надекспресує MDM2<sup>D300A</sup> і E1B19K.

30 Також об'єктом винаходу є спосіб підвищення продукції секретованого білка в підживлюваній культурі клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO), що включає культивування клітин лінії CHO, яка надекспресує MDM2<sup>D300A</sup>, а також одного або декількох генів, які кодують секретований білок.

Також об'єктом винаходу є спосіб підвищення продукції секретованого білка в підживлюваній культурі клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO), що включає культивування клітин лінії CHO, яка надекспресує MDM2<sup>D300A</sup> і E1B19K, а також одного або декількох генів, що кодують секретований білок.

35 Також об'єктом винаходу є спосіб підвищення продукції секретованого білка в підживлюваній культурі клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO), що включає культивування клітин лінії CHO, яка надекспресує MDM2 і E1B19K, а також одного або декількох генів, що кодують секретований білок.

40 Також об'єктом винаходу є ізольований поліуклеотид, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, приведену в SEQ ID NO: 4.

Також об'єктом винаходу є ізольований поліпептид, що містить послідовність, приведену в SEQ ID NO: 4.

Докладний опис винаходу

45 Всі публікації, які згадуються в даному описі, включаючи патенти і патентні заявки, але не обмежуючись ними, включені шляхом посилань, є частиною цього документа, ніби, якби вони були викладені безпосередньо в цьому документі. Використовувані в даному описі і в формулі винаходу форми однини вказують на множинні об'єкти, якщо інше не виходить явно з контексту. Наприклад, при вживанні поняття "поліпептид" мається на увазі один або декілька поліпептидів, а також еквівалентні поняття, відомі фахівцям.

50 Під позначенням MDM2 в цьому документі мається на увазі ген MDM2 людини (гомолог MDM2 p53-зв'язувального білка), що має поліпептидну послідовність, занесену в базу даних GenBank під номером NP\_002383 (SEQ ID NO: 1 і 2).

55 Під позначенням E1B19K в цьому документі мається на увазі людський білок E1B19K, що має поліпептидну послідовність, занесену в базу даних GenBank під номером NP\_004322 (Номера SEQ ID: 5 і 6).

60 Під поняттям "апоптозні<sup>R</sup> гени" в цьому документі маються на увазі гени, що кодують білки, які, при надекспресії в клітині, забезпечують підвищену стійкість до клітинної смерті в порівнянні з клітинами, що не піддавались трансфекції. Типовими апоптозними<sup>R</sup> генами є антиапоптозні члени сімейства Bcl-2, включаючи Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w або E1B19K, інгібітори каспаз, наприклад, сімейство IAP (інгібітори апоптозу), включаючи XIAP і XIAPΔ, а також інші білки, що беруть

участь в регуляції життєвого циклу клітини, наприклад, p27 і MDM2 (Arden et al., BioProcessing J. March/April 23-28 (2004); Sauerwald et al., Bioprocessing J. Summer 2002, 61-68 (2002); Arden et al., Biotechnol. Bioengineer. 97:601-614, (2007)). Частота виникнення клітинної смерті може бути оцінена добре відомими в сучасній науці способами, наприклад, шляхом визначення показника щільності життєздатних клітин (VCD) і процента (%) життєздатності, а також шляхом розрахунку інтегрованої щільності життєздатних клітин (IVCC). Активація апоптозу може бути оцінена шляхом визначення активності каспаз з використанням добре відомих способів.

Поняття "поліпептид" означає молекулу, що включає в себе щонайменше два амінокислотних залишки, зв'язаних пептидним зв'язком. Малі поліпептиди, що містять менше 50 амінокислотних залишків, можуть називатися "пептидами". Поліпептиди також можуть носити назву "білків".

Поняття "полінуклеотид" означає молекулу, що включає в себе ланцюжок нуклеотидів, ковалентно зв'язаних через цукрофосфатний кістяк або через іншу еквівалентну ковалентну хімічну структуру. Дволанцюжкові і одноланцюжкові молекули ДНК і РНК являють собою типові приклади полінуклеотидів.

Поняття "комплементарна послідовність" означає другу ізольовану полінуклеотидну послідовність, антипаралельну першій ізольованій полінуклеотидній послідовності, і що складається з нуклеотидів, комплементарних нуклеотидам першої полінуклеотидної послідовності. Як правило, такі "комплементарні послідовності" при контакті з першою ізольованою полінуклеотидною послідовністю у відповідних умовах здатні до утворення дволанцюжкових полінуклеотидних молекул, таких як дволанцюжкові молекули ДНК або дволанцюжкові молекули РНК.

Поняття "вектор" означає полінуклеотид, здатний до подвоєння в біологічній системі або до переміщення між такими системами. Полінуклеотиди-вектори, як правило, містять елементи, такі як точки початку реплікації, сигнал поліаденілування або маркери вибору, що забезпечують дуплікацію або збереження таких полінуклеотидів в біологічній системі. Прикладами згаданих біологічних систем можуть служити клітини, віруси, тварини, рослини і реконструйовані біологічні системи, що використовують біологічні компоненти, здатні до подвоєння вектора. Полінуклеотидами, що включають в свій склад вектор, можуть бути молекули ДНК або РНК, або їх гібриди.

Поняття "вектор експресії" означає вектор, який може використовуватися в біологічній системі або реконструйованій біологічній системі для прямої трансляції поліпептиду, закодованого полінуклеотидною послідовністю, що міститься у векторі експресії.

