

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение образует основание технологической платформы для получения рекомбинантных поликлональных белков, таких как белки из надсемейства иммуноглобулинов, например растворимые или мембраносвязанные формы В- и Т-клеточных рецепторов, для применения в качестве нового класса лекарственных средств для лечения, облегчения состояния или профилактики различных инфекций, воспалительных заболеваний, отторжения трансплантатов, злокачественных опухолей и аллергий.

Уровень техники изобретения

Для множества инфекционных заболеваний и злокачественных опухолей отсутствует эффективная терапия. Моноклональные антитела, как правило, безуспешно использовались против этих мишеней, частично из-за варибельности сложных мишеней и адаптивных мутаций белков-мишеней, что вызывает иммунный уход от узнавания моноклональным антителом. С другой стороны, поликлональные антитела способны нацеливаться на множество динамических мишеней, например на вирусы или раковые клетки. Кроме того, поликлональные антитела обладают самой высокой вероятностью поддержания активности в случае антигенной мутации.

Существуют различные коммерчески доступные терапевтические средства с поликлональными антителами, включая: 1) нормальный иммуноглобулин человека, выделенный из крови нормальных доноров людей; 2) гипериммунный иммуноглобулин человека, полученный из крови отдельных доноров людей, несущих антитела против специфической мишени заболевания, например, вируса, с которым они предварительно вступили в контакт либо путем заражения, либо через прививку; и 3) гипериммунный иммуноглобулин животного, полученный из крови иммунизированных животных.

Иммуноглобулин, выделенный из человеческой крови, на практике оказался эффективным против заражений вирусом гепатита В, респираторно-синцитиального вируса, цитомегаловируса и других вирусов герпеса, вируса бешенства, ботулинического токсина, и т.д., так же как в профилактике реус D новорожденных. Иммуноглобулин, выделенный из крови кроликов, иммунизированных человеческими Т-клетками, используется для обеспечения Т-клеточной иммуносупрессии при лечении или профилактике отторжения трансплантата (например, Тимоглобулин). Нормальный иммуноглобулин человека использовали для поддержания иммунной системы иммунодефицитных пациентов, так же как в терапии различных аутоиммунных нарушений.

Однако широкое распространение использования иммуноглобулина было ограничено из-за вынужденной поставки сырого материала донорской крови, проблем с изменчивостью от партии к партии и непостоянной безопасностью. В частности, иммуноглобулины, полученные из животных, встречают те же проблемы иммуногенности, которые наблюдались для полученных из животных моноклональных антител в 1980 и 1990-ых.

Наконец, как и в случае с другими продуктами крови, остается риск передачи возбудителей инфекции, таких как ВИЧ, вирусы герпеса или гепатита или прионы. Соответственно, в то время как клинические врачи признают, что поликлональные антитела являются предпочтительным терапевтическим средством в некоторых ситуациях, их использование было очень ограничено.

Новые подходы к производству иммуноглобулинов человека возникли с методиками трансгенных животных. Были получены трансгенные мыши, несущие человеческие локусы иммуноглобулина (патент США № 6111166). Эти мыши производят полностью человеческие иммуноглобулины, и антитела против определенной мишени могут быть стимулированы обычными методиками иммунизации. Однако большие выработки антитела ограничены из-за относительно небольшого размера мышей. Более крупных животных также сделали трансгенными посредством генов иммуноглобулина человека, например коров, овец, кроликов и кур (Kuroiwa, Y. и др. *Nature Biotechnology*; 2002; 20: 889-893). Однако получение поликлональных антител для терапии из крови таких животных не лишено трудностей. Во-первых, иммунофизиология животного и людей может демонстрировать значительные различия, что становится причиной различия в конечном иммунном репертуаре функциональной реаранжировке и многообразия гуморального ответа. Во-вторых, митотическая неустойчивость введенных локусов иммуноглобулина может повлиять на длительную продукцию антител. В-третьих, технически сложно удалить собственные локусы иммуноглобулина животного так, чтобы, например, продукция антитела животного не превысила продукцию антитела человека. В-четвертых, введение антител человека, продуцированных животными, сопровождается риском передачи возбудителей инфекции, таких как вирусы, прионы или другие патогены.

Соответственно, есть потребность в промышленных технологиях для производства рекомбинантных поликлональных белков, таких как антитела, в достаточно больших количествах и с минимальной изменчивостью от партии к партии для безопасных клинических применений. Для производства различных белков, включая моноклональные антитела, интерлейкины, интерфероны, фактор некроза опухоли, факторы свертывания крови VII, VIII и IX, были разработаны эффективные способы производства гомогенных рекомбинантных белков, использующие линии экспрессии клеток эукариот (в частности, млекопитающих). Многие из этих методов основаны на трансфекции и случайной интеграции представляющего интерес гена в геном клеточной линии экспрессии, с последующим отбором, амплификацией и харак-

теризацией высокопроизводительного клона для экспрессии и размножения этого клона как основной клеточной линии экспрессии.

Экспрессия встроенного чужеродного гена может оказаться под влиянием "эффектов положения" со стороны окружения геномной ДНК. Во многих случаях ген встраивается в сайты, где эффекты положения достаточно сильны, чтобы ингибировать синтез продукта введенного гена. Кроме того, экспрессия часто нестабильна из-за механизмов сайленсинга (то есть метилирования), прикладываемых со стороны окружающей хромосомной ДНК хозяина.

Для экспрессии гомогенной рекомбинантной белковой композиции были разработаны системы, обеспечивающие интеграцию и экспрессию представляющего интерес гена в клетках млекопитающего в определенном геномном положении (патент США, №№ 4959317 и 5654182; WO 98/41645; WO 01/07572). В WO 98/41645 описывается сайт-специфичная интеграция для производства линии клеток млекопитающего, которая секретирует, например, антитело. Однако эта экспрессия является моноклональной и нет никакого указания на то, что трансфекции могли быть осуществлены библиотекой векторов. И причем никак не предлагается поддерживать первоначальное многообразие, произведенное определенной комбинацией V_H - V_L в библиотеке.

Раскрытие вклада

Настоящее изобретение относится к решениям для получения продуцирующей линией клеток для экспрессии и продукции рекомбинантного поликлонального белка, при исключении значительного отклонения среди отдельных представителей, составляющих поликлональный белок.

Сверх того, настоящее изобретение не использует животных в производстве поликлонального белка, таким образом, устраняются этические и клинические трудности, связанные с такими подходами.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к способам получения рекомбинантной поликлональной продуцирующей линии клеток для производства рекомбинантного поликлонального белка, обычно выбираемого из надсемейства иммуноглобулинов. В особенности представляет интерес производство поликлональных антител, поликлональных Т-клеточных рецепторов или их поликлональных фрагментов. Настоящее изобретение предусматривает коммерческое производство рекомбинантного поликлонального белка для использования в фармацевтических композициях. Одна важная особенность изобретения заключается в том, что в ходе производственного процесса отклонение экспрессии отдельных молекул, составляющих поликлональный белок, сохраняется на незначительном уровне, сводя к минимуму нежелательную изменчивость от партии к партии.

Один аспект настоящего изобретения относится к способу производства представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка, в котором указанный поликлональный белок содержит (или состоит из) определенных представителей, которые связывают специфический антиген, причем указанный способ предусматривает: а) обеспечение коллекции клеток, содержащих библиотеку вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты, где каждая из указанных последовательностей нуклеиновой кислоты кодирует определенный элемент указанных поликлональных белков и где каждая из указанных последовательностей нуклеиновой кислоты интегрирует в один и тот же единственный сайт генома каждой отдельной клетки в указанной коллекции клеток; б) культивирование указанной коллекции клеток при условиях, способствующих экспрессии указанного поликлонального белка; и с) выделение указанного экспрессированного поликлонального белка из клеточной культуры, фракции клеток или культуральной среды клетки.

Дальнейший аспект настоящего изобретения относится к способу производства коллекции клеток, подходящих в качестве рекомбинантной поликлональной продуцирующей линии клеток, причем указанный способ предусматривает: а) обеспечение библиотеки векторов, содержащей популяцию вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты, в которой каждый из указанных векторов содержит 1) одну единственную копию определенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей определенный элемент поликлонального белка, содержащего определенные элементы, которые связывают специфический антиген и 2) одну или более последовательностей узнавания рекомбиназы; б) введение указанной библиотеки векторов в линию клеток-хозяев, в которой геном каждой отдельной клетки указанной линии клетки-хозяина содержит последовательности узнавания рекомбиназы, соответствующие таковым из вектора, в отдельном специфичном сайте в его геноме; обеспечение наличия в указанных клетках одной или более рекомбиназ так, чтобы вариантные последовательности нуклеиновой кислоты стадии (а) сайт, специфичным образом интегрировали в клетки линии клеток-хозяев, где указанную одну или более рекомбиназу либо i) экспрессируют указанные клетки, в которые ввели указанную последовательность нуклеиновой кислоты; ii) эффективно кодируют векторы стадии (а); iii) обеспечивают посредством экспрессии от второго вектора; или iv) предоставляют клетке в виде белка; и d) селекцию клеток, содержащих интегрированную копию из указанной библиотеки вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты.

В обоих способах изобретения понимается, что поликлональный белок обычно представляет собой белок, который в природе не связан с клетками, в которых совершается экспрессия.

Настоящее изобретение описывает несколько способов, с помощью которых в линию клеток-хозяев

можно ввести библиотеку вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты, с тем чтобы получить коллекцию клеток, применимую в качестве поликлональной продуцирующей линии клеток. Эти способы включают полную трансфекцию коллекции клеток библиотекой, частичную трансфекцию определенных аликвот клеток фракциями библиотеки или индивидуальную трансфекцию, где клетки-хозяев трансфицируют отдельными элементами библиотеки, с последующим объединением клонов, произведенных при селекции. Предпочтительно настоящее изобретение в качестве линии клеток-хозяев использует клетки млекопитающего (линии клеток или типы клеток).

В одном аспекте настоящего изобретения отдельные элементы поликлонального белка кодируются парами независимых сегментов гена. Поликлональные белки, где отдельные элементы состоят из двух полипептидных цепей, включают растворимые или мембраносвязанные формы Т-клеточных рецепторов и антитела. В дальнейших воплощениях настоящего изобретения пара сегментов гена кодирует тяжелую цепь антитела и варируемую область легкой цепи, или альфа-цепь Т-клеточного рецептора и варируемую область бета-цепи, или гамма-цепь Т-клеточного рецептора и варируемую область дельта-цепи.

Настоящее изобретение дополнительно относится к рекомбинантной поликлональной продуцирующей линии клеток, содержащей коллекцию клеток, трансфицированных библиотекой вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты, в котором каждая клетка в коллекции трансфицирована и способна экспрессировать один элемент библиотеки, который кодирует определенный элемент поликлонального белка, который связывает специфический антиген и который расположен на том же единственном сайте в геноме отдельных клеток в указанной коллекции, в котором указанная последовательность нуклеиновой кислоты в природе не связана с указанной клеткой в коллекции. Данная линия клеток предпочтительно имеет происхождение от линии клеток млекопитающего, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки COS, клетки ВНК, клетки миеломы (например, клетки Sp2/0, NSO), YB2/0, NIH 3T3, фибробласт или иммортализованные клетки человека, такие как клетки HeLa, клетки HEK 293, или PER.C6. Однако также можно использовать эукариотические клетки, отличные от клеток млекопитающего, или прокариотические клетки, такие как растительные клетки, клетки насекомого, дрожжевые клетки, бактерии, грибы и т.д.

Также настоящее изобретение охватывает библиотеку векторов для сайт-специфичной интеграции, содержащей популяцию встречающихся в природе вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты, в которой каждый из указанных векторов содержит 1) одну копию определенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей определенный элемент поликлонального белка, который связывает специфический антиген, и 2) одну или более последовательностей узнавания рекомбиназы.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного ингредиента рекомбинантное поликлональное антитело (или его фрагмент) или поликлональный Т-клеточный рецептор (или его фрагмент), предпочтительно полученный способами в соответствии с настоящим изобретением. Рекомбинантный поликлональный белок композиции является специфическим или реагирующим на предварительно определенную мишень заболевания. Такие фармацевтические композиции могут использоваться для лечения, облегчения состояния или профилактики заболеваний, таких как злокачественные опухоли, инфекции, воспалительные заболевания, аллергия, астма и другие респираторные заболевания, аутоиммунные заболевания, иммунологические дисфункции, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания в центральной нервной системе, метаболические и эндокринные заболевания, отторжение трансплантата или нежелательная беременность у млекопитающего, такого как человек, домашнее животное или ручное животное.

Определения

Под "белком" или "полипептидом" следует понимать любую цепь аминокислот, независимо от длины или посттрансляционной модификации. Белки могут существовать как мономеры или мультимеры, содержащие собранные вместе две или более полипептидные цепи, фрагменты белков, полипептидов, олигопептидов или пептидов.

В используемом здесь смысле термин "поликлональный белок" или "поликлональность" относится к белковой композиции, содержащей различные, но гомологичные белковые молекулы, предпочтительно выбранные из надсемейства иммуноглобулинов. Таким образом, каждая белковая молекула является гомологичной по отношению к другим молекулам композиции, но также содержит один или более участков варируемой полипептидной последовательности, которую/которые характеризуют различиями в аминокислотной последовательности между отдельными элементами поликлонального белка. Известные примеры таких поликлональных белков включают антитело или молекулы иммуноглобулина, Т-клеточный рецептор и В-клеточный рецептор. Поликлональный белок может состоять из определенной субпопуляции белковых молекул, которую определили посредством общей особенности, такой как общая активность связывания с требуемой мишенью, например, в случае с поликлональным антителом, против требуемого антигена-мишени.

Термин "представляющий интерес поликлональный белок" охватывает определенную поликлональную белковую субпопуляцию, которая имеет общую особенность, такую как активность связывания с требуемой мишенью, например, в случае с поликлональными антителами, которые характеризуются

активностью связывания или специфичностью против антигена-мишени, причем указанный антиген, например, может быть одним или более из отдельных белков, микроорганизмов, паразитов, типов клеток, аллергенов, или углеводных молекул, или любых других структур, молекул, или веществ, которые могут быть мишенью специфичного связывания антитела, или смесей указанных антигенов.

Термины "один элемент рекомбинантной поликлональной белковой композиции" или "один элемент рекомбинантного поликлонального белка" обозначают одну белковую молекулу белковой композиции, содержащей различные, но гомологичные белковые молекулы, где каждая белковая молекула является гомологичной по отношению к другим молекулам композиции, но также содержит один или более участков варибельной полипептидной последовательности, которую/которые характеризуют различиями в аминокислотной последовательности между отдельными элементами поликлонального белка.

Термины "варибельная полипептидная последовательность" и "варибельная область" используются попеременно.

Термины "определенный элемент рекомбинантного поликлонального белка" обозначают одну белковую молекулу белковой композиции, содержащей различные, но гомологичные белковые молекулы, где каждая белковая молекула является гомологичной по отношению к другим молекулам композиции, но также содержит один или более участков варибельной полипептидной последовательности, которую/которые характеризуют различиями в аминокислотной последовательности между отдельными элементами поликлонального белка.

Термин "антитело" описывает функциональный компонент сыворотки и часто используется для обозначения либо набора молекул (антител или иммуноглобулина), либо одной молекулы (молекулы антитела или молекулы иммуноглобулина). Молекула антитела способна к связыванию или реагированию со специфической антигенной детерминантой (антигеном или антигенным эпитопом), которая в свою очередь, может привести к индукции иммунологических эффекторных механизмов. Отдельную молекулу антитела обычно считают моноспецифичной, и композиция молекул антитела может быть моноклональной (то есть состоять из идентичных молекул антитела) или поликлональной (то есть состоять из различных молекул антитела, реагирующих с одними и теми же или с различными эпитопами на одном и том же антигене или даже на определенных различных антигенах). Каждая молекула антитела имеет уникальную структуру, которая обеспечивает специфичное связывание с соответствующим ей антигеном, и все природные молекулы антител имеют одну и ту же полную основную структуру из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей. Собираетельно антитела также известны как иммуноглобулины. Также подразумевается, что термины "антитело" или "антитела" в используемом здесь смысле включают в себя химерные и одноцепочечные антитела, так же как и связывающие фрагменты антител, такие как фрагменты Fab, Fv или фрагменты scFv, а также мультимерные формы, такие как димерные молекулы IgA или пентавалентный IgM.

Термин "поликлональное антитело" описывает композицию различных молекул антитела, которые способны связывать или реагировать с несколькими различными специфическими антигенными детерминантами на одном и том же или на различных антигенах. Обычно считается, что варибельность поликлонального антитела размещена в так называемых варибельных областях поликлонального антитела. Однако в контексте настоящего изобретения поликлональность можно также понимать для описания различия между отдельными молекулами антитела, находящимися в так называемых константных областях как, например, в случае со смесями антител, содержащими два или более изотипа антител, такие как изотипы человека IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, или изотипы мыши IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, и IgA.

"Представляющее интерес рекомбинантное поликлональное антитело" описывает определенную рекомбинантную поликлональную субпопуляцию антител, которую характеризуют способностью связываться с требуемой мишенью или требуемым набором мишеней, причем указанные мишени, например, представляют собой отдельный белок, микроорганизм, паразита, клетку, аллерген, углеводную молекулу, или другую структуру, молекулу, или вещество, которое может быть мишенью специфичного связывания антитела, или их смесей.