У цьому документі поняття "підживлювана культура клітин" означає культуру клітин, що вирощується на основі подачі лімітуючого зростання поживного субстрату в культуру. Стратегія підживлювання, як правило, використовується в біопромислових процесах для досягнення високої щільності клітин в біореакторі. Для підвищення життєздатності і, в кінцевому результаті, продуктивності підживлених культур клітин була розроблена множина стратегій. У даному винаході описується альтернативний підхід, при якому використовується надекспресія комбінації апоптозних<sup>R</sup> генів в клітині-хазяїні. Клітини, в яких, завдяки біоінженерії, здійснюється надекспресія як MDM2, так і E1B19K, продемонстрували несподівано високий приріст виробництва секретованих білків, враховуючи опубліковані результати, згідно з якими експресія тільки MDM-2 дозволяла підвищити продуктивність максимум в 2 рази (Arden et al., Biotechn. Bioengin. 97:601-614, 2007), а експресія E1B19K, хоча і дозволяла інгібувати апоптоз і поліпшити показники відтворення клітин, не призводила до підвищення продуктивності синтезу секретованих білків клітиною (WO2007/124106A2 °F Betenbaugh). Крім того, клітинні лінії, виведені в ході досліджень, описаних нижче в Прикладах, у яких спостерігалася надекспресія тільки E1B19K, характеризувалися показниками росту нижче оптимальних і низькими рівнями експресії. Таким чином, даний винахід демонструє помітний позитивний вплив спільної експресії MDM2 і E1B19K на продуктивність синтезу секретованих білків в клітинах ссавців.

Даний винахід також описує штучний мутантний ген MDM2, що знайшов застосування в реалізації способів, які є об'єктами винаходу.

Одним з варіантів здійснення винаходу є спосіб підвищення життєздатності клітин в підживлюваній культурі клітин ссавців, що включає культивування лінії клітин ссавців, надекспресуючих один або декілька апоптозних<sup>R</sup> генів, і оцінку життєздатності клітин.

Способи, які є об'єктом винаходу, корисні для підвищення життєздатності підживлених культур клітин ссавців, таких як культури клітин яєчників китайського хом'ячка (CHO), культури клітин мієломи або гібридомних клітин. Зокрема, способи, які є об'єктом винаходу, корисні для підвищення показника інтегрованої чисельності життєздатних клітин (IVCC) в культурах клітин CHO. Клітинні лінії, які застосовуються при реалізації способів, що є об'єктами винаходу,

характеризуються експресією одного або декількох апоптозних<sup>R</sup> генів. Зокрема, можуть використовуватися гени, що кодують MDM2 (SEQ ID NO 1 і 2), MDM2<sup>D300A</sup> (SEQ ID NO 3 і 4), E1B19K (SEQ ID NO: 5 і 6), Aven (SEQ ID NO: 7 і 8), Bcl-LX (SEQ ID NO: 9 і 10), Bcl-2Δ (SEQ ID NO: 11 і 12), XIAPΔ (SEQ ID NO: 13 і 14). Експресія апоптозних<sup>R</sup> генів може бути досягнута за допомогою методик трансфекції, відомих фахівцям. Створювані клітинні лінії, що є чудовими клітинами-хазяїнами для отримання виробничих клітинних ліній, експресуючих необхідні білки, такі як пептиди, пептиди злиття, фактори росту, гормони, антитіла, сконструйовані білки з анкіриновими повторами (DARPin) і іншими використовуваними поліпептидами для рішення терапевтичних, діагностичних і дослідницьких задач. У число ліній клітин CHO, що використовуються в реалізації способів, які є об'єктами винаходу, входять лінії CHO-K1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) і CHOK1SV (Lonza Biologics, Slough, UK). У число ліній клітин мієломи, що використовуються в реалізації способів, які є об'єктами винаходу, входять лінії NS0 і Sp2/0.

У даному винаході використання клітинних ліній, які надекспресують апоптозні<sup>R</sup> гени, дозволяє досягти значень показника IVCC, що приблизно в два рази перевищують аналогічний показник для контрольних клітин, збільшити тривалість існування підживлених культур на термін до 7 днів і підвищити продукцію секретованих білків в 2-7 разів. Таке підвищення продуктивності є значним і може дозволити знизити витрати на виробництво складних біологічних продуктів, при одночасному отриманні продукту більш високої якості завдяки відсутності клітинного лізису нежиттєздатних клітин, оскільки лізовані клітини можуть вивільняти протеази, що погіршують якість продукту. Відповідно, ці лінії є чудовими клітинами-хазяїнами для отримання виробничих клітинних ліній, які експресують необхідні білки. Наприклад, клітинна лінія CHO, яка надекспресує MDM2<sup>D300A</sup>, дозволяє досягти 2-кратного збільшення значень показника IVCC і зберігає життєздатність на 7 днів довше в порівнянні з контрольною клітинною лінією.

Іншим варіантом здійснення винаходу є спосіб підвищення продукції секретованих білків в підживлюваній культурі клітин CHO, що включає культивування клітинної лінії CHO, яка надекспресує щонайменше один апоптозний<sup>R</sup> ген, а також одного або декількох генів, що кодують секретований білок, з визначенням титру секретованого білка. Особливо прийнятними клітинними лініями для здійснення способів, що є об'єктами винаходу, є лінії CHO, які надекспресують MDM2 і E1B19K, і клітинна лінія, яка надекспресує тільки MDM2<sup>D300A</sup>. Використання цих клітинних ліній при реалізації способів, що є об'єктом винаходу, дозволяє підвищити титри секретованих білків в 5-7 разів при застосуванні підживлюваної культури з терміном існування до 21 дня.