Термин "иммуноглобулин" обычно используют как коллективное обозначение смеси антител, найденных в крови или сыворотке, но может также использоваться для обозначения смеси антител, полученных из других источников.

Термин "молекула иммуноглобулина" обозначает отдельную молекулу антитела, например, являющуюся частью иммуноглобулина, или частью композиции поликлонального или моноклонального антитела.

При указании, что элемент поликлонального белка связывается с антигеном, подразумевается связывание, имеющее константу связывания меньше 1 мМ, предпочтительно меньше 100 нМ, еще более предпочтительно меньше 10 нМ.

Термин "библиотека представляющих интерес вариантных молекул нуклеиновой кислоты" используют для описания набора молекул нуклеиновой кислоты, которые вместе кодируют "представляющий интерес рекомбинантный поликлональный белок". При использовании для трансфекции библиотека представляющих интерес вариантных молекул нуклеиновой кислоты содержится в библиотеке векторов

экспрессии. Такая библиотека обычно имеет по меньшей мере 3, 5, 10, 20, 50, 1000, 10^4 , 10^5 или 10^6 определенных элементов.

В используемом здесь смысле термины "одна копия представляющей интерес определенной последовательности нуклеиновой кислоты" не следует понимать буквально как отдельный участок нуклеиновых кислот, соответствующих отдельному сегменту гена, а скорее, как одну копию всех сегментов гена, необходимых для получения всех субъединиц одной молекулы представляющего интерес белка и собранных в одну молекулу нуклеиновой кислоты, такую как, например, вектор. Некоторые примеры, в которых, чтобы дать начало полной молекуле представляющего интерес белка, обычно требуется более чем один сегмент гена, включают В-клеточный рецептор, антитела и фрагменты антител, такие как Fab и вариабельные домены, или Т-клеточный рецептор. При введении в клетку сегменты гена, которые вместе кодируют полностью собранный представляющий интерес белок, находятся в одном и том же векторе, таким образом, оказываясь связанными в одной последовательности нуклеиновой кислоты, возможно, в виде отдельных элементов транскрипции под контролем различных промоторов.

Термин "представляющий интерес ген" в используемом здесь смысле относится к последовательности нуклеиновой кислоты, составленной из одного или более сегментов генов (геномных или кДНК), которые кодируют один элемент представляющего интерес белка. Форма множественного числа "представляющие интерес гены" относится к библиотеке последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих представляющий интерес поликлональный белок. Термин "GOI" используется как сокращение для представляющего (представляющих) интерес гена (генов).

В используемом здесь смысле термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, в которую может быть встроена последовательность нуклеиновой кислоты для переноса между различными генетическими окружениями и/или для экспрессии в клетке-хозяине. Вектор, способный к интегрированию в геном клетки-хозяина в заранее определенный специфический локус в геноме, в настоящем изобретении называют "вектором для сайт-специфичной интеграции". Если вектор несет регуляторные элементы для транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, встроенной в вектор (по меньшей мере, подходящий промотор), такой вектор в настоящем изобретении называют "экспрессирующим вектором". Если экспрессирующий вектор способен к интегрированию в заранее определенный, специфический локус в геноме клетки-хозяина, экспрессирующий вектор можно назвать "экспрессирующим вектором для сайт-специфичной интеграции". Если последовательность нуклеиновой кислоты, встроенная в указанные выше идентифицированные векторы, кодирует представляющий интерес белок, определенный в настоящем изобретении, используются следующие термины: "представляющий интерес вектор", "представляющий интерес вектор для сайт-специфичной интеграции", "представляющий интерес экспрессирующий вектор" и "представляющий интерес экспрессирующий вектор для сайт-специфичной интеграции". Термин "вектор, кодирующий изотип" относится к вектору, несущему последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие изотип антитела. В настоящей спецификации "фагмидный вектор" и "фаговый вектор" используется попеременно. Термины "плазмида" и "вектор" используются попеременно. Предполагается, что изобретение включает такие другие формы векторов, которые обслуживают эквивалентные функции, например плазмиды, фагмиды и вирусные геномы или любые молекулы нуклеиновой кислоты, способные к направлению выработки требуемого белка в подходящем хозяине.

Термин "каждый элемент библиотеки представляющих интерес векторов" используют для описания отдельных молекул вектора с определенной последовательностью нуклеиновой кислоты, полученной из библиотеки представляющих интерес векторов, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует один элемент представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка.

Термин "массовый перенос" используется для описания переноса представляющих интерес последовательностей нуклеиновой кислоты от одной популяции векторов к другой популяции векторов и выполнения этого для каждой ДНК одновременно, не прибегая к выделению отдельных представляющих интерес ДНК. Такие популяции векторов могут представлять собой библиотеки, содержащие, например, вариабельные области, промоторы, лидерные последовательности или представляющие интерес энхансерные элементы. Затем эти последовательности можно перенести без предварительного выделения, например, из фагового вектора в экспрессирующий вектор млекопитающего. В особенности для последовательностей антител эта методика гарантирует, что связь между многообразием V_H и V_L не будет потеряна, при переносе библиотеки, например, из вектора для селекции (например, вектора фагового дисплея) в экспрессирующий вектор млекопитающего. Таким образом, сохраняется первоначальное соединение V_H и V_L .

Термин "трансфекция" здесь используется в широком смысле введения чужеродной ДНК в клетку. Также подразумевается, что данный термин охватывает другие рабочие эквивалентные способы для введения чужеродной ДНК в клетку, такие как, например, трансформация, заражение, трансдукция или слияние донорской клетки и акцепторной клетки.

Термин "селекция" используют для описания способа, в котором клетки приобрели определенное свойство, делающее возможным отделение от клеток, которые не приобрели это свойство. Такие свойства могут представлять собой устойчивость к цитотоксическому агенту или продукцию необходимого питательного вещества, фермент или цвет.

Термины "ген селективируемого маркера", "ген маркера для селекции", "ген селекции" и "маркерный ген" используют для описания гена, кодирующего селективируемый маркер (например, ген, дающий устойчивость против некоторого цитотоксического препарата, такого как определенные антибиотики, ген, способный произвести необходимое питательное вещество, которое может быть изъято из среды для выращивания, ген, кодирующий фермент, продуцирующий поддающийся анализу метаболиты, или ген кодирующий цветной белок, который, например, может быть отсортирован с помощью FACS), который вводят в клетки совместно с представляющим интерес геном (генами).

Термин "рекомбинантный белок" используют для описания белка, который экспрессируется в линии клеток, трансфицированных экспрессирующим вектором, содержащим последовательность кодирования белка.

В используемом здесь смысле термин "функционально связанный" относится к сегменту, связанному с другим сегментом при переводе в функциональную зависимость с другим сегментом. Например, ДНК, кодирующая сигнальную последовательность, функционально связана с ДНК, кодирующей полипептид, если она экспрессируется как лидерная последовательность, которая участвует в переносе полипептида в эндоплазматический ретикулум. Кроме того, промотор или энхансер функционально связан с последовательностью кодирования, если он стимулирует транскрипцию последовательности.

Термин "большинство отдельных клеток" относится к процентному отношению клеток, такому как более чем 80%, предпочтительно более чем 85%, более предпочтительно 90, 95 или даже 99% или выше.

В используемом здесь смысле термин "геном" не следует понимать буквально как нормальную совокупность хромосом, присутствующих в клетке, но также и внехромосомные элементы, которые могут быть введены и поддерживаться в клетке. Такие внехромосомные элементы могут включать, без ограничений, минихромосомы, YAC (искусственные хромосомы дрожжей), MAC (искусственные хромосомы мыши) или HAC (искусственные хромосомы человека).

Термин "промотор" относится к области ДНК, участвующей в связывании РНК-полимеразы для инициирования транскрипции.

Термин "промоторы голова-к-голове" относится к паре промоторов, расположенных в непосредственной близости таким образом, что транскрипция двух генных фрагментов, управляемых промоторами, происходит в противоположных направлениях. Промотор голова-к-голове может также быть сконструирован со вставкой между этими двумя промоторами, составленной из сторонних нуклеиновых кислот. Такой фрагмент вставки вполне может содержать более 500 нуклеотидов.

"Ген устойчивости к антибиотику" представляет собой ген, кодирующий белок, который может компенсировать подавляющий или токсический эффект, который антибиотик оказывает на клетку, что гарантирует жизнеспособность и продленную пролиферацию клеток в присутствии антибиотика.

Термин "сайт внутренней посадки рибосом" или "IRES" описывает структуру, отличную от нормальной 5' кэп-структуры на мРНК. Обе структуры могут узнаваться рибосомой для инициации поиска AUG кодона, для инициации трансляции. При использовании одной промоторной последовательности и двух иницирующих AUG первая и вторая полипептидные последовательности могут транслироваться с одной мРНК. Таким образом, чтобы обеспечить совместную трансляцию первой и второй полинуклеотидных последовательностей с одной двухцистронной мРНК, первую и вторую полинуклеотидные последовательности можно транскрипционно объединить посредством линкерной последовательности, содержащей последовательность IRES, которая обеспечивает трансляцию полинуклеотида последовательности ниже последовательности IRES. В этом случае, транскрибированная двуцистронная молекула РНК будет транслироваться как с защищенных 5'-концов, так и с внутренней последовательности IRES двуцистронной молекулы РНК, чтобы таким образом получить как первый, так и второй полипептид.

Термин "индуцибельная экспрессия" используют для описания экспрессии, которая, для того, чтобы экспрессия имела место, требует взаимодействия молекулы-индуктора или выработки молекулы-корепрессора и регуляторного белка.

Термин "конститутивная экспрессия" относится к экспрессии, которая обычно не является индуцибельной.

Термин "рекомбиназа" относится к ферменту, который катализирует рекомбинацию между двумя или более сайтами рекомбинации. Рекомбиназы, применимые в настоящем изобретении, катализируют рекомбинацию на определенных сайтах рекомбинации, которые представляют собой специфические последовательности нуклеиновой кислоты, узнаваемые определенной рекомбиназой.

Термин "конкуренция" описывает ситуации, в которых отдельной клеткой экспрессируются два или более определенных элемента поликлонального белка, составленного из двух различных полипептидных цепей, например из надсемейства иммуноглобулинов. Эта ситуация может возникнуть, когда отдельная клетка интегрирует в геном более чем одну пару сегментов гена, где каждая пара сегментов гена кодирует определенный элемент поликлонального белка. В таких ситуациях могут возникнуть непредусмотренные комбинации полипептидных цепей, экспрессированных из сегментов гена. Эти непредусмотренные комбинации полипептидных цепей могут не обладать терапевтическим эффектом.

Термин "конкуренция цепей V_H-V_L" является примером конкуренции, определенной выше. В этом примере пару сегментов гена составляют сегменты V_H и V_L. Конкуренция происходит, когда непреду-

смотренные комбинации полипептидов V_H и V_L производит клетка, в которой две различных пары сегмента гена, кодирующего V_L и V_H , интегрируют в одну и ту же клетку. Такая конкурирующая молекула антитела, по всей вероятности, не сохранит первоначальную специфичность и, таким образом, не может обладать терапевтическим эффектом.

Термин "рекомбинантная поликлональная продуцирующая линия клеток" относится к популяции клеток экспрессирующих белок, которые трансфицированы библиотекой вариантов представляющих интерес последовательностей нуклеиновой кислоты таким образом, что отдельные клетки, которые вместе составляют рекомбинантную поликлональную продуцирующую линию клеток, несут только одну копию определенной представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует один элемент представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка, причем каждая копия интегрирует в один и тот же сайт генома каждой клетки. Клетки, составляющие рекомбинантную поликлональную продуцирующую линию клеток, отбирают по их способности сохранять интегрированную копию определенной представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты, например посредством селекции антибиотиком. Клетки, которые могут составить такую продуцирующую линию клеток, могут, например, представлять собой бактерии, грибы, эукариотические клетки, такие как дрожжи, клетки насекомых или клетки млекопитающих, в особенности иммортализованные линии клеток млекопитающих, такие как клетки CHO, клетки COS, клетки ВНК, клетки миеломы (например, клетки Sp2/O, NSO), NIH 3T3, YB2/O и иммортализованные клетки человека, такие как клетки HeLa, клетки HEK 293 или PER.C6.

Термин "горячая точка" как в выражении "линия клеток горячей точки" относится к предустановленному локусу генома клетки, которую отобрали или произвели и характеризовали для высокоэффективной транскрипции представляющей интерес интегрированной последовательности нуклеиновой кислоты при интеграции вектора экспрессии в тот сайт.

Термин "отклонение" используют для обозначения феномена в ходе выработки рекомбинантного поликлонального белка, в котором композиция поликлонального вектора, поликлональной линии клеток, или поликлонального белка изменяется в течение времени из-за случайных генетических мутаций, различий в кинетике пролиферации между отдельными клетками, различий в уровнях экспрессии между различными сконструированными последовательностями экспрессии или различий в эффективности клонирования ДНК.

Термин "RFLP" относится к "полиморфизму длины фрагмента рестрикции", способу, в соответствии с которым после расщепления ферментами рестрикции анализируют подвижную структуру геля фрагментов молекулы нуклеиновой кислоты.

Термин "HDS" относится к способу сортировки высокой плотности, в котором множество отдельных молекул проверяют параллельно на мембранах таким образом, что одновременно на данную активность исследуют большое количество испытываемых соединений.

В используемом здесь смысле "TaqMan PCR" относится к анализу PCR, основанному на системе TaqMan, описанной у Holland, P. M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 7276-7280 (1991).

Термин "5' UTR" относится к 5' нетранслируемой области мРНК.

Термин "Pfu PCR" относится к реакции PCR, выполненной с применением ДНК полимеразы Pfu (выделенной из *Rugosoccus fuliginosus*), которую используют, поскольку она имеет самую высокую точность среди известных теплоустойчивых полимераз.

Сокращения: "CMV" = Цитомегаловирус (человека). "MSPSV" = Миелопролиферативный Вирус Саркомы. "AdMLP" = Главный поздний промотор Аденовируса. SV40 поли A = сигнальная последовательность поли A Обезьяньего вируса 40. GFP = Зеленые Флуоресцентные Белки. PVDF = поливинилиден дифтор. TCR = Т-клеточный рецептор. ELISA = Твердофазный иммуноферментный анализ. LTR = Длинный концевой повтор.

Описание чертежей

Фиг. 1 - схематическое представление вектора экспрессии "промотора голова-к-голове", содержащего следующие элементы: Amp^r pro = промотор, обеспечивающий экспрессию гена устойчивости к ампициллину. Amp^r = ген устойчивости к ампициллину. pUC origin = начало репликации pUC. Сайты фермента рестрикции: NotI и EcoRI. Промотор A/Промотор B = кассета промотора голова-к-голове, включающего лидерные последовательности (например, CMV/MPSV). V Тяж. = Последовательность, кодирующая переменную тяжелую цепь GOI. C Тяжелая цепь = Последовательности, кодирующие константную тяжелую цепь (например, последовательности для константной тяжелой цепи IgG1 или IgG2B мыши). R-B-globin pA = Последовательность поли A β-глобина кролика. bGH полиA = Последовательность поли A бычьего гормона роста. V Каппа = Последовательность, кодирующая переменную каппа-цепь GOI. C Каппа-цепь = Последовательность, кодирующая константную каппа-цепь. FRT сайт = сайт рекомбинации FRT. Гигромицин = ген устойчивости к гигромицину. SV40 полиA = сигнальная последовательность поли A.

Фиг. 2 - схематическое представление вектора экспрессии для однонаправленной экспрессии, содержащего следующие элементы: Amp^r pro = промотор, обеспечивающий экспрессию гена устойчивости к ампициллину. Amp^r = ген устойчивости к ампициллину. pUC ori = начало репликации pUC. Промотор A

= промотор млекопитающего, включающего лидерные последовательности (например, AdMLP). V Тяж. = Последовательность, кодирующая вариабельную тяжелую цепь GOI. С Тяжелая цепь = Последовательности, кодирующие константную тяжелую цепь (например, последовательности для константной тяжелой цепи IgG1 мыши). hGH поли А = Последовательность поли А гормона роста человека. bGH полиА = Последовательность поли А бычьего гормона роста. V Каппа = Последовательность, кодирующая вариабельную каппа-цепь GOI. С Каппа = Последовательность, кодирующая константную каппа-цепь. FRT = сайт рекомбинации FRT. Гигромицин = ген устойчивости к гигромицину. SV40 поли А = сигнальная последовательность поли А. Последовательности hGH поли А и промотора А можно заменить структурой IRES.

Фиг. 3 - схема последовательности выполнения операций, подчеркивающая получение рекомбинантной поликлональной продуцирующей линии клеток и производство рекомбинантного поликлонального белка. 1) Иллюстрирует методику полной трансфекции; 2) иллюстрирует методику частичной трансфекции и 3) иллюстрирует методику индивидуальной трансфекции. А) Иллюстрирует библиотеку векторов (горизонтальные линии), стрелки иллюстрируют группировку векторов. В методике 1 векторы сгруппированы в полном объеме, в методике 2 они сгруппированы в меньших фракциях (в частичном объеме), тогда как в методике 3 они остаются отдельными друг от друга (индивидуальными). В) Иллюстрирует трансфекцию, в которой число пробирок зависит от группы векторов, составляющих библиотеку. С) Иллюстрирует селекцию клеток, которые сайт-специфичным образом интегрировали GOI в геном клетки-хозяина, Д) Иллюстрирует получение поликлонального запаса библиотеки GOI, где селектированные клетки, составляющие интегрированную библиотеку, сохраняют в морозильнике. Хранение отдельных клонов или объединение клонов не является обязательным. Е) Иллюстрирует начало фазы, в котором клоны из запаса размораживают (как по отдельности, так и из меньших фракций или из резерва) и адаптируют к росту в суспензии. Адаптацию к сывороточным свободным средам можно выполнять после стадии селекции или на этой стадии. F) Иллюстрирует стадию в выработке, в которой поликлональную линию клеток выращивают для высеваания в биореактор большего размера (промежуточные стадии отбора выступают в качестве опции, несмотря на то что не проиллюстрированы). В методике 2 и 3 представлена стадия, в которой запас клонов поликлональной клетки больше не сохраняют в виде отдельных клонов или частичных фракций, а объединяют в коллекцию клеток, образуя рекомбинантную поликлональную продуцирующую линию клеток. G) Иллюстрирует конечную выработку, полученную от производства биореактором. После фазы выработки поликлональную белковую композицию собирают для очистки и исследования продукта.

Фиг. 4 - схема последовательности выполнения операций, иллюстрирующая получение вектора экспрессии млекопитающего.

(А). Схематическое представление фагмидного вектора pSymvc10, который несет последовательность, кодирующую элемент GOI. P tac и P lacZ = бактериальная кассета промотора голова-к-голове. V каппа = последовательность, кодирующая вариабельную легкую каппа-цепь GOI. С Каппа-цепь = Последовательность, кодирующая легкую константную каппа-цепь мыши. V тяж. = Последовательность, кодирующая вариабельную тяжелую цепь GOI. С Тяжелая Цепь = Последовательность, кодирующая GH1 домен константной тяжелой цепи. Сайты ферментов рестрикции: EcoRI, NotI, SacI и XhoI. cpIII = фаговый белок III. Amp pro = промотор, обеспечивающий экспрессию гена устойчивости к ампициллину. Amp = ген устойчивости к ампициллину. pUC Ori= начало репликации pUC.

Стадия 1. Путем расщепления рестрикции посредством SacI и XhoI бактериальную кассету промотора можно вырезать из pSymvc10 и путем лигирования, заменить на кассету промотора млекопитающего (В), которую также приготовили путем расщепления рестрикции посредством SacI и XhoI. (С) Схематическое представление фагмидного вектора, pSymvc12, несущего последовательности из GOI, после обмена промоторами с кассетой промотора голова-к-голове млекопитающего. Промотор А/Промотор В = выбранная кассета промотора голова-к-голове (например, CMV/MPSV). V каппа = последовательность, кодирующая вариабельную легкую каппа-цепь GOI. С Каппа-цепь = Последовательность, кодирующая константную каппа-цепь мыши. V тяж. = последовательность, кодирующая вариабельную тяжелую цепь GOI. С тяжелая цепь = последовательность, кодирующая домен CH1 константной тяжелой цепи. Сайты ферментов рестрикции: NotI, SacI, XhoI и EcoRI. cpIII = фаговый белок III. Amp pro = промотор, обеспечивающий экспрессию гена устойчивости к ампициллину. Amp = ген устойчивости к ампициллину. pUC Ori= начало репликации pUC.

Стадия 2. Путем расщепления рестрикции pSymvc12 посредством EcoRI и NotI фрагмент нуклеиновой кислоты, содержащий все из: каппа, кассеты промотора и V тяж., можно вырезать из pSymvc12 и лигировать в вектор, кодирующий изотип, например, pSymvc20, который был также приготовлен путем расщепления рестрикции посредством EcoRI и NotI, получая, таким образом, экспрессирующий вектор млекопитающего pSymvc21 (Е).

(Е) Схематическое представление вектора экспрессии млекопитающего, pSymvc21, с вариабельными тяжелой и каппа- областями из GOI, для экспрессии антитела. Этот экспрессирующий вектор млекопитающего содержит следующие элементы: Amp pro = промотор, обеспечивающий экспрессию гена устойчивости к ампициллину. Amp = ген устойчивости к ампициллину. pUC Ori= начало репликации pUC.

Сайты ферментов рестрикции: NotI и EcoRI. Промотор A/Промотор B = выбранная кассета промотора голова-к-голове (например, CMV/MPSV). V каппа = V каппа-последовательность, кодирующая переменную легкую каппа-цепь GOI. C Каппа-цепь = последовательность, кодирующая константную легкую каппа-цепь млекопитающего (например, константную каппа-цепь мыши). V тяж. = V тяжелая последовательность, кодирующая вариабельную тяжелую цепь GOI. C Тяжелая цепь = Последовательности, кодирующие константную тяжелую цепь (например, последовательности для константной тяжелой цепи IgG1 мыши). R-B-globin pA = Последовательность поли A β -глобина кролика. bGH полиA = Последовательность поли A бычьего гормона роста. сайт FRT = сайт рекомбинации FRT. Гигромицин = ген для устойчивости к гигромицину. SV40 поли A = поли A последовательность SV40.

Закономерно, порядок стадий 1 и 2 может быть полностью изменен таким образом, что фрагмент от pSymvc10, содержащий все из каппа, бактериальной кассеты промотора и V тяж. можно вырезать из pSymvc10, с применением расщепления рестрикции EcoRI и NotI, который можно затем лигировать в вектор, кодирующий изотип, например pSymvc20. Затем на pSymvc20 можно провести обмен промоторами путем расщепления рестрикции с применением Sad и XhoI и лигирование с расщепленным SacI+XhoI фрагментом кассеты промотора млекопитающего, например, таким как фиг. 4B.

Фиг. 5 - гистограмма, показывающая распределение генотипа в клетках TG1, трансформированных Препаратом Плазмиды 1. Em 223-228 относятся к векторам с бактериальными промоторами, кодирующим анти- β_2 микроглобулин (анти-B2M), антищелочной фосфат (анти-AP), антиовальбумин (анти-OVA), анти-Фактор VIII (анти-FVIII), антилизозим (анти-LYS), антигаптоглобин (анти-HAP), соответственно. Em223-228 представляют векторы типа pSymvc10. Количество отдельных генотипов, совпавших со структурой фрагментов, определенной RFLP, соответствует количеству отдельных колоний среди общего количества выбранных колоний.

Фиг. 6 - гистограмма, показывающая распределение генотипа в клетках TG1, трансформированных Препаратом Плазмиды 2. Em 229-234 относятся к векторам с промоторами млекопитающего (CMV/MPSV), кодирующим анти- β_2 -микроглобулин (анти-B2M), антищелочной фосфат (анти-AP), антиовальбумин (анти-OVA), анти-Фактор VIII (анти-FVIII), антилизозим (анти-LYS), антигаптоглобин (анти-HAP), соответственно. Em 229-234 представляют векторы типа pSymvc12. Количество клонов представляет количество наблюдаемых клонов, которые совпадают со структурой последовательности, определенной RFLP этого типа Em (полный анализ последовательности не был выполнен).

Фиг. 7 - гистограмма, показывающая распределение генотипа в клетках TG1, трансформированных Препаратом Плазмиды 3. Em 235-240 относятся к мышинному вектору экспрессии IgG1 млекопитающего (включающему сигнал поли A β -глобина кролика) и кодирующему анти- β_2 -микроглобулин (анти-B2M), антищелочной фосфат (анти-AP), антиовальбумин (анти-OVA), анти-Фактор VIII (анти-FVIII), антилизозим (анти-LYS), антигаптоглобин (анти-HAP), соответственно. Et235-240 представляют векторы типа pSymvc21. Количество клонов представляет количество наблюдаемых клонов, которые совпадают со структурой последовательности, определенной RFLP этого типа Em (полный анализ последовательности не был выполнен).

Фиг. 8 - гистограмма, показывающая распределение генотипа в клетках TG1, трансформированных Препаратом Плазмиды двойного расщепления/лигирования (массовый перенос в экспрессирующей вектор млекопитающего без амплификации ДНК в *E. coli* после Приготовления Плазмиды стадии 1).

Фиг. 9 - гистограммы, показывающие распределение генотипа в клетках CHO-Flp-In, трансфицированных смесью векторов экспрессии млекопитающих, кодирующих шесть представляющих интерес генов на А) день 16 и В) день 34 после трансфекции.

Фиг. 10 - антиген-специфичный ELISA супернатантов, полученных из клеток CHO-Flp-In спустя 34 дня после полной трансфекции смесью векторов экспрессии, кодирующих шесть представляющих интерес генов.

Фиг. 11 - анти-каппа ELISA оболочки супернатантов, полученных резервов клеток CHO-Flp-In спустя 34 дня после трансфекции либо отдельным экспрессирующим вектором, кодирующим один представляющий интерес ген, либо смесью векторов экспрессии, кодирующих шесть представляющих интерес генов.

Фиг. 12 - количественный антиген-специфичный ELISA супернатантов, полученных из CHO Flp-In клона 019 на день 17, 31, 45, 59 и 73 после полной трансфекции смесью векторов экспрессии, кодирующих шесть представляющих интерес генов. А, В и С представляют три различных эксперимента трансфекции.

Фиг. 13 - антиген-специфичный ELISA супернатантов, полученных из клеточной культуры CHO Flp-In на день 8, 17, 30, 45, 57, 72 и 85 после смешивания CHO Flp-In линий клеток, экспрессирующих отдельные элементы библиотеки mini-six. Результаты показаны в виде среднего значения \pm SD трех независимых экспериментов.

Подробное описание изобретения

Рекомбинантная поликлональная белковая система экспрессии

Настоящее изобретение относится к способам для последовательного производства рекомбинант-

ных поликлональных белков, которые предпочтительно выбирают из надсемейства иммуноглобулинов, семейства белков с доменами, подобными иммуноглобулину. Большинство из этих элементов участвует в событиях узнавания поверхности клетки. Гомология последовательностей говорит о том, что антитела, Т-клеточный рецептор, молекулы МНС, некоторые молекулы клеточной адгезии и рецепторы цитокинов разделяют близкую гомологию. В особенности, для получения рекомбинантных поликлональных белков, в соответствии с настоящим изобретением, подходят элементы этого семейства, содержащие варибельные области. Такие элементы включают антитела, мембраносвязанные антитела (В-клеточный рецептор), фрагменты Fab, фрагменты Fv, фрагменты одноцепочечных Fv (scFv), Т-клеточный рецептор (TCR), растворимые TCR, фрагменты варибельных доменов TCR, фрагменты варибельных доменов TCR, фрагменты варибельных доменов TCR, связанные полипептидным линкером, или другие фрагменты, производные антител и TCR. В частности предполагается, что настоящее изобретение открывает возможность для крупномасштабного производства и получения нового класса терапевтических средств, содержащего рекомбинантные терапевтические поликлональные антитела или TCR.

Одно из главных преимуществ способа производства в соответствии с настоящим изобретением заключается в том, что все элементы, составляющие рекомбинантный поликлональный белок, можно получить в приблизительно 1-10 биореакторах или их эквивалентах. В дальнейшем в ходе процесса рекомбинантную поликлональную белковую композицию можно очистить из реактора в виде отдельного препарата без необходимости разделения отдельных элементов, составляющих рекомбинантный поликлональный белок. Напротив, если есть необходимость имитировать композицию рекомбинантного поликлонального антитела путем смешения очищенных моноклональных антител (как, например, предложено в WO 91/16074), то потребовалось бы, чтобы в композицию включили раздельное производство каждого антитела в биореакторе, и наиболее вероятно, чтобы антитела также очищали раздельно. Такое получение моноклональной смеси было бы очень дорогостоящим и требующим большего времени и места по сравнению с способом получения рекомбинантного поликлонального антитела или других поликлональных белков, как описано в настоящем изобретении. Таким образом, способ, как описано в WO 91/16074, по всей видимости, привел бы к практическому пределу до количества моноклональных антител, которые можно включить в такую смесь, наиболее вероятно, ниже 10, тогда как технология, в соответствии с описанием в настоящем изобретении, в общем, может производить поликлональное антитело с требуемым количеством отдельных элементов.

Чтобы получить прогнозируемую экспрессию рекомбинантного поликлонального белка из рекомбинантной поликлональной продуцирующей линии клеток, требуется достаточно хорошо понять регуляторные свойства геномного сайта интеграции.

Для получения рекомбинантного поликлонального белка нежелательна обычная трансфекция и методики экспрессии рекомбинантных белков с применением случайной интеграции, так как случайный характер процесса приведет к варьированию от клетки к клетке количества и положения интегрированных последовательностей нуклеиновой кислоты. Таким образом, если рекомбинантный поликлональный белок произведен в соответствии с такими традиционными протоколами, то это, вероятно, приведет к гетерогенной клеточной культуре с переменными скоростями экспрессии отдельных элементов поликлонального белка и генетической неустойчивости из-за позиционных эффектов интегрированной ДНК. Это, по всей вероятности, приведет к отклонению экспрессии элементов, составляющих поликлональный белок.

Поэтому желательно введение в заранее определенный геномный сайт, это, в принципе, может быть достигнуто посредством гомологичной рекомбинации. Однако вследствие доминирования событий запрессенной рекомбинации гомологичная рекомбинация очень неэффективна.

Кроме того, в тех случаях, где поликлональный белок представляет собой антитело или Т-клеточный рецептор (TCR), возникает другая проблема с применением обычных протоколов трансфекции, приводящих к случайной интеграции. Антитела и TCR кодируются парами независимых сегментов гена, последовательностями, кодирующими легкую и тяжелую цепь, для антител и последовательностями, кодирующими альфа- и бета-цепь или дельта- и гамма-цепь для TCR. Полипептидные продукты от этих сегментов гена становятся ковалентно связанными в ходе внутриклеточного процессинга молекулы антитела или TCR. Обычная технология трансфекции, приводящая к случайной интеграции, приводит к введению нескольких копий различных тяжелых и легких цепей или альфа- и бета-цепей в одной и той же клетке, что приводит к случайным комбинациям тяжелых и легких цепей, так называемая конкуренция V_H - V_L цепей или конкуренция альфа-бета цепей. Следовательно, это ухудшает работу экспрессированных антител или TCR, что становится причиной потери сродства и/или специфичности, возможному возникновению новых специфичностей и/или уменьшенной удельной активности.

Чтобы обойти эти проблемы, система экспрессии в соответствии с настоящим изобретением использует сайт-специфичную интеграцию в геном отдельных клеток-хозяев. Система в соответствии с настоящим изобретением гарантирует, что библиотеку представляющих интерес векторов содержащую, представляющие интерес варианты последовательности нуклеиновой кислоты, можно вставить в предварительно охарактеризованное положение в хромосоме в соответствии с опосредованной рекомбинацией процедурой обмена кассеты, таким образом, получая линию клеток, в которой отдельные клетки экс-

прессируют отдельный определенный элемент представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка. Как описано ниже, множественные интеграции могут встречаться в некоторых из клеток, составляющих рекомбинантную поликлональную продуцирующую линию клеток. Однако как полагается, это не создает проблему, в то время как большинство отдельных клеток экспрессирует отдельный определенный элемент рекомбинантного поликлонального белка.

Могут использоваться такие рекомбиназы, как Cre, Flp, бета-рекомбиназа, Gin, Pin, PinB, PinD, R/RS, лямбда интегразы, или фаговая интегразы ФС31. Подходящие рекомбиназы для интеграции в данное положение в хромосоме можно обеспечить либо (i) путем экспрессии из собственного генома клетки, в который ввели указанную последовательность нуклеиновой кислоты, (ii) путем активного кодирования последовательностью нуклеиновой кислоты, внесенной в клетку, (iii) путем экспрессии из второй молекулы нуклеиновой кислоты, либо (iv) в виде белка. В предпочтительном варианте выполнения вариантную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащуюся в представляющем интерес векторе интегрируют в локус, который служит посредником в высокоуровневой транскрипции и экспрессии представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты, так называемую "горячую точку".

Используемая линия клетки-хозяина предпочтительно представляет собой линию клетки млекопитающего, содержащую клетки, обычно используемые для биофармацевтической белковой экспрессии, например клетки CHO, клетки COS, клетки ВНК, клетки миеломы (например, клетки Sp2/O, NSO), YB2/O, NIH 3T3 и иммортализованные клетки человека, такие как клетки HeLa, клетки HEK 293 или PER.C6. В настоящем изобретении использовали клетки CHO. Однако специалист в данной области техники легко может заменить клетки CHO другими клетками млекопитающего? как описано, или даже использовать другие типы клеток, включая растительные клетки, дрожжевые клетки, клетки насекомых, грибы и бактерии. Таким образом, выбор типа клеток не подразумевает ограничения изобретением. В предпочтительном варианте выполнения для продуцирования используют клетки млекопитающего, содержащие предварительно охарактеризованную горячую точку, являющуюся посредником в высоких уровнях экспрессии представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка.