Надекспресія білків в клітині, як короточасна, так і стабільна, може бути досягнута добре відомими способами (Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001).

У даному винаході також представлені ізольовані мутантні полінуклеотиди MDM2, вектори, що включають в себе ці полінуклеотиди, ізольовані клітини-хазяї, поліпептиди, які можуть бути отримані при експресії даних полінуклеотидів, способи експресування поліпептидів, які є об'єктом винаходу, і способи використання полінуклеотидів і поліпептидів, які є об'єктами винаходу. Сполуки і способи, які є об'єктами винаходу, можуть використовуватися в різних галузях. Корисність полінуклеотидів і векторів, які є об'єктами винаходу, зумовлена тим, що вони кодують мутантні поліпептиди MDM2 і можуть використовуватися для експресування цих поліпептидів. Корисність мутантних поліпептидів MDM2 зумовлена можливістю їх використання для підвищення життєздатності клітин і збільшення виробництва секретованих білків клітинами шляхом рекомбінантного досягнення надекспресії або впровадження в клітини тварини або тканини-хазяї іншим способом.

Одним з об'єктів винаходу є ізольований полінуклеотид, що містить послідовність, приведена в SEQ ID NO: 3 або комплементарну послідовність. Полінуклеотидна послідовність, приведена в SEQ ID NO: 3, кодує поліпептид, який являє собою мутантний людський MDM2<sup>D300A</sup>. У MDM2<sup>D300A</sup>, передбачуваний сайт розщеплення каспаз (AspValProAspCysLysLys), що виявляється у MDM2 дикого типу, був знищений для надання MDM2 більшій стійкості до розпаду і, відповідно, досягнення більш високих концентрацій MDM2 в клітині в ході культивування. Полінуклеотиди, які є об'єктом винаходу, можуть бути отримані шляхом хімічного синтезу, такого як твердофазний синтез полінуклеотидів, в автоматичному синтезаторі полінуклеотидів. Або полінуклеотиди, що є об'єктом винаходу, можуть бути отримані з використанням інших методик, таких як ПЛР-дуплікація, векторна дуплікація або методики маніпуляції ДНК з використанням рестрикційних ферментів. Методики виробництва або отримання полінуклеотидів із заданою послідовністю добре відомі в сучасній науці.

Полінуклеотиди, які є об'єктом винаходу, також містять щонайменше одну некодуючу послідовність, таку як транскрибовані, але не трансльовані послідовності, сигнали термінації, сайти зв'язування рибосоми, послідовності, що стабілізують мРНК, інтрони і сигнали поліаденілування. Полінуклеотидні послідовності також можуть включати в себе додаткові

послідовності, що кодують додаткові амінокислоти. Такі додаткові полінуклеотидні послідовності можуть, наприклад, кодувати маркер або мітку, наприклад, гексагістидиновий пептид (Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:821-284 (1989) або гемаглютинінову пептидну мітку (Wilson et al., Cell 37:767-778 (1984)), які сприяють очищенню складних білків, отриманих шляхом злиття.

Іншим об'єктом винаходу є вектор, що містить ізольований полінуклеотид, що має

послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3. Вектори, які є об'єктом винаходу, використовуються для збереження полінуклеотидів, подвоєння полінуклеотидів або керування експресією поліпептидів, що кодуються вектором, в біологічних системах, включаючи реконструйовані біологічні системи. Вектори можуть мати хромосомальне, епісомальне і вірусне походження, до них можуть належати вектори, отримані з бактерійних плазмід, бактеріофагів, транспозонів, епісом дріжджів, вставних елементів, хромосомальних елементів дріжджів, бакуловірусів, паповавірусів, таких як SV40, вірусів коров'ячої віспи, аденовірусів, вірусів пташиної віспи, вірусів псевдосказу, пікорнавірусів і ретровірусів, а також вектори, отримані з комбінацій вказаних вище елементів, такі як косміди і фагміди.

Вектори, які є об'єктом винаходу, можуть бути представлені в формі мікрочастинок з допоміжними речовинами, ліпідами, буферними речовинами або іншими наповнювачами, в залежності від конкретної галузі застосування.

У одному з варіантів здійснення винаходу вектор являє собою вектор експресії. Вектори експресії, як правило, містять елементи послідовності нуклеїнових кислот, які дозволяють контролювати, регулювати, активувати або допускати експресію поліпептидів, що кодуються даним вектором. Такі елементи можуть містити сайти зв'язування енхансера транскрипції, сайти ініціації РНК-полімерази, сайти зв'язування рибосом і інші сайти, що сприяють експресії закодованих поліпептидів в даній експресійній системі. Такі експресійні системи можуть бути клітинними або безклітинними системами, добре відомими в сучасній науці. Елементи послідовностей нуклеїнової кислоти і послідовностей вихідного вектора, прийнятні для використання в процесі експресії закодованих поліпептидів, також добре відомі в сучасній науці. Прикладом плазмідного вектора експресії поліпептидів, які є об'єктом винаходу, може служити вектор, що включає в себе точку початку реплікації з *E. coli*, ген резистентності до канаміцину за рахунок *aph(3')*-1a, промотор негайного раннього типу з інтроном А з гена HCMV, синтетичну поліА-послідовність і термінатор з гена бичачого гормону росту. Іншим прикладом плазмідного вектора експресії може служити вектор, що містить точку початку реплікації з *E. coli*, ген резистентності до канаміцину за рахунок *ant(4')*-1a, довгі кінцеві повторювані послідовності з вірусу саркоми Рауса, промотор негайного раннього типу з гена HCMV і пізню поліА-послідовність SV40.