В дальнейшем варианте выполнения настоящего изобретения представляющие интерес вариантные последовательности нуклеиновой кислоты сайт-специфичным образом интегрируют с использованием того же хромосомного сайта интеграции в клетках-хозяевах. Такая инкорпорация в отдельный специфичный сайт сводит к минимуму позиционные эффекты, обнаруживаемые, в противном случае, случайной интеграцией или интеграцией в многократные сайты в геноме. Особенно, при экспрессии поликлональных белков, составленных из более чем одной полипептидной цепи, более того важно иметь в своем распоряжении отдельный сайт, в котором встречается сайт-специфичная интеграция в геном. Это связано с тем, что, если отдельная клетка экспрессирует более чем одну интегрированную молекулу, то, вероятно, будет встречаться конкуренция между субъединицами.

В сайт-специфичной системе интеграции отдельные клетки-хозяева экспрессируют идентичную полную белковую структуру, не считая различий, наблюдаемых в варибельной области представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка, например, в области антител или TCR, связывающей антиген. Вследствие этого большинство клеток в таком резерве клеток должно демонстрировать сходные свойства в отношении производительности и генетической стабильности, и, следовательно, эта технология предлагает возможность контролируемого получения, рекомбинантного поликлонального белка, например рекомбинантного поликлонального антитела или TCR.

Подразумевается, что рекомбинантный поликлональный белок в соответствии с настоящим изобретением охватывает белковую композицию, содержащую различные, но гомологичные белковые молекулы, которые по своей природе являются варибельными, это означает, что, в предпочтительных вариантах выполнения, библиотека вариантных нуклеиновых кислот содержит встречающееся в природе многообразие. Таким образом, каждая белковая молекула является гомологичной по отношению к другим молекулам композиции, но также содержит один или более участков варибельной полипептидной последовательности, который/которые характеризуют различиями в аминокислотной последовательности между отдельными элементами поликлонального белка. Различия в аминокислотной последовательности (аминокислотных последовательностях), которые составляют варибельную полипептидную последовательность, могут быть даже в одной аминокислоте. Предпочтительно различия в аминокислотной последовательности составляют более чем одну аминокислоту.

Обычно считается, что естественная варибельность поликлонального антитела или TCR расположена в так называемых варибельных областях или V-областях полипептидных цепей.

В одном аспекте настоящего изобретения отдельные элементы в поликлональном белке содержат варибельные области, которые составляют в длину приблизительно от 80 до 120 аминокислот. Варибельные области могут содержать гиперварибельные домены, например области, определяющие комплементарность (CDR).

Во встречающихся в природе TCR в каждой варибельной области есть четыре CDR. Во встречающихся в природе антителах есть три CDR в тяжелой цепи и три CDR в легкой цепи.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения варибельные области отдельных элементов поликлонального белка содержат по меньшей мере один гиперварибельный домен, который составляет

в длину от 1 до 26 аминокислот, предпочтительно от 4 до 16 аминокислот. Этот гипервариабельный домен может соответствовать области CDR3. Для антител каждая вариабельная область предпочтительно формирует три гипервариабельных домена. Они могут соответствовать CDR1, CDR2 и CDR3. Для TCR каждая вариабельная область предпочтительно формирует четыре гипервариабельных домена. Они могут соответствовать CDR1, CDR2, CDR3 и CDR4. Сами гипервариабельные домены могут формировать вариабельные последовательности в пределах вариабельной области рекомбинантного поликлонального белка в соответствии с настоящим изобретением.

В контексте настоящего изобретения вариабельность полипептидной последовательности (поликлональность) можно также понимать для описания различия между отдельными молекулами антител, находящимися в так называемых константных областях или С областях полипептидных цепей антител, например, как в случае смесей антител, содержащих два или более различных изотипа антител, такие как изотипы человека IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и IgA2, или изотипы мыши IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, и IgA. Таким образом, рекомбинантное поликлональное антитело может содержать молекулы антител, которые характеризуют различиями в последовательности между отдельными молекулами антитела в вариабельной области (V области) или в константной области (С области) или в обеих.

С тем чтобы обеспечить вариантные последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют белки, которые связывают специфический антиген, можно применять множество способов, известных в данной области техники. Как правило, в настоящем изобретении оказывается полезным применение процедуры скрининга, которая обеспечивает идентификацию и/или выделение нуклеиновых кислот, которые кодируют белок, которые связывают специфический антиген. Несколько из этих способов включают так называемую стадию биопэннинга, известную из таких технологий, как фаговый дисплей (Kang, A.S. и др. 1991. Proc Natl Acad Sci USA 88, 4363-4366), рибосомный дисплей (Schaffitzel, C. и др. 1999. J. Immunol. Methods 231, 119-135), ДНК дисплей (Cull, M.G. и др. 1992. Proc Natl Acad Sci USA 89, 1865-1869), РНК-пептидный дисплей (Roberts, R.W., Szostak, J.W., 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94, 12297-12302), ковалентный дисплей (WO 98/37186), бактериальный поверхностный дисплей (Fuchs, P. и др. 1991. Biotechnology 9, 1369-1372), поверхностный дисплей дрожжей (Boder, E.T., Wittrup, K.D., 1997. Nat Biotechnol 15, 553-557) и дисплей эукариотических вирусов (Grabherr, R., Ernst, W., 2001. Comb. Chem. High Throughput. Screen. 4, 185-192), способов, которые известны в уровне техники и представляют собой интересные вспомогательные средства в практике настоящего изобретения. FACS и магнитная сортировка частиц также применимы с целью обогащения (пэннинга) с применением меченого антигена. Также можно использовать иммунологические анализы, такие как ELISA (Dreher, M.L. и др. 1991. J. Immunol. Способы 139, 197-205) и ELISPOT (Czerkinsky, C.C. и др. 1983. J Immunol Methods. 65, 109-21), либо после стадии биопэннинга, либо в чистом виде.

Композиция представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка содержит определенную субпопуляцию белков, которые определяют посредством общей особенности, такой как общая активность связывания с требуемой мишенью, например, в случае с поликлональными антителами, против требуемого антигена-мишени. Обычно поликлональная белковая композиция включает по меньшей мере 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 1000, 10^4 , 10^5 или 10^6 определенных вариантных элементов. Количество определенных элементов, необходимых в поликлональной белковой композиции, будет зависеть от сложности мишени. В случае с антителом сложность антигена-мишени (антигенов-мишеней) будет влиять на количество определенных вариантных элементов, необходимых в поликлональной композиции антитела. При малых или не очень сложных мишенях, например малом белке, достаточно поликлональной композиции антител, которая содержит 3-100 определенных вариантных элементов, и предпочтительно, чтобы количество вариантов не превышало 90, или даже 80, или 70. Во многих примерах количество определенных вариантов не превышает 60 или 50 и предпочтительно, чтобы количество вариантов находилось в диапазоне между 5 и 40, например, между 5 и 30. Тогда как для более сложных мишеней, например вирусов со сложными или взаимозаменяемыми поверхностными белками, или охватывающими несколько вирусных подтипов, будет достаточно поликлональной композиции антител, которая содержит 20-500 определенных вариантных элементов. Для очень сложных мишеней, в которых антиген содержит много различных молекул, может потребоваться поликлональная композиция антител, содержащая 50-10000 определенных вариантных элементов.

У млекопитающих есть несколько известных примеров встречающихся в природе поликлональных белков как свободно циркулирующих в крови, как антитела или молекулы иммуноглобулина, так и присутствующих на поверхности клеток, как Т-клеточный рецептор и В-клеточный рецептор. У некоторых млекопитающих многообразие этих встречающихся в природе поликлональных белков достигается посредством генетической рекомбинации генов, кодирующих вариабельные области этих белков. Также известно, что антитела увеличивают свое многообразие посредством соматической мутации. Настоящее изобретение может использовать это природное многообразие путем выделения последовательностей, ответственных за многообразие (например, вариабельных доменов или областей CDR молекул иммуноглобулина или TCR) и получения из них библиотеки. Для белков, кодируемых из двух независимых сегментов гена, например вариабельной тяжелой цепи антитела и вариабельной легкой цепи, цепи TCR α и

цепи β или цепи TCR δ и цепи γ , каждый вектор в библиотеке составляет пару этих последовательностей, кодирующих переменные области. Получение библиотек пар последовательностей, кодирующих переменную область, известно в данной области техники.

Библиотеки, содержащие встречающееся в природе многообразие, например, представляют собой комбинаторные библиотеки (случайное объединение последовательностей, кодирующих переменную область) или библиотеки когнатных пар (пар последовательностей, кодирующих переменную область, полученных из одной и той же клетки). Также в настоящем изобретении применимы библиотеки, полученные из изолированных фрагментов генов CDR, которые включены в подходящую структуру (например, Soderlind, E. и др., 2000. Nat. Biotechnol. 18, 852-856), такую как антитело или переменная область TCR. Библиотеки предпочтительно исследуют для получения подбиблиотек (представляющих интерес библиотек) с требуемой специфичностью.

Многообразие белков может также быть создано искусственным способом, например синтетическим или посредством мутации. Мутации могут представлять собой либо случайные, либо точечные мутации последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей отдельный белок, таким образом, производя поликлональную популяцию одного белка. Другой пример получения искусственных библиотек антител описан в EP 0859841, способ, который основан на производстве библиотек структур переменной области, которая может быть объединена с другой библиотекой CDR.

В предпочтительном варианте выполнения изобретения рекомбинантный поликлональный белок представляет собой рекомбинантное поликлональное антитело или фрагмент антитела.

В другом предпочтительном варианте выполнения изобретения рекомбинантный поликлональный белок представляет собой рекомбинантный поликлональный фрагмент TCR или TCR.

В дополнение к многообразию, достигнутому путем генетической и соматической рекомбинации в так называемых переменных областях, есть различные изоформы иммуноглобулинов, которые определяют тяжелую цепью. Главные изоформы представлены IgM, IgG, IgA, IgD и IgE.

В связи этим рекомбинантный поликлональный белок соответствии с настоящим изобретением может также быть составлен из различных изоформ или более предпочтительно из различных подклассов. Поликлональность иммуноглобулинов может встречаться в константной части или в переменной домене молекулы иммуноглобулина или как в константной части, так и в переменной домене.

Поликлональность в так называемой константной области, особенно, тяжелой цепи антител, представляет интерес в отношении терапевтического применения антител. Различные изоформы иммуноглобулина имеют различные биологические функции (сведенные в табл. 1), которые может потребоваться объединить, при применении антител для лечения, поскольку различные изоформы иммуноглобулина могут быть вовлечены в различные аспекты естественных иммунных реакций (Canfield and Morrison 1991. J.Exp.Med. 173, 1483-91; Kumpel и др. 2002. Transfus.Clin.Biol. 9, 45-53; Stimadel и др. 2000. Epidemiol. Infect.124, 153-162).

Таблица 1. Биологические функции изоформ иммуноглобулина человека

	Иммуноглобулин человека								
	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	IgA ₁	IgA ₂	IgM	IgD	IgE
Классический путь активации комплемента	+++	++	++++	+	-	-	++++	-	-
Альтернативный путь активации комплемента	+	+	+	+++	+	-	-	+	-
Плацентарный перенос	+	++	+	++	-	-	-	-	-
Лизис бактерий	+	+	+	+	+++	+++	+	?	?
Связывание макрофага/ других фагоцитов		-	+	+	+	+	-	-	
Связывание тучной клетки/ базофилов	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Реактивность белка Стафилококка А	+	+	-	+	-	-	-	-	-

Дальнейший вариант выполнения настоящего изобретения основан на рекомбинантной поликлональной продуцирующей линии клеток, содержащей коллекцию клеток, трансфицированную библиотекой вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты, в которой каждая клетка в коллекции трансфицирована и способна к экспрессии одного элемента библиотеки, который кодирует определенный элемент поликлонального белка, который связывает специфический антиген и который расположен

на том же отдельном сайте в геноме отдельных клеток в указанной коллекции, в котором указанная последовательность нуклеиновой кислоты в природе не связана с указанной клеткой в коллекции.

В дополнительном варианте выполнения описанного выше варианта выполнения, все варианты последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие поликлональный белок (предпочтительно из надсемейства иммуноглобулина), получают из встречающихся в природе последовательностей, например, берут у донора.

Композиции клеток, которые содержат варианты нуклеиновые кислоты, расположенные в отдельном специфичном сайте в геноме в каждой клетке, описаны в WO 02/44361. Этот документ раскрывает применение клеток для идентификации молекул, имеющих требуемые свойства, но данная ссылка не обсуждает обеспечение системы для получения или обеспечения поликлонального белка, характеризующегося специфичным связыванием с антигеном.

Клональное многообразие

Одно из свойств поликлонального белка заключается в том, что он составлен из множества отдельных белковых молекул, где каждая белковая молекула является гомологичной по отношению к другим молекулам поликлонального белка, но также обладает вариабельностью, которую характеризуют различиями в аминокислотной последовательности между отдельными элементами поликлонального белка. Предпочтительно эти различия ограничиваются определенными зонами полной структуры поликлонального белка. Такие области, например, представляют собой вариабельную область антитела или TCR и, возможно, дополнительно ограничены областями CDR в этих зонах. Эту вариабельность можно также описать как многообразие, которое можно идентифицировать как на уровне нуклеиновой кислоты, так и на белковом функциональном уровне, например специфичности и различиях в сродстве к мишени.

Клональное многообразие линии клеток можно проанализировать с помощью RFLP (или секвенирования продуктов (RT)-PCR) на изолированных клонах от резерва клеток, экспрессирующих рекомбинантный поликлональный белок.

Многообразие также можно проанализировать с помощью функциональных тестов (например, ELISA) на рекомбинантном поликлональном белке, произведенном линией клеток.

Клональное отклонение (то есть постепенное изменение в композиции отдельных антител, составляющих поликлональное антитело), если оно существует, можно оценить путем сравнения клонального многообразия исходной библиотеки, используемой для трансфекции, с многообразием, обнаруженным в резерве клеток (линии клеток), экспрессирующих рекомбинантный поликлональный белок.

Клональное многообразие поликлонального белка, экспрессированного из линии клеток, может быть оценено как способность связывания мишени поликлональным белком. В этом случае считают, что достигается достаточное многообразие, когда приблизительно 25-100% требуемых молекул связывается поликлональным белком. Например, в случае поликлонального антитела достаточное многообразие в композиции обеспечивает связывание антитела по меньшей мере с 25% неидентичных эпитопов на поверхности антигена-мишени. Предпочтительно клональное многообразие по способности связывания мишени составляет по меньшей мере 50% и еще более предпочтительно по меньшей мере 75%. Для антител такую способность связывания мишени можно, например, оценить путем картирования эпитопов.

В качестве альтернативы, клональное многообразие можно оценить как распределение отдельных элементов поликлональной композиции. Это распределение можно оценить как общее количество различных отдельных элементов в конечной поликлональной белковой композиции по сравнению с количеством различных последовательностей кодирования, первоначально введенных в линию клеток в ходе трансфекции. В этом случае считают, что достигается достаточное многообразие, когда по меньшей мере 50% последовательностей кодирования, первоначально используемых в трансфекции, может быть идентифицировано как различные отдельные элементы конечных поликлональных белков и предпочтительно по меньшей мере 75%.

Распределение отдельных элементов поликлональной композиции можно также оценить относительно взаимного распределения среди отдельных элементов. В этом случае считают, что достигается достаточное клональное многообразие, если ни один отдельный элемент композиции не составляет более чем 75% общего количества отдельных элементов в конечной поликлональной белковой композиции. Предпочтительно ни один отдельный элемент не превышает 50%, еще более предпочтительно 25% и наиболее предпочтительно 10% общего количества отдельных элементов в конечной поликлональной композиции. Определение клонального разнообразия, основанное на распределении отдельных элементов в поликлональной композиции, можно выполнить с помощью анализа RFLP, секвенирования и белкового анализа, такого как подходы, описанные ниже для исследования поликлональной композиции.

Клональное многообразие может уменьшиться в результате клонального отклонения, которое может возникнуть а) в ходе процесса клонирования, б) в результате изменений в клеточной пролиферации, или с) из-за конкуренции интегрированных молекул. Если такие отклонения возникают, каждую из этих причин потери клонального многообразия легко исправить, прибегая к незначительным модификациям способов, описанных в настоящем изобретении.

С тем, чтобы ограничить отклонение, внесенное клонированием вариабельных доменов в подходя-

ших векторах, перенос представляющих интерес генов от одного вектора к другому можно разработать таким образом, чтобы ограничить отклонение клонирования. Методики массового переноса и тщательная селекция штамма *E. coli*, используемого для амплификации, могут уменьшить отклонение клонирования. Другая возможность заключается в том, чтобы выполнить отдельно перенос между векторами в соответствии с настоящим изобретением каждого полинуклеотида, кодирующего отдельный элемент поликлонального белка.

Возможно, что изменение в скоростях клеточной пролиферации отдельных клеток в линии клеток в течение длительного промежутка времени может внести отклонение в экспрессию рекомбинантного поликлонального белка, путем увеличения или уменьшения присутствия некоторых элементов рекомбинантного поликлонального белка, экспрессированного линией клеток. Одна причина для таких изменений в скоростях пролиферации может заключаться в том, что популяция клеток, составляющих исходную линию клеток, используемую для начальной трансфекции, является гетерогенной. Известно, что отдельные клетки в линии клеток развиваются по-разному в течение длительного промежутка времени. С тем, чтобы гарантировать более гомогенный исходный материал, субклонирование линии клеток до трансфекции представляющей интерес библиотекой может быть выполнено с применением серийных разведений линии клеток до уровня отдельных клеток и выращивании каждой отдельной клетки в новую популяцию клеток (так называемое субклонирование клеток путем серийных разведений). Затем одну или более из этих популяций клеток отбирают как исходный материал, основанный на их свойствах пролиферации и экспрессии.

Кроме того, давление отбора, который используют для того, чтобы гарантировать, что выживут только клетки, которые получили сайт-специфичные интегрированные молекулы, может повлиять на скорости пролиферации отдельных клеток в пределах поликлональной линии клеток. Это может произойти из-за поддержания клеток, которые претерпевают определенные генетические изменения с тем, чтобы адаптироваться к давлению отбора. Таким образом, выбор маркерного гена селекции может также повлиять на отклонение, вызванное скоростью пролиферации.

Если оно встречается, необходимо проверить различные маркерные гены селекции. В случаях, где селекция основана на токсичном для клеток веществе, необходимо тщательно проверить оптимальную концентрацию, так же как необходимость селекции в течение всего периода выработки или только в начальной фазе.

Дополнительный подход для того, чтобы обеспечить четкоопределенную популяцию клетки заключается в том, чтобы использовать сортировку клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) после процедур селекции и трансфекции. Флуоресцентно меченые антитела можно использовать для увеличения количества очень производительных клеток, полученных из резерва клеток, трансфицированных конструциями IgG (Brezinsky и др. J. 2003. *Immunol Methods* 277, 141-155). Этот способ можно также использовать для сортировки клеток, экспрессирующих сходные уровни иммуноглобулина, таким образом, создавая гомогенную относительно производительности популяцию клеток. Аналогично, путем применения мечения с помощью флуоресцентного красителя сукцинимидилового эфира 5,6-карбоксилфлуоресцеин диацетата (CFSE) клетки, демонстрирующие сходные скорости пролиферации, можно отобрать с применением способов FACS.

Даже если отклонение, вызванное скоростью пролиферации, проявляется, потеря или сверхпредставление отдельных элементов может не обязательно быть критическим, в зависимости от потребностей в многообразии конечного рекомбинантного поликлонального белкового продукта и устойчивости многообразия с течением времени.

В сайт-специфичных отдельных интегрированных молекулах между клетками будут различия только в последовательности переменных областей антител, которые должны быть экспрессированы. Поэтому различные клеточные эффекты, установленные вариацией в сайте интеграции и регуляторных элементах гена, устраняются и оказывают минимальные эффекты на скорость пролиферации клетки. По всей видимости, конкуренция и многократная интеграция не должны вызвать проблемы в скорости пролиферации продуцирующей линии клеток, так как они являются редкими событиями. Как правило, случайная интеграция встречается с эффективностью приблизительно 10^{-5} , тогда как сайт-специфичная интеграция встречается с эффективностью приблизительно 10^{-3} . Если многократная интеграция неожиданно представит проблему, альтернативой будет повтор трансфекции библиотекой представляющих интерес векторов, поскольку вероятность, что данный случай возникнет повторно, очень мала, как описано выше. Дополнительные альтернативы описаны в примере 3 ниже.

Другой метод борьбы с нежелательным клональным отклонением заключается в выполнении трансфекции всей библиотекой представляющих интерес векторов в нескольких подрезервах или разделении резерва клеток на ранней стадии после трансфекции на подрезервы. На этой стадии отклонение не должно стать значительным, и статистически должна быть возможность получения подрезервов, в которых отсутствуют клоны с нежелательным преимуществом в пролиферации. Получающееся исключение нежелательных клонов должно быть в согласии с требованиями многообразия в конечном рекомбинантном поликлональном белковом продукте. При рассмотрении статистики полная трансфекция большого количества клеток также предоставляет способ обхождения нежелательного клонального отклонения. В

этом подходе линию клетки-хозяина трансфицируют в полном объеме библиотекой вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты. Такая библиотека образует множество копий каждого определенного элемента библиотеки. Эти копии предпочтительно должны быть интегрированы в большое количество клеток-хозяев.

Предпочтительно по меньшей мере 100, 1000, 10000 или 100000 отдельных клеток должны быть трансфицированы копиями определенных элементов библиотеки вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты. Таким образом, если библиотека определенных вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты составлена из 1000 определенных элементов, каждый из которых интегрирован в 1000 отдельных клеток, в результате трансфекции должно появиться 10^6 клонов, содержащих сайт-специфичным образом интегрированный GOI. Таким образом, гауссовская кривая скоростей удвоения отдельных клеток должна влиять на общую популяцию только в очень малой степени. Это увеличивает вероятность поддержания композиции клонов постоянной в течение долгого времени, даже если аберрантный рост и/или свойства экспрессии показывает низкий процент от производящих клеток.

В качестве альтернативы, библиотеку представляющих интерес векторов можно разбить на фракции, содержащие приблизительно 5-50 отдельных векторов библиотеки. Предпочтительно фракция библиотеки составляет 10-15 отдельных векторов. Каждую фракцию затем трансфицируют в аликвоту клеток. Отдельные аликвоты клеток можно затем отслеживать в течение некоторого времени с тем, чтобы наблюдать, развивается ли клональное отклонение в любой из них. Если это случается, такие аликвоты клеток можно исключить до восстановления коллекции клеток путем объединения оставшихся аликвот клеток. В качестве опции, аликвоты клеток оставляют раздельными на протяжении всей выработки и поликлональную композицию антитела собирают путем объединения продуктов каждой аликвоты, а не аликвот клеток перед выработкой. Предполагается, что количество резервов, с которыми можно иметь дело, составит пять-десять (см. предыдущее описание моноклональных антител).

В качестве альтернативы можно осуществить способ с высокой производительностью, в котором клетки трансфицируют, отдельно с применением векторов и клеток, основанных на отдельных клонах из начальной библиотеки представляющих интерес векторов. Это может исключить любое возможное отклонение последовательности в ходе трансфекции и интеграции. В качестве опции можно генотипировать отдельные трансфектанты и собрать абсолютно разнообразный резерв клеток непосредственно перед получением или раньше, если это подходит. В качестве альтернативы отдельная трансфекция большого количества клеток, продуцирующих множество клонов с одним и тем же определенным элементом библиотеки вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты, может служить причиной таких же статистических преимуществ, какие описаны для полной трансфекции, когда индивидуально трансфицированные клетки объединяют до производства поликлонального белка.

Клетка-хозяин

Подходящая клетка-хозяин содержит в области генома один или более подходящий сайт рекомбинации, то есть последовательность нуклеиновой кислоты, распознаваемую одним или более ферментом-рекомбиназой. С тем чтобы была возможность отбирать на интегрированные молекулы (то есть клетки, имеющие интегрированную копию представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты в сайте интеграции), сайт рекомбинации функционально связывают с первым геном селекции (например, геном устойчивости к антибиотику), расположенным с 3'-конца от сайта рекомбинации. Кроме того, с 5'-конца от сайта рекомбинации может быть расположен слабый промотор (например, усеченный ранний промотор SV40) и кодон начала транскрипции, которые составляют неотъемлемую часть области кодирования маркера устойчивости. Таким образом, кодон начала транскрипции инициирует начало транскрипции гена селекции в клетке-хозяине перед трансфекцией библиотекой векторов экспрессии, кодирующих поликлональный белок.

Клетки-хозяев для сайт-специфичной интеграции, как описано выше, можно получить из любой клетки, которая может интегрировать ДНК в свои хромосомы или сохранить внехромосомные элементы, такие как минихромосомы, YAC (искусственные хромосомы дрожжей), MAC (искусственные хромосомы мыши), или HAC (искусственные хромосомы человека). MAC и HAC описаны подробно в WO 97/40183, таким образом, приведены в качестве ссылочного материала. Предпочтительно используют клетки млекопитающего, такие как клетки CHO, клетки COS, клетки ВНК, клетки миеломы (например, Sp2/O или клетки NSO), фибробласты, такие как NIH 3T3, и иммортализованные клетки человека, такие как клетки HeLa, клетки HEK 293 или PER.C6. Однако можно также использовать эукариотические клетки не млекопитающего или прокариотические клетки, такие как растительные клетки, клетки насекомых, дрожжевые клетки, грибы, *E. coli* и т.д.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения линию клеток для использования в качестве исходного материала субклонируют, выполняя так называемые серийные разведения линии клеток до уровня отдельных клеток, с последующим выращиванием каждой отдельной клетки в новую популяцию клеток до трансфекции библиотекой представляющих интерес векторов. Такое субклонирование можно также выполнить позднее в процессе отбора подходящей линии клеток, если это требуется.

Клетки-хозяев для сайт-специфичной интеграции можно получить путем трансфекции произвольно интегрирующей плазмидой, содержащей слабый промотор (например, усеченный ранний промотор

SV40), кодон начала транскрипции, сайт рекомбинации, расположенный с 3'-конца от стартового кодона. Предпочтительно плаزمиды интегрирования также содержат маркерный ген, присоединенный к первому гену селекции. Один пример такой плазмиды интегрирования представляет pFRT/LacZeo2 от Invitrogen (Carlsbad, CA). Маркерный ген можно использовать для оценки относительной интенсивности экспрессии в положении в геноме, используемом для того, чтобы встраивать представляющую интерес последовательность нуклеиновой кислоты. Маркерный ген (например, бета-галактозидаза (LacZ), зеленый флуоресцентный белок (GFP) или маркер клеточной поверхности) может быть связан с первым геном селекции в слиянии генов или транскрипционно связан IRES (сайт внутреннего присоединения рибосомы) таким образом, что происходит совместная экспрессия первого гена селекции и маркерного гена. Применение гена селекции, который устанавливает на клетки давление за счет выживания (например, устойчивость к препарату или истощение питательных веществ), объединенный с маркером, позволяющим сделать оценку относительных уровней экспрессии от линии клеток к линии клеток, представляет собой эффективный способ, чтобы обеспечить клетки с высоким уровнем выработки, которые поддерживают интегрированную плазмиду в геноме. Клетки с последовательностью рекомбинации, встроенной в области с особенно активной транскрипцией, приведут к высокой экспрессии маркерного гена, например GFP или LacZ. Клетки с высоким уровнем экспрессии можно отбирать с помощью сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) и клонировать. На этой стадии также должно быть проанализировано, является ли интегрированная молекула отдельной интегрированной молекулой. Это может быть выполнено с помощью PCR в реальном времени и Саузерн-блоттинга.

Другой способ оценки относительных уровней экспрессии клеток, трансфицированных плазмидой интегрирования, заключается в проведении дополнительной стадии интеграции-вырезания на клетках, полученных, как описано выше. Этот резерв отобранных клеток трансфицируют снова плазмидой, кодирующей рекомбиназу, соответствующую сайту рекомбинации плазмиды интегрирования и второй плазмиды, содержащей второй маркер селекции без стартового кодона, область кодирования которого предшествует последовательности рекомбинации, аналогично соответствующей первой плазмиде интегрирования. Эта вторая плаزمиды также содержит последовательность кодирования для флуоресцентного маркерного белка (например, GFP (или эквивалентных флуоресцентных белков), управляемую промотором млекопитающего. Рекомбиназа обеспечивает интеграцию этой плазмиды в геном клетки-хозяина, где подобную последовательность рекомбинации предварительно вставили с помощью интегрирующей плазмиды. Клетки с последовательностью рекомбинации, встроенной в области с особенно активной транскрипцией, приведут к высокой экспрессии флуоресцентного белка. Клетки с высоким уровнем экспрессии можно отбирать с помощью сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) и клонировать. Клоны с одинаково высоким уровнем экспрессии и содержащие одну копию встроенной плазмиды трансфицируют с помощью рекомбиназы и отбирают с помощью первого маркерного гена селекции, идентифицируя клетки, из которых вторая последовательность плазмиды была удалена рекомбиназой, что заставляет первый маркерный ген селекции снова работать. Эти клетки все еще содержат первую последовательность рекомбинации, встроенную в горячей точке транскрипции, и их можно теперь использовать для экспрессии представляющих интерес генов.

Линии клеток, которые достигают высокой экспрессии маркерного гена при интеграции отдельной копии плазмиды, используют для трансфекции представляющим интерес геном. Сайт рекомбинации в клетке-хозяине предпочтительно располагается в гене или области, особенно активной экспрессии, то есть в так называемой горячей точке.

Вектор для сайт-специфичной интеграции

Подходящий вектор содержит подходящий сайт рекомбинации, связанный с подходящим геном селекции, отличным от гена селекции, используемого для конструирования клетки-хозяина. Подходящие гены селекции для применения в экспрессии клетки млекопитающего включают, без ограничений, гены, обеспечивающие селекцию питательными веществами, такие как ген тимидин киназы (TK), ген глутамин синтетазы (GS), ген триптофан синтазы (trpB) или ген гистидинол дегидрогеназы (hisD). Кроме того, маркерные гены селекции представляют собой гены устойчивости к антиметаболитам, придающие устойчивость к препаратам, такие как ген дигидрофолат редуктазы (dhfr), который можно селективировать средой с дефицитом гипоксантина и тимидина и дополнительно селективировать метотрексатом, ген ксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (gpt), который можно селективировать микофеноловой кислотой, ген неомицин фосфотрансферазы (neo), который можно селективировать G418 в эукариотической клетке и неомицином или канамицином в прокариотических клетках, ген гигромицин В фосфотрансферазы (hug, hph, hpt), который можно селективировать гигромицином, ген пурамицин N-ацетил-трансферазы (pac), который можно селективировать пурамицином, или ген бластицидин С деаминазы (Bsd), который можно селективировать бластицидином. Наконец, в качестве маркерных генов селекции также можно использовать гены, кодирующие белки, которые обеспечивают сортировку, например, посредством проточной цитометрии, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP), рецептор фактора роста нерва (NGFR) или другие мембранные белки, или бета-галактозидаза (LacZ).

В одном аспекте настоящего изобретения селективируемый ген не снабжен ни предшествующим промотором, ни кодоном, инициирующим трансляцию. Промотор и кодон ATG обеспечивают на вы-

бранном сайте сайт-специфической рекомбинации. Если этот вектор интегрирует в область, отличную от выбранного сайта рекомбинации в геноме клетки-хозяина, экспрессия этого второго гена селекции не может совершаться из-за отсутствия промотора и иницирующего кодона. Если интеграция происходит на выбранном сайте рекомбинации в геноме клетки-хозяина, второй ген селекции экспрессируется, и экспрессия первого гена селекции утрачивается.

Интеграцию, например, можно выполнить с применением так называемого сайта FRT (5'-gaagtctattccgaagtcctattctctagaagtaggaacttc-3' (SEQ ID NO 1) и его вариантов) в геноме и на векторе для сайт-специфичной интеграции вместе с рекомбиназой Flp или ее мутантами от *Saccharomyces cerevisiae*. Однако можно одинаково успешно использовать другие системы рекомбиназы, включая таковые для рекомбиназы Cre и различные сайты lox, такие как loxP из бактериофага P1 или его варианты или мутанты, например lox66, lox71, lox76, lox75, lox43, lox44 и lox511 lox511 (С. Gorman and С. Bullock, *Curr. Opin. in Biotechnology* 2000, 11: 455-4 60) или путем применения фаговой интегразы ФС31 или интегразы лямбда, которая выполняет рекомбинацию между сайтом attP и сайтом attB (А.С. Groth и др. *PNAS* 2000, 97: 5995-6000). Дальнейшие системы рекомбиназы, которые можно использовать в настоящем изобретении, представлены, без ограничений, системой β-рекомбиназы-шесть из бактериальной плазмиды pSM19035, системой Gin-gix из бактериофага Мю или системой R-RS из *Zygosaccharomyces gouxi*.

Дополнительный вариант системы сайт-специфической рекомбинации заключается в использовании сайтов негомологичной рекомбинации. В такой системе в геном хозяина вводят два неидентичных сайта рекомбинации для образования определенных сайтов-мишеней. Сайты рекомбинации, соответствующие фланкирующим сайт-мишень, также фланкируют конструкцию, содержащую представляющий интерес ген. Такая система описана в WO 99/25854, таким образом, приведенной полностью в качестве ссылочного материала. Показано, что применение сайтов негомологичной рекомбинации подавляет вырезание GOI из хромосомы. Неидентичные сайты рекомбинации можно составить из любого сайта рекомбинации, описанного выше, если обеспечены соответствующие рекомбиназы. Например, неидентичные сайты рекомбинации могут состоять из сайта FRT и мутантного сайта FRT с применением рекомбиназы Flp для интеграции или сайта FRT и сайта loxP с применением Flp и рекомбиназы Cre для интеграции.