Іншим варіантом здійснення винаходу є ізольовані клітини-хазяї, що мають вектор, який є об'єктом винаходу. У числі репрезентативних приладів клітин-хазяїв можна назвати клітини архей; бактерійні клітини, такі як *Streptococci*, *Staphylococci*, *Enterococci*, *E. coli*, *Streptomyces*, ціанобактерії, *B. subtilis* і *S. aureus*; клітини грибів, таких як *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Basidiomycete*, *Candida albicans* або *Aspergillus*; клітини комах, таких як *Drosophila* S2 і *Spodoptera* Sf9; клітини тварин, такі як CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1, клітини меланоми Боуеса і мієломи; клітини рослин, такі як клітини голонасінних і покритонасінних. Клітини-хазяї для реалізації способів, які є об'єктами винаходу, можуть постачатися у вигляді індивідуальних клітин або популяцій клітин. Популяції клітин можуть являти собою ізольовані або культивовані популяції, або клітини можуть знаходитися в матриксі (тканині).

Введення полінуклеотиду, такого як вектор, в клітину-хазяя може бути зроблено за допомогою способів, добре відомих фахівцям (Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). До цих способів належать трансфекція з використанням фосфату кальцію, трансфекція з обробкою DEAE-декстраном, мікроін'єкція, трансфекція через катіонні ліпіди, електропорація, трансдукція, введення при зішкрібанні, балістичне введення та інфікування.

Іншим варіантом здійснення винаходу є ізольований поліпептид, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4. Послідовність SEQ ID NO: 4 являє собою поліпептид, який є варіантом людського білка MDM2 із заміщенням D300A. Поліпептиди, які є об'єктом винаходу, можуть бути отримані шляхом хімічного синтезу, такого як твердофазний синтез пептидів, в автоматичному синтезаторі пептидів. Поліпептиди, які є об'єктом винаходу, можуть бути

отримані на основі полінуклеотидів, що кодують ці поліпептиди з використанням безклітинних експресійних систем, таких як експресійні системи на основі лізату ретикулоцитів, експресійні системи на основі пшеничних зародків і експресійні системи на основі *Escherichia coli*. Поліпептиди, які є об'єктом винаходу, також можуть бути отримані шляхом експресії та ізоляції з клітин - носіїв нуклеотидної послідовності, що є об'єктом винаходу, з використанням методик, добре відомих в сучасній науці, таких як рекомбінантна експресія поліпептидів, що легко ізолюються з афінними мітками. Існують і інші методики отримання поліпептидів, які є об'єктом винаходу. Поліпептиди, які є об'єктом винаходу, можуть включати в себе поліпептиди злиття, що являють собою поліпептиди, які є об'єктом винаходу, об'єднані з другим поліпептидом. Таким другим поліпептидом може бути лідерна або секреторна сигнальна послідовність, пре-, про- або препробілкові послідовності, а також природні або частково синтетичні послідовності, отримані частково з природних послідовностей, або повністю синтезовані штучно.

Іншим варіантом здійснення винаходу є спосіб експресії поліпептидів, що включає стадії отримання клітини-хазяїна, що є об'єктом винаходу; культивування клітини-хазяїна в умовах, достатніх для експресії щонайменше одного поліпептиду, який має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4.

Клітини-хазяї можуть культивуватися в будь-яких умовах, прийнятних для підтримки або збільшення чисельності даного типу клітин і достатніх для експресії поліпептиду. Умови культивування, середовище і відповідні способи обробки, достатні для експресії поліпептидів, добре відомі в сучасній науці. Наприклад, багато типів клітин ссавців можуть культивуватися в аеробному середовищі при 37 °C з використанням відповідного забуференого середовища DMEM, тоді як клітини бактерій, дріжджів і деякі інші можуть культивуватися при 37 °C при відповідних атмосферних умовах з використанням середовища LB.

Експресія поліпептиду в рамках способів, які є об'єктом винаходу, може бути підтверджена з використанням різних методик, добре відомих в сучасній науці. Наприклад, експресія MDM2<sup>A300D</sup> може бути підтверджена методом вестерн-блотингу або шляхом оцінки здатності MDM2<sup>A300D</sup> до інгібування каспаз.

Нижче приведені приклади, що описують даний винахід, але не обмежують його.

Приклади

У наступних Прикладах був проведений аналіз ліній клітин CHO, які надекспресують апоптозні<sup>R</sup> гени в культурах у струшуваний колбі визначалася пікова щільність життєздатних клітин, тривалість існування культури, активація каспаз 3/7 і підвищення виробництва секретованих білків.

Матеріали і способи:

Культура клітин:

Лінія клітин CHOK1SV (Lonza Biologics, Slough, UK), взята як контрольна клітинна лінія C1013A, і лінія CHOK1 (American Type Culture Collection, Manassas, USA), взята як контрольна клітинна лінія C1835 культивувалися в середовищі CD-CHO (№ в каталозі: 10743-011, Invitrogen, Carlsbad, CA), що містить 30 mM глюкози з добавкою 6 mM L-глутаміну (Invitrogen, № в каталозі: 10313-021). В деяких випадках використовувалася інше тваринне безбілкове середовище, що містить різні речовини в різних концентраціях, включаючи 60 mM глюкози (високоглюкозне середовище). Ембріональна бичача сироватка була замовлена в Hyclone Labs, Logan, UT (№ в каталозі: SH30071.03). Культури клітин піддавались аналізу за допомогою автоматичного лічильника клітин Cedex (Innovatis, Germany). Інтегрована чисельність життєздатних клітин (IVCC, клітин на день/мл) обчислювалася за наступною формулою:

$$IVCC(d1) = [VCD(d0) + VCD(d1)]/2 + VCD(d0),$$

де VCD = щільність життєздатних клітин

Вектори експресії:

Кодуюча послідовність Bcl-2Δ (SEQ ID NO: 11) була клонована з використанням промотору CMV з отриманням вектора pCDNA<sup>TM</sup>3.1(+) з Neo®. Кодуюча послідовність Bcl-XL (SEQ ID NO: 9) була клонована з використанням промотору CMV з отриманням вектора pCDNA<sup>TM</sup>3.1(+) з Zeo®. Кодуюча послідовність MDM2 (SEQ ID NO: 3) була клонована з використанням промотору CMV з отриманням вектора pCDNA<sup>TM</sup>3.1(+) з Neo®. Був описаний вектор pBUDCE4.1, розроблений для конститутивної експресії E1B-19K (промотор EF-1a), окремо або в поєднанні з Aven (промотор CMV) (Nivitchanyong et al., Biotechnol. Bioeng. 98:825-841 (2007)). Був описаний вектор, який експресує XIAPΔ (промотор CMV) (Sauerwald et al., Biotechnol. Bioeng. 77:704-716 (2002)). Вектор експресії MDM2<sup>D300A</sup> був отриманий шляхом мутагенезу in vitro з вектора експресії MDM2. Модельний вектор експресії антитіл (Ab № 1) був сконструйований шляхом клонування важкого і легкого ланцюгів кДНК в глутамінсинтазний (ГС) вектор експресії (отриманий з Lonza Biologics, Slough, UK, по дослідницькій ліцензії).



Створення апоптозних<sup>R</sup> клітинних ліній:

Була проведена трансфекція різних сполучень векторів експресії в клітини експонентної культури CHOK1SV, як показано на таблиці 1. Трансфектами відбиралися з використанням поєднання гідроміцину 400 мкг/мл, гентицину 400 мкг/мл, або зеоцину 300 мкг/мл. Приблизно 200 отриманих трансфектом були перенесені на 24-ячковий планшет, потім була проаналізована активність каспаз 3/7 за допомогою аналізу APO-ONE (Promega, Madison, WI). Проводилося два вимірювання: а) в фазі раннього росту (~3-й день після посіву) після обробки стауроспорином, що провокує апоптоз; і б) пізніше в фазі росту (~10-й день після посіву), в цей момент субпопуляція клітин дикого типу перейшла в фазу апоптозу. У обох випадках була продовжена культивування трансфектом, що знижувала активність каспаз 3/7, перші два чотири клони були піддані дослідженням профілю росту в умовах струшування напівбезперервної культури.

Лінії клітин, що продемонстрували багатообіцяючі результати, були заморожені. Культури відібраних ліній у струшуваних колбах тестувалися на зниження активності каспаз 3 методом FLOW, з використанням антитіл з флуоресцентними мітками, специфічних до каспази 3 (BD Bioscience; № в каталозі: 68652X/550557). Відібрані клітинні лінії були піддані С-кодуванню і вміщені в банк клітин. Ці лінії клітин пройшли від 10 до 15 етапів дослідження стабільності за відсутності антибіотиків, які використовувалися як агенти відбору. Отримані клітинні лінії перераховані в таблиці 1. Для відбраного набору клітинних ліній експресія кожного трансгена була підтверджена з допомогою вестерн-блотингу.

Таблиця 1

Лінія клітин	Надекспресований ген
B-31	Bcl-2Δ
BX-61	Bcl-2Δ і XIAPΔ
BMX-13 і BMX-39	Bcl-2Δ, MDM2 і XIAPΔ
Bx-51	Bcl-XL
BxMX-01, BxMX-11 і BxMX-25	Bcl-XL, MDM2 і XIAPΔ
EM-15 і EM-70	E1B19K і MDM2
EAX-197	E1B19K, AVEN і XIAPΔ
EA-167	E1B19K і AVEN
C1013A	відсутнє
BM	MDM2 і Bcl-2Δ;
BxM	MDM2, Bcl-XL
EMX-	MDM2, E1B19K, XIAPΔ

Культури апоптозних<sup>R</sup> клітин у струшуваних колбах:

Відібрані апоптозні<sup>R</sup> клітинні лінії культивувалися в напівбезперервному режимі в середовищі CD-CHO з додаванням 6 мМ глутаміну і необхідних агентів відбору антибіотиків. Середовище CD-CHO мало в своєму складі 30 мМ глюкози. Крім того, вибрані Ab-експресуючі лінії клітин піддавалися культивуванню в спеціально створеному тваринному безбілковому середовищі з добавкою 6 мМ глутаміну і 60 мМ глюкози.