Кроме того, у Verhoeven и др., *Hum. Gene Ther.* 2001 12, 933-44 была описана система с применением двух различных сайтов FRT. В этом подходе интегрирующую плазмиду переносят в клетки-хозяев посредством заражения ретровирусом. Плазмида состоит из комбинации гена репортера и первого гена маркера для селекции, а также ретровирусных элементов, требуемых для заражения. Ретровирусный 3'LTR содержит два различных сайта FRT. Не функционирующий второй ген маркера для селекции, в котором отсутствует промотор и кодон, иницирующий трансляцию, расположен с 3'-конца от тезисных сайтов. В ходе процесса заражения ретровирусом 3'LTR последовательность копируется в 5'LTR. Это приводит к фланкированию гена репортера и первого гена маркера для селекции двумя различными сайтами FRT с каждой стороны. Последовательность между внешними сайтами FRT можно заменить на GOI под контролем сильного промотора. Кассета, содержащая GOI, фланкирована тем же набором сайтов FRT. Реакция катализируется рекомбиназой Flp. В трансфицированной обменной плазмиде элемент IRES и кодон, иницирующий трансляцию, расположены еще ниже GOI. После замены интегрированной кассеты не функционирующий ген маркера для селекции, расположенный в 3' LTR последовательности снаружи от сайтов FRT, активизируется кодоном, иницирующим трансляцию, который обеспечивает кассета, образующая GOI. Состояние замены можно дополнительно улучшить, если в векторе интегрирования присутствует маркер отрицательной селекции (например, тимидин киназа).

Вектор интегрирования можно также перенести в клетки-хозяев путем стандартной трансфекции. В этом случае кассета интегрирования фланкирована FRT на 5' конце и другим FRT' сайтом на 3' конце. ATG-дефицитный второй маркерный ген устойчивости дополнительно устанавливают ниже 3' FRT' сайта.

Замена на GOI переходит, как описано для ретровирусной системы.

Другой системой, которая предотвращает вырезание GOI после его сайт-специфичной интеграции в хромосому, является интеграза ФС31, также упомянутая выше. Эта система была описана полностью в WO 01/07572 и WO 02/08409, таким образом, приведенных здесь полностью в качестве ссылочного материала.

В дальнейшем аспекте изобретения вектор для сайт-специфичной интеграции представляющего интерес гена дополнительно содержит ДНК, кодирующую один элемент представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка, которому, в качестве опции, предшествует его собственный промотор млекопитающего, управляющий экспрессией белка. Если элемент представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка содержит более чем одну белковую цепь, например, если этот элемент представляет собой антитело или Т-клеточный рецептор, ДНК, кодирующим цепи белка может предшествовать их собственный промотор млекопитающего, управляющий высокими уровнями экспрессии (двунаправленной или однонаправленной, см. фиг. 1 и 2, соответственно) каждой из цепей. При двунаправленной экспрессии можно использовать конфигурацию промотора голова-к-голове в векторе экспрессии и для однонаправленной экспрессии можно использовать два промотора или один промотор,

объединенные, например, с последовательностью IRES. Подходящие конфигурации промотора голова-к-голове представлены, например, без ограничений промотором AdMLP вместе с промотором металлотионеина-1 мыши в обеих ориентациях, промотором AdMLP вместе с промотором фактора элонгации 1 в обеих ориентациях или промотором CMV вместе с промотором MPSV в обеих ориентациях.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную лидерную последовательность, можно включить в экспрессирующий вектор с тем, чтобы направить продукт гена в эндоплазматический ретикулум или в определенное местоположение в клетке, такое как органелла. Сильный сигнал полиаденилирования может быть расположен на 3'-конце последовательности ДНК, кодирующей белок. Сигнал полиаденилирования обеспечивает терминирование и полиаденилирование образующегося транскрипта РНК и коррелирует со стабильностью сигнала. ДНК, кодирующая элемент представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка, может, например, кодировать как тяжелые, так и легкие цепи антитела или фрагменты антитела, каждая последовательность гена, которой, в качестве опции, предшествует ее собственный промоторный элемент млекопитающего и/или которую сопровождают сильные сигналы поли А, управляющие экспрессией высокого уровня каждой из этих двух цепей.

Экспрессирующий вектор для сайт-специфичной интеграции может нести дополнительные транскрипционные регуляторные элементы, такие как энхансеры или UCOE (повсеместные открывающие хроматин элементы), для усиления экспрессии на сайте интеграции. Энхансеры представляют собой последовательности нуклеиновой кислоты, которые специфичным образом взаимодействуют с клеточными белками, участвующими в транскрипции. UCOE открывают хроматин или поддерживают хроматин в открытом состоянии и способствуют воспроизводимой экспрессии функционально связанного гена (более подробно описанного в WO 00/05393, таким образом, приведенной полностью в качестве ссылочного материала). Когда один или более регуляторный элемент, описанные выше, интегрируют в хромосому клетки-хозяина, их называют гетерологичными регуляторными элементами.

Установление системы экспрессии для интенсивной экспрессии белков

Способы введения последовательности нуклеиновой кислоты в клетку известны в данной области техники. Эти способы обычно включают применение вектора ДНК для введения представляющей интерес последовательности в клетку, геном или внехромосомный элемент. Трансфекцию клеток можно проводить множеством способов, известных специалисту в данной области техники, включая осаждение фосфорнокислым кальцием, электропорацию, микроинъекцию, слияние липосом, слияние теней RBC, слияние протопластов и т.п.

Для трансфекции линии клеток-хозяев используют библиотеку представляющих интерес векторов, в которой каждый вектор содержит только одну копию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один элемент рекомбинантного представляющего интерес поликлонального белка. Эта библиотека представляющих интерес векторов экспрессии вместе кодирует рекомбинантный поликлональный представляющий интерес белок. Подходящие векторы для сайт-специфичной интеграции были описаны в предыдущей секции. Отдельные векторы, составляющие библиотеку представляющих интерес вариантов последовательностей нуклеиновой кислоты, можно либо смешать вместе в отдельную композицию, либо можно хранить в отдельных композициях или в смесях отдельных векторов, кодирующих каждый элемент библиотеки, приблизительно 5-50 отдельных векторов библиотеки в композиции.

Производство рекомбинантной поликлональной продуцирующей линии клеток и получение рекомбинантного поликлонального белка от такой линии клеток можно провести с помощью нескольких различных методик трансфекции и производства. Эти методики обозначены на фиг. 3.

Один путь заключается в применении библиотеки векторов, смешанных вместе в отдельную композицию для трансфицирования линии клеток-хозяев. Этот способ называют полной трансфекцией или трансфекцией в полном объеме. В целом, предварительно описанное конструирование вектора и клетки-хозяина гарантирует, что поликлональная линия клеток получается при подходящей селекции. В такой линии клеток большинство отдельных клеток интегрирует в геном одну копию молекулы нуклеиновой кислоты, кодируя определенный элемент рекомбинантного поликлонального белка из библиотеки представляющих интерес последовательностей нуклеиновой кислоты. Отдельная копия последовательности нуклеиновой кислоты интегрирует в отдельный специфичный сайт генома каждой клетки в коллекции клеток, таким образом, производя поликлональную линию клеток, составленную из отдельных клеток, экспрессирующих отдельные элементы представляющего интерес поликлонального белка. Замороженный запас поликлональной линии клеток делают перед началом производства рекомбинантного поликлонального белка.

Другой путь заключается в применении библиотеки векторов, разбитой на фракции, содержащие для трансфекции приблизительно 5-50 отдельных векторов библиотеки в композиции.

Предпочтительно фракция библиотеки составляет 10-20 отдельных векторов. Затем каждую композицию трансфицируют в аликвоту клеток-хозяев. Этот способ называют частичной трансфекцией. Количество трансфицированных аликвот зависит от размера библиотеки и от количества отдельных векторов в каждой фракции. Например, если библиотека составляет 100 определенных вариантов элементов, которые разбиты на фракции, содержащие 20 определенных вариантов элементов в композиции, 5 аликвот клеток-хозяев должны быть трансфицированы композицией библиотеки, образующей отдельную

фракцию исходной библиотеки. Аликвоты клеток-хозяев селективируют для сайт-специфичной интеграции. Предпочтительно определенные алиquotы селективируют отдельно. Однако их можно также объединить перед селекцией. Аликвоты можно проанализировать на клональное многообразие, и только те, у которых многообразие достаточно, будут использовать для производства запаса библиотеки поликлонального GOI. Чтобы получить требуемую поликлональную линию клеток для производства, алиquotы можно смешать перед производством замороженного запаса, сразу после того, как они были восстановлены из запаса или после пролиферации и адаптации в течение недолгого времени. В качестве опции, алиquotы клеток хранят отдельно в ходе всей выработки и поликлональную белковую композицию собирают путем объединения продуктов от каждой алиquotы, а не алиquot клеток перед получением.

Третий путь представляет собой способ высокой производительности, в котором клетки-хозяев индивидуально трансфицируют с использованием отдельных векторов, составляющих представляющую интерес библиотеку. Этот способ называют индивидуальной трансфекцией. Индивидуально трансфицированные клетки-хозяев предпочтительно отдельно селективируют для сайт-специфичной интеграции. Однако их также можно объединить перед селекцией. Отдельных клонов клеток, произведенных в ходе селекции, можно проанализировать на предмет времени пролиферации и интегрирующей структуры и предпочтительно, чтобы для производства запаса библиотеки поликлонального GOI использовали клонов с одинаковыми темпами роста и отдельной сайт-специфичной интеграцией. Отдельных клонов клеток можно смешать, чтобы получить требуемую поликлональную линию клеток перед производством запаса, сразу после того, как они были восстановлены от запаса, или после пролиферации и адаптации в течение недолгого времени.

Этот подход может исключить любое возможное остаточное отклонение последовательности в ходе трансфекции, интеграции и селекции. В качестве альтернативы индивидуально трансфицированные клетки-хозяева смешивают до выполнения селекции, обеспечивают контроль отклонения последовательности из-за трансфекции.

Общая особенность методик производства, обозначенных выше, заключается в том, что все отдельные элементы, составляющие рекомбинантный поликлональный белок, можно получить в одном, или ограниченном количестве биореакторов, приблизительно в 10 как максимум. Единственное различие заключается в стадии, в которой выбирают производство коллекции клеток, которая составляет рекомбинантную поликлональную продуцирующую линию клеток.

Линия клетки-хозяина, которую используют для экспрессии и получения представляющего интерес рекомбинантного поликлонального белка, содержит одну или более молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты, распознаваемых ферментом (ферментами) рекомбиназы (например, клетки, подготовленные заранее, содержащие сайт FRT в заранее определенной области в геноме, как описано, например, в US 5677177).

Вектор для сайт-специфичной интеграции предпочтительно интегрируют в заранее определенный геномный локус, который участвует в интенсивной экспрессии, так называемую горячую точку.

Если уровни экспрессии необходимо увеличить, амплификацию гена можно выполнить с применением селекции на ген DHFR или ген глутамин синтетазы (GS). Для этого требуется использовать векторы, содержащие такой маркер селекции.

Для производства поликлонального белка, где каждый белковый элемент состоит из более чем двух полипептидных цепей, комбинация цепей может быть важной для сродства, специфичности и активности белка, который они формируют. Это, например, наблюдали для антител и TCR. Например, известно, что комбинация варибельной тяжелой цепи антитела и переменной легкой цепи влияет на сродство и специфичность антитела, формирующегося из цепей. Таким образом, когда библиотеку последовательностей кодирующих антитела селективируют на их способность производить антитела со сродством к определенной мишени, требуется гарантия того, что комбинация варибельной тяжелой цепи и варибельной легкой цепи в конечном продукте соответствовала этому. По этой причине полипептидные цепи, составляющие отдельный элемент поликлонального белка, помещают в один и тот же вектор, используемый для интеграции, таким образом, гарантируя, что они будут держаться вместе в ходе всего процесса.

Следующее описание представляет собой один пример получения рекомбинантной поликлональной линии клеток экспрессии антитела, где конкуренция цепей является минимальной, если вообще присутствует.

Была создана универсальная промоторная кассета для конститутивной экспрессии, содержащая два промотора, расположенных в противоположных направлениях транскрипции, как конструкция голова-к-голове, окруженная варибельной тяжелой цепью и полной легкой цепью каппа, что обеспечивает перенос целой конструкции в вектор для сайт-специфичной интеграции, причем указанный вектор содержит сайт FRT и ген устойчивости к гигромицину и константную область тяжелой цепи. Предполагается, что можно также использовать промоторную кассету для индуцибельной экспрессии. Кроме того, промоторы можно расположить хвост-к-хвосту, что приведет к транскрипции в противоположном направлении, или хвост-к-голове для однонаправленной транскрипции. Для эксперимента использовали клетки CHO-Flp-In (Invitrogen, Carlsbad, CA), которые устойчиво экспрессируют ген слияния lacZ-Zeocin, делая клетки устойчивыми к антибиотику Zeocin. Клетки поддерживали в питательной среде, содержащей Zeocin.

Клетки трансфицировали в полном объеме библиотекой векторов для сайт-специфичной интеграции, кодирующей поликлональное антитело и другой маркер селекции (гигромицин фосфотрансфераза) вместе с плазмидой, экспрессирующей рекомбиназу Flp. Индуцибельный промотор можно также использовать для контроля экспрессии. После трансфекции клетки выращивали в присутствии гигромицина. Клетки, которые проявляли устойчивость к гигромицину, впоследствии выращивали в различных культуральных системах, таких как обычные малые культуральные колбы, многоуровневые клеточные фабрики Nunc, малые биореакторы с высоким выходом (MiniPerm, INTEGRA-CELLine) и центрифужные пробирки для реакторов с системой полых волокон и биореакторов. Клетки проверяли на выработку антитела с применением ELISA. Поликлональные линии клеток селектировали на жизнеспособность при росте в суспензии в сывороточной свободной питательной среде без давления отбора в течение продолжительных периодов. Запасы линий клеток выращивали в присутствии гигромицина.

Оценка сохранения поликлональности в системе экспрессии

В соответствии с настоящим изобретением часто важно гарантировать, что поликлональность в системе экспрессии существенно не меняется в ходе выработки так, чтобы было возможно остановить выработку, когда поликлональность действительно изменится. В соответствии с настоящим изобретением это осуществляется путем контролирования относительных уровней экспрессии вариантных последовательностей нуклеиновой кислоты. Уровни экспрессии можно, например, проверять на уровне мРНК, например, с применением анализа RFLP, PCR в реальном времени либо массивов, либо на уровне белка, например, с применением двумерного электрофореза в полнакриломидном геле, масс-спектрометрии или различных хроматографических методик. С помощью этих методик можно установить основное значение для количества всех отдельных уровней экспрессии и затем взять образцы из культуры во время выработки, чтобы измерить, изменились ли уровни экспрессии (как полные, так и относительные). В нормальной практике настоящего изобретения, можно установить диапазон значений, находящихся вблизи основного значения, и если обнаруживают, что относительные уровни экспрессии, оказываются вне диапазонов, то выработку прекращают.

Чтобы было возможно оценить стабильность и воспроизводимость системы экспрессии, приготовили векторы, кодирующие шесть определенных фрагментов Fab (библиотека mini-six) с реактивностью против овальбумина курицы (OVA), бычей щелочной фосфатазы (AP), β_2 -микроглобулина человека (β_2m), гаптоглобина человека (HAP), фактора VIII человека (FVIII) и лизозима яичного белка курицы (LYS). Различные последовательности, кодирующие фрагмент Fab, не идентичны и поэтому демонстрируют различные структуры RFLP, в связи с этим, RFLP можно использовать для анализа композиции генотипа.

Библиотеку mini-six ввели в клетки CHO-Flp-In посредством трансфекции с применением вектора экспрессии с кассетой промотора голова-к-голове. Клетки CHO-Flp-In либо трансфицировали в полном объеме смесью представляющих интерес векторов экспрессии, кодирующих шесть определенных антител, что привело к образованию поликлональной линии клеток, экспрессирующей данные шесть антител в известной комбинации, либо клетки трансфицировали индивидуально одним элементом представляющей интерес библиотеки экспрессии с последующим смешиванием трансфицированных клеток, что привело к образованию экспрессирующей рекомбинантные поликлональные антитела линии клеток, экспрессирующих данные шесть антител в известной комбинации. Таким способом, было возможно проверить, происходит ли трансфекция клеток млекопитающего без отклонения к одному или нескольким отдельным клонам линии клеток, экспрессирующей рекомбинантные поликлональные антитела. Кроме того, было возможно проверить наличие отклонения пролиферации и отклонения, вызванного очисткой поликлональной композиции антител.

Создание линии клеток, продуцирующей рекомбинантные поликлональные антитела антиовальбумина

Фаговые клоны, связывающие овальбумин, селектировали с применением фагового дисплея и ELISA, чтобы идентифицировать подходящие клоны. Для того чтобы идентифицировать антитела из связывающих овальбумин клонов, использовали две установки, то есть чашки ELISA, покрытые овальбумином, или способ скрининга высокой плотности (HDS), основанный на иммобилизации овальбумина на мембранах PVDF. Таким способом получили группу антител, из которых некоторые узнают овальбумин, иммобилизованный на чашке ELISA, а другие узнают овальбумин, иммобилизованный на мембране PVDF.