Аналіз активності каспаз 3/7:

Був проведений посів приблизно по  $3 \times 10^5$  клітин кожного клону в 1 мл поживного середовища на 24-ячковий планшет. На 4-й день після посіву (d4) близько  $1 \times 10^5$  клітин було перенесено на 96-ячковий планшет. До клітин, інкубованих протягом 16 годин до проведення аналізу активності каспаз 3/7 з використанням аналітичного комплексу APO-ONE kit (BD Labs), був доданий стауроспорин (2 мкМ fc). Процедура була повторена на 10-й день, за винятком додавання стауроспорину. Клоні, що мали значно нижчу активність каспази 3/7 в обидва вказаних дні, були перенесені у струшуваних колби. Апоптозний<sup>R</sup> характер відібраних клонів був підтверджений аналізом методом проточної цитометрії (див. нижче).

Аналіз апоптозних<sup>R</sup> клонів за допомогою проточної цитометрії:

З кожної струшуваної колби на 24-ячкові планшети було перенесено близько  $1 \times 10^6$  клітин з експонентних культур, проведена інкубація зі стауроспорином (2 мкМ fc) протягом 16 годин,

клітини відібрані і один раз промиті в фосфатно-сольовому буферному розчині. Потім клітини були піддані інкубації з CytoPerm (№ в каталозі: 2075KK, BD BioScience) з метою досягнення їх фіксації і проникності. Після відмивання в фосфатно-сольовому буферному розчині клітини інкубувались з FITC-міченими антитілами до каспазі 3 (№ в каталозі: 68654, BD BioScience) перед аналізом методом проточної цитометрії.

#### Приклад 1

Вплив MDM2 на лінії клітин, які експресують Bcl-2Δ

Був проведений аналіз профілів росту (струшування/напівбезперервна культура) ліній BMX-13 і BMX-39, які експресують Bcl-2Δ, MDM2 і XIAPΔ, а також двічі підданих трансфекції ліній клітин BX-61, які експресують Bcl-2Δ і XIAPΔ, B-31, які експресують тільки Bcl-2Δ, і контрольної лінії C1013A. Пікова чисельність життєздатних клітин (VCD) для контрольної лінії клітин досягла величини  $6 \times 10^6$  клітин/мл, тоді як для клонів BMX цей показник становив  $11 \times 10^6$  клітин/мл. Клітинні лінії, які експресують Bcl-2Δ і (або) XIAPΔ, характеризувалися проміжними значеннями VCD (фіг. 1A). Клоні BMX мали вищі значення показника інтегрованої чисельності життєздатних клітин (IVCC) в порівнянні з B-31 або BX-61. Для BMX-39 спостерігалось підвищення IVCC над контрольними значеннями на 44 %, в порівнянні з 23 % для B-31. Для XIAPΔ не було відмічено підвищення IVCC при використанні в поєднанні з Bcl-2Δ (фіг. 1B). Високі показники IVCC корелюють з високою життєздатністю клітин в тривало існуючих культурах в біореакторі, що призводить до підвищення виходу продукту, що виробляється. Крім того, біофармацевтичні речовини, вироблені клітинними лініями, отриманими від апоптозних<sup>R</sup> клітин-хазяїв, можуть мати вищу якість. Для клітинних ліній BMX-13 і BMX-39 було відмічено зниження активності каспаз 3/7 в 10 разів і 16 разів відповідно в порівнянні з контрольною лінією C1013A, що підтверджує антиапоптозний вплив генів, включених в лінію клітин CHO. Лінії B-31 і BX-61 характеризувалися зниженням активності каспаз в 12 і 6 разів.

#### Приклад 2

Вплив MDM2 на лінії клітин, які експресують Bcl-XL

Була проведена оцінка профілів росту тричі підданих трансфекції ліній BxMX-01, BxMX11 і BxMX-25, які експресують Bcl-XL, MDM2 і XIAPΔ, в порівнянні з Bx-51, яка експресує тільки Bcl-XL, а також з контрольною лінією клітин C1013. Пікова чисельність життєздатних клітин (VCD) для контрольної лінії клітин досягла величини  $6 \times 10^6$  клітин/мл, тоді як для клонів BxMX цей показник досяг величини приблизно  $12 \times 10^6$  клітин/мл (фіг. 2A). Клітинні лінії, які експресують тільки Bcl-XL, характеризувалися проміжними значеннями VCD. Наприклад, пікове значення параметра VCD для клітинної лінії Bx-51 становило  $10 \times 10^6$  клітин/мл. Клоні BxMX характеризувалися вищими значеннями IVCC в порівнянні з Bx-51, приріст IVCC відносно контрольного рівня становив 34 %, в порівнянні з 18 % для Bx-51 (фіг. 2B). Ко-трансфекція тільки Bcl-XL і MDM2 (без XIAPΔ) не призвела до отримання клітинних ліній з підвищеним значенням VCD або із збільшеною тривалістю існування культури (дані не приводяться). Таким чином, ймовірно, що XIAPΔ і MDM2 діють синергетично відносно досягнення високих значень IVCC, що спостерігаються для ліній клітин BxMX-01, BxMX-11 і BxMX-25. Було показано, що активність каспаз 3/7 знизилася в 7, 5, і 8 разів для ліній BxMX-01, BxMX-11 і BxMX-25, відповідно в порівнянні з контрольною лінією C1013A.

#### Приклад 3

Вплив MDM2 на лінії клітин, які експресують E1B19K

На фіг. 3 показані профілі росту ліній EM-15 і EM-70, які експресують E1B19K і MDM2. Для порівняння, в окремий експеримент були включені клітинні лінії, які експресують E1B19K і AVEN (EA-167), або експресують E1B19K, AVEN і XIAPΔ (EAX-197), а також лінія клітин-хазяїв, C1013A. Пікова чисельність життєздатних клітин (VCD) для контрольної лінії клітин досягла величини  $6 \times 10^6$  клітин/мл, тоді як для клонів EM ця величина склала від  $12 \times 10^6$  клітин/мл до  $16 \times 10^6$  клітин/мл. Максимальне значення VCD для EA-167 і EAX-197 становило  $13,6$  і  $13,9 \times 10^6$  клітин/мл. Клоні EM характеризувалися вищим значенням IVCC в порівнянні з EA-167 або EAX-197. Для лінії EM-70 було відмічено 100 % підвищення IVCC відносно контрольного значення, в порівнянні з 23 % підвищенням для EA-167. Ці дані, нарівні з тим фактом, що клітинні лінії, які експресують тільки E1B19K, не можуть забезпечити досягнення високих значень IVCC, що спостерігаються в даному експерименті (Nivitchanyong et al., Biotechnol Bioeng 98:825-841 (2007)), дозволяють зробити висновок, що MDM2 вносить внесок в підвищення значення IVCC, що спостерігається для ліній клітин EM-15 і EM-70. Ко-трансфекція E1B19K, MDM2 і XIAPΔ не призвела до отримання клітинних ліній з порівняно підвищеними значеннями VCD або IVCC (дані не приводяться). Активність каспази 3/7 для ліній EM-15 і EM-70 становила 13 % і 30 %, відповідно, відносно активності для контрольної лінії C1013A. Для порівняння, EA-167 і EAX-197 характеризувалися активністю каспази 3/7 37 % і 20 % відносно активності для контрольної лінії

C1013A. Дані по апоптозу були підтверджені аналізом FLOW, описаним вище. 91 % контрольних клітин дали позитивний результат на каспазу 3/7, тоді як в лініях, які експресують апоптозні<sup>R</sup> гени, лише 1-30 % клітин були позитивними на каспазу 3/7. Лінії клітин з найменшими значеннями активності каспази 3/7 (наприклад, B-31) не обов'язково демонстрували найвищі значення IVCC.

#### Приклад 4

##### Клонування і експресія мутанта MDM2

Вектор, який експресує повнорозмірну кДНК людського MDM2 дикого типу (номер в базі даних Genbank: M92424.1), був отриманий в Університеті Джона Хопкінса. Вектор, який експресує MDM2<sup>D300A</sup>, був створений шляхом мутагенезу in vitro з використанням праймера мутагенезу 5' gctgaagagggttt gatgtgccggcttga aaaaaaactatagtg 3' (SEQ ID NO: 15), зміни полягали в заміні А на С в позиції 899 і заміні аспарагінової кислоти на аланін у відповідному білку MDM2<sup>D300A</sup>. Результат мутагенезу був підтверджений за допомогою секвенування. Послідовність ДНК MDM2<sup>D300A</sup> приведена в SEQ ID NO: 3, амінокислотна послідовність теоретично розрахованого для MDM2<sup>D300A</sup> білка приведена в SEQ ID NO: 4. Новий мутантний вектор, так само, як і варіант дикого типу, використовувався для короточасних і стабільних трансфекцій.

Білки MDM2<sup>D300A</sup> і MDM2 диких типів короточасно експресувались в клітинах Hek293. Аналіз методом вестерн-блотингу показав наявність високого вмісту MDM2<sup>D300A</sup> в клітинах в порівнянні з диким типом MDM2, що дозволяє зробити висновок, що мутантний білок є більш стійким до протеолітичного розпаду, ніж дикий тип білка MDM2.

#### Приклад 5

##### Створення ліній клітин, які експресують MDM2<sup>D300A</sup>

Стабільні клітинні лінії, які надекспресують білок MDM2<sup>D300A</sup> або WT MDM2, створювалися відповідно до опису, приведенного в Прикладі 1. Використовувалися дві лінії клітин-хазяїв: C1013A і C1835A. Список клітинних ліній, використаних в дослідженнях профілів росту, приведений в таблиці 2.

Таблиця 2

Лінія клітин	Хазяїн	Трансфектні гени
A3	C1013A	WT MDM2
A4	C1013A	WT MDM2
B1	C1013A	MDM2D300A
B5	C1013A	MDM2D300A
C7	C1835A	WT MDM2
C8	C1835A	WT MDM2
D6	C1835A	MDM2D300A
D7	C1835A	MDM2D300A
	C1013A	Пул клітин MDM2 дикого типу
	C1013A	Пул клітин MDM2A00D
	C1013A	відсутній
	C1835A	відсутній
EM70	C1013A	E1B19K, MDM2
C1013H	C1013A	Bcl2d
C1013J	C1013A	Bcl-XL
C1013K	C1013A	E1B19K, Aven, XIAPd
BMX13	C1013A	Bcl-2d, MDM2, XIAPd

#### Приклад 6

##### Вплив MDM2 на тривалість існування культури і життєздатність ліній клітин-хазяїв CHOK1

Профілі росту і життєздатність (струшування/напівбезперервна культура) клітинних ліній D6, B1 і B5, отриманих на основі ліній C1013A і C1835A і експресуючих генів MDM2<sup>D300A</sup>, показані на фіг. 4. При використанні патентованого безбілкового середовища Centocor пікове значення щільності життєздатних клітин (VCD) для контрольної лінії клітин C1013A становило  $8 \times 10^6$  клітин/мл, а для контрольної лінії клітин C1835A  $5 \times 10^6$  клітин/мл. Для клітинних ліній, які надекспресують MDM2<sup>D300A</sup>, було відмічено збільшення тривалості існування культури в порівнянні з контрольними лініями. У підживлених культурах лінії B1 і B5 зберігалися в культурі до 20 днів, тоді як клітини-хазяї, що не піддавались трансфекції, а також клітини, отримані із

загального пулу після трансфекції MDM2<sup>D300A</sup>, втрачали життєздатність на 14-й день культивування (фіг. 5).