Селектированные фаговые клоны, связывающие овальбумин, могут содержать последовательности ДНК варибельной тяжелой и каппа-цепей, связанные с промоторами млекопитающего и перенесенные в вектор типа pSymvc20 (фиг. 4D) для экспрессии антитела, продуцирующей коллекцию клонов типа pSymvc21 (фиг. 4E). Клетки CHO-Flp-In либо трансфицируют в полном объеме смесью клонов pSymvc21, либо клетки трансфицируют индивидуально одной плазмидой pSymvc21 экспрессии антитела, с последующим смешиванием трансфицированных клеток, экспрессирующих другие антитела, связывающие овальбумин. Процедуру создания линии клеток, вырабатывающей поликлональные антитела антиовальбумина, можно проверить с помощью секвенирования ДНК, TaqMan PCR и анализа RFLP от-

дельных клеток, экспрессирующих антитело, а также ELISA, 2-мерной (2D) жидкостной хроматографии (LC) и масс-спектрометрии (MS) полученной смеси антител.

Культивирование клеток и получение рекомбинантного поликлонального антитела

Поликлональную линию клеток, полученную, как описано выше, выращивают в подходящих питательных средах при подходящих условиях для экспрессии представляющего интерес поликлонального белка, кодируемого вариантами последовательностями нуклеиновой кислоты, встроенными в геном клеток. Культивирование клеток можно выполнить в несколько стадий. Первая стадия заключается в том, что поликлональную линию клеток селективируют на сайт-специфичные интегрированные молекулы. При использовании клеток млекопитающего селектированные клетки предпочтительно адаптируют к росту в суспензии, а также к условиям свободного состояния в сыворотке. Это можно выполнить в одну или две стадии и с давлением отбора или без него. Нарращивание можно начать, когда поликлональная линия клеток адаптируется к подходящим условиям. На этой стадии запас рабочих клеток можно заморозить. Предпочтительно используют биореакторы объемом от 30 до 100 л, но можно использовать меньшие или большие биореакторы. Подходящее время получения и выбор размера биореактора зависят от требуемой выработки белка от загрузки и уровня экспрессии линии клеток. Время может варьироваться от нескольких дней до трех месяцев. Экспрессированный рекомбинантный поликлональный белок выделяют из клеток или супернатанта. Рекомбинантный белок очищают и характеризуют согласно процедурам, известным специалисту в данной области техники. Примеры процедур очистки и характеристики упомянуты ниже.

Очистка рекомбинантного поликлонального белка от супернатанта культуры

Выделение определенных белков из супернатантов культуры возможно с применением различных хроматографических методик, которые используют различия в физико-химических свойствах белков, например различия в молекулярной массе, полном заряде, гидрофобности или сродстве к определенному лиганду или белку. Белки можно таким образом разделить по молекулярной массе с применением гель-фильтрационной хроматографии или по полному заряду используя ионообменную (катион/анионную) хроматографию или в качестве альтернативы, используя хроматофокусирование. Точно так же белки можно разделить по гидрофобности с применением хроматографии гидрофобного взаимодействия или афинной хроматографии, использующей различия в сродстве к определенному иммобилизованному лиганду или белку. Таким образом, можно выполнить разделение сложных смесей белков путем последовательной комбинации различных хроматографических принципов. Таким образом, смесь белков сначала можно разделить, например, в соответствии с полным зарядом с применением ионообменной хроматографии и белки с близкими полными зарядами можно впоследствии разделить в соответствии с молекулярной массой с применением гель-фильтрационной хроматографии, или по гидрофобности с применением хроматографии гидрофобных взаимодействий в присутствии высокой концентрации выбранной соли.

Афинную хроматографию, в комбинации с последующими стадиями очистки, такими как ионообменная хроматография, гидрофобные взаимодействия и гель-фильтрация, часто использовали для очистки IgG (как поликлонального, так и моноклонального) и TCR из различных источников, например, асцитической жидкости, супернатантов клеточной культуры и сыворотки. Аффинная очистка, в которой разделение основано на обратимом взаимодействии между белком (белками) и определенным лигандом, соединенным с хроматографической матрицей, представляет собой легкий и быстрый способ, который предоставляет высокую селективность, обычно, большую емкость и концентрацию в меньшем объеме. Белок А и белок G, два белка поверхности бактериальной клетки, имеют высокое сродство к области F_c и, в иммобилизованной форме, использовались для многих обычных приложений, включая очистку поликлонального IgG и его подклассов от различных видов и абсорбцию и очистку иммунных комплексов.

После афинной хроматографии с тем, чтобы удалить белки клетки-хозяина, пропущенный Белок А и ДНК, можно выполнить последующие стадии хроматографии, например ионообменную и/или хроматографию гидрофобного взаимодействия.

Гель-фильтрацию, как конечную стадию очистки, можно использовать для удаления загрязняющих молекул, таких как димеры и другие скопления, и поместить образец в буфер хранения. В зависимости от источника и условий экспрессии может быть необходимым включение дополнительной стадии очистки для достижения необходимого уровня чистоты антител. Таким образом, с тем, чтобы очистить антитела для терапевтического применения, часто используют хроматографию гидрофобного взаимодействия или ионообменную хроматографию в сочетании с Белком А и гель-фильтрационной хроматографией.

Для того чтобы очистить другие классы антител, следует использовать альтернативные среды для афинной хроматографии, поскольку белки А и G не связывают IgA и IgM. Можно использовать иммуноаффинную очистку (моноклональные антитела анти-IgA или анти-IgM, соединенные с твердой фазой) или, в качестве альтернативы, можно использовать многостадийные методики очистки, включая ионообменное и гидрофобное взаимодействие.

Структурная характеристика

Структурная характеристика поликлональных белков, таких как антитела и TCRs, требует высокого

разрешения из-за сложности смеси (клональное многообразие и гликозилирование).

Традиционные подходы, такие как гель-фильтрация, ионообменная хроматография или электрофорез, возможно, не обладают достаточной разрешающей способностью, чтобы дифференцировать отдельные антитела. Двумерный электрофорез в полиакриломидном геле (2D-PAGE) использовали для того, чтобы профилировать сложные белковые смеси, с последующей масс-спектрометрией (MS) или жидкостной хроматографией (LC)-MS (например, протеомикой). 2D-PAGE, который объединяет разделение, основанное на заряде белка и массе, оказался полезным для дифференцирования поликлонального, олигоклонального и моноклонального иммуноглобулина в образцах сыворотки. Однако этот способ имеет некоторые ограничения. Хроматографические методики, в отдельном капилляре и LC, объединенная с MS с ионизацией электрораспылением, все чаще используются для анализа сложных смесей пептида. LC-MS использовали для исследования моноклональных антител и с недавнего времени также для профилирования легких цепей поликлональных антител. Анализ очень сложных образцов требует большей разрешающей способности хроматографической системы, которой можно достичь путем разделения на два измерения (или больше). Такой подход может быть основан на ионном обмене в первом измерении и обратнофазной хроматографии (или гидрофобном взаимодействии) во втором измерении, в качестве опции, объединенной с MS.

Функциональная характеристика

Поликлональный белок можно, например, функционально охарактеризовать путем сравнительных исследований с поликлональными белками со специфичностью к той же самой мишени или со сходной активностью. Такие исследования можно выполнять как *in vitro*, так и *in vivo*.

Функциональная характеристика поликлонального антитела *in vitro* может, например, представлять собой иммунопреципитацию, которая является очень специфичной методикой для аналитического отделения антигенов-мишеней от грубых лизатов клетки. При объединении иммунопреципитации с другими методиками, такими как SDS-PAGE, с последующим окрашиванием белка (Синий Кумасси, окрашивание серебром или мечение биотином) и/или иммуноблоттинг, можно обнаружить и провести количественный анализ антигенов, например, и, таким образом оценивать некоторые из функциональных свойств антител. Хотя этот способ не дает оценку количества молекул антител, их сродства связывания, он обеспечивает визуализацию целевых белков и, таким образом, специфичность. Этот способ можно аналогично использовать для контроля разности потенциалов антител по отношению к антигенам (целостность клонального многообразия) в ходе процесса экспрессии.

Функциональная характеристика поликлонального антитела *in vivo* может, например, представлять собой исследование заражения. Подопытное животное, такое как мышь, можно, например, заразить определенным вирусом, к которому разрабатывалось поликлональное антитело. Степень, с которой можно ингибировать заражение, указывает функциональность поликлонального антитела.

Терапевтические композиции

В одном варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный поликлональный белок, выбранный из надсемейства иммуноглобулинов в качестве активного ингредиента, предназначена для лечения или профилактики заболевания у млекопитающего, такого как заболевание, выбранное из: злокачественных опухолей, инфекций, воспалительных заболеваний, аллергии, астмы и других респираторных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, иммунологических дисфункций, сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний в центральной нервной системе, метаболических и эндокринных заболеваний, отторжений трансплантации и нежелательной беременности. Млекопитающее предпочтительно представлено человеком, домашним животным или ручным животным.

В предпочтительном варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит рекомбинантное поликлональное антитело или фрагмент антитела в качестве активного ингредиента и фармацевтически приемлемый инертный наполнитель.

В другом предпочтительном варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит рекомбинантный поликлональный T-клеточный рецептор или фрагмент T-клеточного рецептора в качестве активного ингредиента и фармацевтически приемлемый инертный наполнитель.

Для лечения или профилактики инфекций фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит представляющий интерес рекомбинантный поликлональный белок, способный связывать или реагировать с инфекционным микроорганизмом, таким как микроорганизм, выбранный из: бактерий, микобактерий, вируса, микоплазм, риккетсий, спирохет, простейших, грибов, гельминтов и эктопаразитов.

Рекомбинантные поликлональные белки человека можно вводить в фармацевтически приемлемом разбавителе, носителе, или инертном наполнителе, в монолитной лекарственной форме. Для обеспечения подходящих композиций или композиций для введения соединений пациентам, страдающим от заболевания, например, вызванного чрезмерной пролиферацией клеток, можно применять обычную фармацевтическую практику. Введение можно начать прежде, чем пациент проявит симптомы. Можно использовать любой подходящий путь введения, например введение может представлять собой парентеральное, внутривенное, внутриартериальное, подкожное, внутримышечное, внутричерепное, внутриглазное,

глазное, внутрижелудочковое, внутрисуставное, внутрипозвоночное, интракостеральное, внутрибрюшное, внутриносовое, аэрозоль, свечу или пероральное введение. Например, терапевтические композиции могут быть в форме жидких растворов или суспензий; для перорального приема композиции могут быть в форме таблеток или капсул, жевательной резинки, пасты, композиции, подходящие для нанесения на кожу, могут быть в форме кремов, мазей, лосьонов, гелей, прокладок или других, композиции, подходящие для применения на влажную или мочеполовую слизистую оболочку, могут быть в форме вагиноториев, гелей или других, и внутриносовые композиции - в форме порошков, носовых капель или аэрозолей.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением готовят способом, известным по существу, например, посредством процессов обычного растворения, лиофилизирования, смешивания, гранулирования или изготовления сладких препаратов. Для фармацевтических композиций можно разработать рецептуру в соответствии с обычной фармацевтической практикой (см., например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A.R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York, NY).

Предпочтительно используют растворы активного ингредиента, а также суспензии, и особенно изотонические водные растворы или суспензии, что возможно для тех растворов или суспензий, которые получают до применения, например, в случае лиофилизованных композиций, которые содержат активный ингредиент отдельно или вместе с носителем, например маннитом. Фармацевтические композиции можно стерилизовать, и/или они могут содержать инертные наполнители, например консерванты, стабилизаторы, увлажняющие и/или эмульгирующие агенты, солюбилизаторы, соли для регулирования осмотического давления и/или буфер, и их можно приготовить способом, известным по существу, например, посредством обычного растворения или процессов лиофилизации. Упомянутые растворы или суспензии могут содержать вещества, увеличивающие вязкость, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливинилпирролидон или желатин.

Композиции для инъекций готовят общепринятым способом в стерильных условиях; это относится и к введению композиций в ампулы или пробирки и запечатыванию емкостей.

Фармацевтические композиции для перорального приема можно получать путем объединения активного ингредиента с твердыми носителями, если требуется, гранулирования получающейся смеси, и переработки смеси, если это требуется или необходимо, после добавления подходящих инертных наполнителей в таблетки, сердцевинки драже или капсулы. Их также можно включить в пластиковые носители, которые позволяют активным ингредиентам рассеиваться или высвобождаться в измеренных количествах.

Фармацевтические композиции содержат от приблизительно 1 до приблизительно 95%, предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 90% активного ингредиента. Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть, например, в форме унифицированной дозы, например в форме ампул, пробирок, свеч, драже, таблеток или капсул.

Композиции можно вводить людям - пациентам в терапевтически эффективных количествах (например, в количествах, которые предотвращают, устраняют или уменьшают патологическое состояние) с тем, чтобы обеспечить терапию заболевания или состояния. Предпочтительная дозировка терапевтического агента, который нужно вводить, по всей видимости, зависит от таких переменных факторов, как тип и степень нарушения, общее состояние здоровья конкретного пациента, рецептуры наполнителей композиции и пути его введения.

Если требуется, лечение рекомбинантными человеческими поликлональными антителами можно объединить с более традиционными терапиями. Например, при лечении злокачественных опухолей такие сочетательные терапии могут быть в форме хирургии или введения химиотерапевтических средств или других агентов против злокачественных опухолей.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит рекомбинантный поликлональный представляющий интерес белок, способный связывать или реагировать с инфекционным микроорганизмом, таким как микроорганизм, выбранный из бактерий, микобактерий, вируса, микоплазм, риккетсий, спирохет, простейших, грибов, гельмитов и эктопаразитов.

Терапевтические применения композиций в соответствии с настоящим изобретением

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для лечения, улучшения состояния или профилактики заболевания у млекопитающего. Заболевания, которые можно лечить с помощью настоящих фармацевтических композиций, включают злокачественные опухоли, инфекционные заболевания, воспалительные заболевания, аллергию, астму и другие респираторные заболевания, аутоиммунные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания в центральной нервной системе, метаболические и эндокринные заболевания, отторжения трансплантации и нежелательная беременность.

Один аспект настоящего изобретения представляет собой способ для лечения заболевания, улучшения состояния или профилактики у животного, в котором используют эффективное количество рекомби-

нантного поликлонального антитела или фрагмента антитела. В дальнейшем аспекте используют эффективное количество рекомбинантного поликлонального Т-клеточного рецептора или фрагмента Т-клеточного рецептора.

Дополнительный аспект настоящего изобретения представляет собой применение рекомбинантного поликлонального антитела или рекомбинантного поликлонального Т-клеточного рецептора или фрагментов антител или Т-клеточных рецепторов для приготовления композиции состава для лечения заболеваний, выбранных из группы, состоящей из: злокачественных опухолей, инфекции, воспалительного заболевания, аллергии, астмы или другого респираторного заболевания, иммунологических дисфункций, аутоиммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, заболевания в центральной нервной системе, нарушения обмена веществ, эндокринных заболеваний, отторжений трансплантата и нежелательной беременности.

Диагностическое применение и применение для детекции в оружающей среде

Другой вариант выполнения настоящего изобретения направлен на диагностические наборы и наборы для детекции в оружающей среде, а также на способы для применения этих наборов. Наборы в соответствии с настоящим изобретением содержат рекомбинантный поликлональный белок, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением, который, можно пометить детектируемой меткой или не метить для детекции без использования метки. В случае если настоящий рекомбинантный поликлональный белок поместили, его можно добавить к образцу, в котором предполагают содержание молекулы-мишени, и наличие или отсутствие метки указывает на наличие или отсутствие молекулы-мишени. Тестируемый образец может представлять собой образец жидкости тела, такой как кровь, сыворотка, плазма, спинномозговая жидкость, лимфа или моча, или образец не из млекопитающего, такой как образец из окружающей среды, в котором предполагают накопление загрязняющего вещества. Образцы не из млекопитающего могут представлять собой воду, воздух или загрязненную землю. Детекция без использования метки охватывает измерение изменения преломления в Viascope при связывании, в котором для того, чтобы захватить молекулу-мишень, используют рекомбинантный поликлональный белок.

Примеры

Следующие примеры описывают, как экспрессируют и получают рекомбинантные поликлональные антитела в высокопроизводительной линии клеток, в которые посредством сайт-специфичной интеграции в предварительно охарактеризованный сайт "горячей точки" в хромосоме вставили представляющий интерес ген (гены)/вектор (векторы).

В примерах в качестве клетки-хозяина использовали клетки CHO. Их преимущества включают наличие подходящей среды для выращивания, их способность к эффективному росту до высокой плотности в культуре и их способность экспрессировать белки млекопитающего, такие как антитела, в биологически активной форме.

В целом, трансформацию E. coli и трансфекцию клеток млекопитающего в соответствии с данным изобретением выполняют в соответствии с обычными способами. Для лучшего понимания изобретения в примерах ниже описаны примеры конструирования векторов и их использование при получении рекомбинантной поликлональной продуцирующей линии клеток для экспрессии рекомбинантных поликлональных белков.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение, но их не следует рассматривать как ограничение охвата изобретения.

Пример 1. Сайт-специфичная интеграция против случайной интеграции.

Для следующего эксперимента трансфекции использовали клетки CHO Flp-In (Invitrogen, Carlsbad, CA). Эффективность системы проверяли путем использования в качестве гена репортера, секретированной щелочной фосфатазы человека (SEAP). Приготовили две конструкции плазмиды:

1. SEAP, встроенный в ркДНК3.lhygro + (Invitrogen, Carlsbad, CA) (для случайной интеграции);
2. SEAP, встроенный в ркДНК5/FRT (Invitrogen, Carlsbad, CA) (для сайт-специфичной интеграции).