#### Приклад 7

Стабільність клітинних ліній CHO, які надекспресують MDM2

- 5 Лінії клітин CHO D6 і B5, отримані на основі ліній C1013A і C1835A, що демонструють надекспресію MDM2<sup>D300A</sup>, були піддані 15-етапному дослідженню стабільності в умовах наявності і відсутності агента відбору, генетицину. На початку і в кінці дослідження стабільності була розглянута крива росту для кожної лінії клітин, і відмічалось значення пікової щільності життєздатних клітин (як показник, що характеризує стабільність). Культури без генетицину і при
- 10 проходженні останніх етапів дослідження демонстрували еквівалентні або вищі значення VCD, що говорить про високу стабільність за відсутності реактиву відбору (таблиця 3).

Таблиця 3

Пікове значення VCD для ліній клітин, які надекспресують MDM2 (15-етапне дослідження стабільності)

	Пікове значення VCD (10 <sup>6</sup> /мл)
MUT B5 (-) генетицин (p1)	6,7
MUT B5 (+) генетицин (p1)	6,4
MUT B5 (-) генетицин (p15)	9,1
MUT B5 (+) генетицин (p15)	7,3
MUT D6 (-) генетицин (p1)	4,6
MUT D6 (+) генетицин (p1)	4,5
MUT D6 (-) генетицин (p15)	4,6
MUT D6 (+) генетицин (p15)	5,4

#### 15 Приклад 8

Дослідження продуктивності з використанням ліній клітин-хазяїв, які надекспресують MDM2.

- Лінії клітин A4, які надекспресують MDM2, і B1, надекспресують MDM2<sup>D300A</sup>, були піддані трансфекції з використанням вектора експресії важкого і легкого ланцюгів рекомбінантних антитіл. Спочатку трансфекційна суміш була відібрана з використанням безглутамінового середовища, що містить добавки глутамінсинтетази і 25 мкМ MSX. Потім суміш була посіяна на середовище Methocult для ізоляції індивідуальних клонів. Приблизно 100 отриманих трансфектом на одну трансфекцію були перенесені на 24-ямковий планшет, після 14 днів було проведено визначення титру шляхом нефелометрії. Середній титр для ліній MDM2 і MDM2<sup>D300A</sup>,
- 20 які експресують CNTO328, становив 90 мг/л, а для клонів, отриманих з C1013A, цей показник був істотно нижчим і становив 21,3 мг/л.

- 25 У окремому експерименті клітини CHOK1SV були піддані трансфекції MDM2 і E1B19K, а один клон, EM70, який стабільно експресує E1B19K і MDM2, був підданий трансфекції вектором експресії важкого і легкого ланцюгів рекомбінантних антитіл (Dorai et al., Biotechnol. Bioeng., 103:592-608 (2009). Спочатку трансфекційна суміш була відібрана з використанням безглутамінового середовища, що містить добавки глутамінсинтетази і 25 мкМ MSX. Для порівняння були взяті ще інші лінії клітин, включаючи C1013A (контроль), C1013M, C1013J, C1013K, A4, B5, BMX13. Після масового відбору протягом 29 днів клітини, що вижили,
- 30 досліджувалися в підживлюваній струшуваній культурі. Для лінії EM70 титр антитіл на 23-й день становив >700 мг/л, тоді як титри для інших ліній не перевищували 100 мг/л (фіг. 6).

Експонентна культура CHOK1SV була піддана трансфекції векторами, які експресують E1B19K і MDM2. Через два дні був запущений протокол відбору під дією антибіотиків. На 29-й день всі нетрансфекційні клітини були еліміновані, тоді як клітини, стійкі до антибіотика (трансфекційний пул) вижили.

5 Ці клітини були використані для проведення дослідження профілю росту в підживлюваній струщуваній культурі. Клітини в кількості  $2 \times 10^5$  клітин/мл були висіяні в середовище Mach-1, що містить добавки. Починаючи з 2-го дня, до культур щодня додавалася поживна суміш, що містить глюкозу і амінокислоти. Щодня проводилося визначення чисельності клітин і титру.

10 Тут приведений повний опис даного винаходу, з якого фахівцям, що мають звичайні знання в даній галузі, буде зрозуміло, що в описуванні об'єкти може бути внесена множина змін і модифікацій, які не виходять за межі суті і об'єму формули винаходу, що пропонується.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 15 1. Спосіб одержання секретованого білка в підживлюваній культурі клітин яєчників китайського хом'ячка (CHO), що включає культивування лінії клітин CHO, яка надекспресує MDM2, E1B19K і один або декілька генів, що кодують секретований білок, де титр одержаного секретованого білка складає щонайменше 600 мг/л на 23 день підживлюваної культури клітин.
- 20 2. Спосіб за п. 1, в якому лінія клітин CHO являє собою CHO-K1.
3. Спосіб за п. 1, в якому лінія клітин CHO являє собою CHO-K1SV.
4. Спосіб за п. 1, в якому секретований білок являє собою важкий ланцюг антитіла і легкий ланцюг антитіла.

---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601