Две конструкции плазмиды очень сходны в отношении регуляторных элементов, то есть промотора, полиаденилирования и т.д., что позволяло использовать плазмиды для сравнения случайной интеграции с сайт-специфичной интеграцией.

Клетки CHO Flp-In трансфицировали конструкцией плазмиды 1 отдельно, или конструкцией плазмиды 2 вместе с плазмидой, кодирующей рекомбиназу рOG44 в соответствии с процедурой, описанной Invitrogen. Трансфектанты селектировали с применением гигромицина и измеряли выработку SEAP из резервов трансфектантов.

Клетки, трансфицированные путем сайт-специфичной интеграции, вырабатывали приблизительно в 6 раз больше SEAP, чем клетки, трансфицированные путем случайной интеграции, что доказывает эффективность данной системы и данной линии клеток.

Пример 2. Конструирование и приготовление вектора экспрессии для сайт-специфичной интеграции в клетку-хозяина.

Можно собрать экспрессирующий вектор, подходящий для сайт-специфичной интеграции в область горячей точки в хромосоме клетки-хозяина, содержащий следующие элементы ДНК:

- а) сайт рекомбинации FRT, связанный с геном устойчивости к гигромицину,

- b) начало репликации pUC,
- c) ген устойчивости к ампициллину (bla),
- d) bla-промотор, обеспечивающий экспрессию гена устойчивости к ампициллину (bla),
- e) ген (гены), кодирующий представляющий интерес белок (GOIs),
- f) промотор (промоторы), обеспечивающий экспрессию GOI, и
- g) в качестве опции, дополнительные регуляторные элементы транскрипции или трансляции, такие как энхансеры или UCOE's, для увеличения экспрессии на сайте интеграции или IRES.

Для лучшего понимания конструирования вектора экспрессии каждый из элементов описывают более детально.

a) Использовали сайт рекомбинации FRT, связанный с геном устойчивости к гигромицину для интеграции, опосредованной рекомбиназой Flp, и селекции линии клеток с большей частью отдельных интегрированных молекул. Ген гигромицина не обеспечили ни предшествующим промотором, ни кодоном, инициирующим транскрипцию, но с 3'-конца гена добавили сигнал полиаденилирования. Используемый сайт FRT представлял собой 5'-gaagtcctattccgaagtcctattctctagaagaatagggaacttc-3' (SEQ ID NO 1).

b) Начало репликации pUC включили с тем, чтобы обеспечить репликацию большого числа копий в клетке-хозяине *E. coli*.

c) Включили ген устойчивости к ампициллину (bla) (β -лактамаза), обеспечивающий селекцию трансформантов *E. coli*.

d) Bla-промотор обеспечивал экспрессию гена устойчивости к ампициллину (bla) в *E. coli*.

e) Включили GOI, кодирующий представляющий интерес белок, например рекомбинантный поликлональный белок, антитело, тяжелую и легкую цепи антитела, а также нуклеотидные последовательности, которые кодируют всю или часть константной области или варибельной области молекулы антитела, и в качестве опции всю или часть регуляторной нуклеотидной последовательности, которая управляет экспрессией молекулы антитела.

Локусы иммуноглобулина для тяжелых цепей могут включать без ограничений всю или часть областей V, D, J и области переключения (включая промежуточные последовательности, также известные как интроны) и фланкирующие последовательности, связанные или примыкающие к определенному гену константной области тяжелой цепи, и он может включать области, расположенные внутри или ниже константной области (включая интроны).

Локусы иммуноглобулина для легких цепей могут включать без ограничений области V и J, фланкирующие их сверху последовательности, и промежуточные последовательности (интроны), связанные или примыкающие к гену константной области легкой цепи, и он может включать области, расположенные внутри или ниже константной области (включая интроны).

Для модификации всей или части константной области антитела модифицирующие последовательности в соответствии с настоящим изобретением могут включать без ограничений константный участок антитела, имеющий специфическую эффекторную функцию, класс и/или происхождение (например, константные области иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM, IgD или IgE человека или любого другого вида) или часть константной области, которая изменяет активность или свойства константной области антитела; а также гены, которые кодируют другие молекулы, которые придают некоторую новую функцию молекуле модифицированного антитела, например фермент, токсин и т.п.

Ген (гены), кодирующий представляющий интерес белок, может быть эффективно связан с последовательностями нуклеотида, кодирующими функциональные лидерные последовательности, направляющие продукт гена на секреторный путь.

Дополнительно, с 3'-конца от GOI, кодирующего представляющий интерес белок, например, такой как поликлональное антитело, содержащее тяжелую и легкую цепи, могут быть расположены сильные сигналы полиаденилирования. Использование изотипа мыши IgG1 в следующих примерах приведено в иллюстративных целях и не предназначается для ограничения охвата изобретения.

f) Предоставлены промоторы, обеспечивающие экспрессию GOI. В связи с этим, описывают кассету, содержащую элементы промотора и энхансера для экспрессии. В векторе экспрессии, каждому из генов антитела могут предшествовать их собственные элементы промотора млекопитающего, управляющие экспрессией высокого уровня каждой из этих двух цепей, используется однонаправленная, двунаправленная и ориентация хвост-к-хвосту кассет транскрипции.

В двунаправленной ориентации экспрессии можно использовать конфигурацию промотора голова-к-голове (конструкция такой системы детально описана в патенте США № 5789208, который приведен полностью в качестве ссылочного материала). В однонаправленной системе экспрессии можно также использовать для экспрессии два промотора или один промотор, объединенный, например, с последовательностью IRES.

Для конструирования промоторов голова-к-голове Pfu PCR амплификацию промоторов выполняют по отдельности. 5'-праймер инициирует на наиболее близком к 5'-концу основании промотора, 3'-концевой праймер включает уникальный сайт рестрикции, такой как сайт XbaI. После амплификации PCR, фрагменты можно разделить на агарозном геле и выделить из геля, используя колонки QiaQuick (Qiagen). После этого осуществляют расщепление рестрикции XbaI, тепловую инактивацию при 65°C в

течение 20 мин и очистку фрагментов в колонке, используя QiaQuick. Фрагменты затем смешивают и лигируют вместе с применением лигазы *E. coli* (New England Biolabs (NEB)), фермент, который избирательно лигирует липкие концы. Смесь лигирования амплифицируют с помощью PCR с 5'-праймерами каждого промотора с тем, чтобы выработать фрагмент полного промотора голова-к-голове (промотор A/промотор B). Этот фрагмент вступает во взаимодействие с T4 полинуклеотид киназой (PNK) (NEB), фермент инактивируют теплом при 65°C в течение 20 мин и фрагмент лигируют (тупыми концами) в представляющий интерес вектор (амплифицированный PCR фрагмент pSymvc10 (см. фиг. 4), в котором праймеры, используемые для амплификации, отжигаются на каждой стороне промоторной области, амплифицируя все кроме промотора), с применением T4 лигазы (NEB).

Фиг. 1 и 2 показывают экспрессирующий вектор, содержащий промоторы для двунаправленного и однонаправленного, соответственно. Предполагается, что эти промоторы иллюстрируют, но не ограничивают, выбор промотора в настоящем изобретении.

г) Экспрессирующий вектор может нести дополнительные регуляторные элементы транскрипции и/или трансляции, такие как энхансеры и/или UCOE's, для усиления экспрессии на сайте интеграции и/или IRES.

Пример 3. Оценка сохранения поликлональности в развитой продуцирующей системе.

С тем чтобы иметь возможность оценить стабильность и воспроизводимость продуцирующей системы, приготовили линию клеток, экспрессирующую, поликлональную композицию определенных антител в известной комбинации. Такую поликлональную композицию антител назвали композицией mini-six. Библиотеку последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих композицию mini-six, называли библиотекой mini-six.

(а) Происхождение клона.

В этом примере использовали следующие последовательности, кодирующие фрагменты Fab (представляющие интерес гены) с реактивностью против антигенов 1-6:

1. Овальбумин (OVA). Фрагменты, кодирующие Fab, отобрали из мышинной библиотеки фагового дисплея анти-OVA.

2. Щелочная фосфатаза (AP). Фрагменты, кодирующие Fab отобрали из мышинной библиотеки фагового дисплея анти-AP.

3. β_2 -микроглобулин (β_2m). Фрагменты, кодирующие Fab, клонировали от гибридомы BVM.1 (подарок от д-ра L. Ø. Pedersen, Дания), которые получили против β_2m .

4. Гаптоглобин человека (HAP). Фрагменты, кодирующие Fab, отобрали из мышинной библиотеки фагового дисплея анти-гаптоглобина человека.

5. Фактор VIII (FVIII). Парентеральное моноклональное антитело этого фрагмента Fab представляло собой моноклональное антитело FVIII F25 (подарок от Novo Nordisk, Дания). ДНК, кодирующую V_H и полные каппа-цепи этого фрагмента Fab субклонировали в фагмиде, с последующей вставкой прокариотической промоторной кассеты в данную конструкцию.

6. Куриный яичный лизозим (LYS). Эта конструкцию получили из клона D1.3 scFv (Boulot, G. и др., J. Mol. Biol., 213 (4) (1990) 617-619), посредством PCR амплификации V_H и V_L фрагментов и клонирования в фагмиде.

Фагмидные клоны существуют как в глицериновых запасах трансформированного штамма *Escherichia coli* TG1 (хранившегося при -80°C) или в виде препаратов фагмидных ДНК.

(b) Анализ RFLP и секвенирование ДНК библиотек mini-six. Нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелые цепи фрагментов Fab, проанализировали с помощью RFLP следующим образом: исследовали структуры полос, полученные после расщепления фрагментов, произведенных PCR ферментами NlaIII и Hinf I. Различные последовательности, кодирующие фрагмент Fab, показали весьма разные и легко различимые структуры. Нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагменты V_H и V_L , секвенировали и нашли последовательности, соответствующие структуре RFLP. Кроме того, нуклеотидные последовательности кодировали открытые рамки считывания и транслировались в четко определенные полипептиды.

(c) Анализ ELISA композиции mini-six.

Фрагменты Fab, экспрессированные от клонов, проанализировали с применением ELISA, в котором все фрагменты Fab проанализировали на реактивность со всеми антигенами. Экспрессию Fab проверили с применением анти-каппа ELISA. Все фрагменты Fab дважды проверили в ELISA. Все клоны экспрессировали фрагменты Fab, и фрагменты Fab специфичным образом реагировали с подходящим антигеном. Никаких фоновых проблем в анализах ELISA не обнаружили.

Шесть фагмидных клонов существуют в индивидуально трансформированных глицериновых запасах трансформированного штамма *Escherichia coli* TG1, которые использовали в модельной системе для инокуляции, как описано ниже.

(d) Разработка поликлональной модельной системы с шестью определенными антителами в известной комбинации.

Шесть селектированных клонов, экспрессирующих Fab экспрессии (клонов, экспрессирующих

фрагменты Fab анти-OVA, анти-AP, анти- β_2m , анти-HAP, анти-FVIII и анти-LYS), охарактеризовали, проверяя реактивность экспрессированных фрагментов Fab против подходящих антигенов. Эти клоны формировали часть поликлональной модельной системы для тестирования экспрессии и получения шести определенных антител в известной комбинации (композиция mini-six). Все нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагменты Fab (библиотека mini-six), перенесли в фагмидный вектор (проиллюстрированный pSymvc10, фиг. 4A).

(d.1) Отдельный перенос GOI's из фагмидного вектора в вектор для экспрессии млекопитающего.

Перенос представляющих интерес генов (библиотеки mini-six) из фагмидного вектора в вектор для экспрессии млекопитающего в этом примере выполнили посредством двустадийной процедуры. Первая стадия заключалась в замещении прокариотических промоторов промоторной кассетой млекопитающего в ориентации голова-к-голове. После этой стадии следует перенос варибельной области GOI's, промоторной кассеты и константной каппа в экспрессирующий вектор, как подробно описано ниже и проиллюстрировано на фиг. 4.

Кассету промотора голова-к-голове (промотор A/промотор B) вставили в фагмидный вектор для каждого клона путем использования расщепления SacI/XhoI, с последующим лигированием, что приводит к замене бактериального промотора на промотор млекопитающего. Затем использовали расщепление EcoRI и NotI с тем, чтобы переместить варибельную тяжелую цепь, кассету промотора голова-к-голове (промотор A/промотор B) и полную каппа-цепь (EcoRI/Not I фрагмент) из фагмидного вектора в экспрессирующий вектор.

Пример отдельного переноса каждого клона дается со схемой последовательности выполнения операций на фиг. 4. Эта фигура демонстрирует плазмиду pSymvc10, в которой представляющие интерес тяжелая и каппа-кодирующие последовательности (например, gcO32 OVA) присутствуют в фагмидном векторе, в которую лигировали конструкцию кассеты промотора голова-к-голове млекопитающего с тем, чтобы заменить бактериальные промоторы с помощью переноса фрагмента SacI/XhoI с образованием pSymvc12.

Из этой конструкции, последовательность, кодирующую варибельную тяжелую цепь, включающую промоторную кассету и всю последовательность, кодирующую каппа-цепь, перенесли в вектор, кодирующий изотип млекопитающего (pSymvc20) посредством переноса NotI/EcoRI. Получающийся вектор (pSymvc21) экспрессировал представляющее интерес антитело мыши (например, анти-OVA антитело IgG1).

Последовательность, кодирующую варибельную тяжелую цепь, промоторную кассету млекопитающего и всю последовательность, кодирующую каппа-цепь, от каждого из шести клонов перенесли отдельно посредством переноса NotI/EcoRI, результатом чего стал экспрессирующий вектор млекопитающего pSymvc21, который экспрессирует каждую из кодируемых GOI последовательностей антитела, как антитела IgG1 мыши.

Шесть отдельных клонов pSymvc21, содержащих шесть GOIs, хранили в виде запасов TG1 в глицерине.

Для трансфекции в клетки CHO Flp-In запасы TG1 выращивали отдельно и после нормировки OD₆₀₀ на количество клеток E coli эти шесть культур смешали и использовали для приготовления плазмиды. Этот препарат плазмиды, содержащей шесть GOIs (библиотеку mini-six), использовали для полной трансфекции клеток млекопитающего для экспрессии рекомбинантного поликлонального белка.

(d.2) Массовый перенос GOI's из фагмидных векторов в векторы для экспрессии млекопитающего GOIs (библиотека mini-six) (в данном случае, фрагменты EcoRI/NotI), расположенные в фагмидных векторах и кодирующие шесть определенных фрагментов Fab (анти-OVA, анти-AP, анти- β_2m , анти-HAP, анти-FVIII, и анти-LYS), перенесли массой в виде шести конструкций вектора в векторы для экспрессии млекопитающего, что привело к смеси шести определенных векторов экспрессии.

Экспериментальная процедура, относящаяся к массовому переносу, следует за процедурой, описанной в (d.1), за исключением того, что ее выполнили массой, то есть все шесть GOIs (кодирующие варибельные тяжелые цепи, включая кассету промотора голова-к-голове и полные каппа-цепи) перенесли одновременно в виде смеси шести фагмидных векторов.

Препараты плазмид библиотеки mini-six

Препарат Плазмиды 1 относится к препарату плазмиды смеси шести фагмидных векторов (с последовательностями, кодирующими антитело, содержащимися в векторе pSymvc10).

Препарат Плазмиды 2 относится к препарату плазмиды шести фагмидных векторов с кодирующими последовательностями, содержащимися в векторе pSymvc12 после стадии 1 массового переноса (см. фиг. 4C), что приводит к замене прокариотических промоторов конструкциями промоторных кассет млекопитающего.

Препарат Плазмиды 3 относится к препарату плазмиды после стадии массового переноса 2 (см. фиг. 4D), который предоставляет замену варибельной тяжелой цепи, кассеты промотора голова-к-голове и полной каппа-цепи из pSymvc12 на экспрессирующий вектор млекопитающего (pSymvc21), таким образом, обеспечивая экспрессию шести выбранных антител как полные антитела IgG1 мыши.

Генотипирование клеток TG1, трансформированных препаратами плазмиды, используемыми в массовом переносе

Клетки TG1 трансформировали библиотекой mini-six в полном объеме с помощью электропорации и после инкубации в течение ночи на плашках 2×YT (Sigma Y 2627) отбирали отдельные колонии. В каждом эксперименте отбирали 180 колоний и культивировали в 96 луночных форматах в жидкой среде 2×YT в течение 4 ч. Аликвоты культур разбавляли водой, денатурировали и использовали в качестве матрицы в PCR. Во всех экспериментах амплифицировали варибельную тяжелую цепь. Последовательности праймеров для фагмидных векторов (тип pSymvc10) были представлены:

5'-GCATTGACAGGAGGTTGAGGC-3' (SEQ ID NO 2) и 5'-GCTGCCGACCGCTGCTGGTC-3' (SEQ ID NO 3)

Праймеры для векторов с промоторной кассетой млекопитающего были представлены (тип pSymvc12):

5'-GCATTGACAGGAGGTTGAGGC-3' (SEQ ID NO 4) и

5'-GTGTCCACTCTGAGGTTTCAG-3' (SEQ ID NO 5).

Праймеры для конструкций pSymvc21 были представлены:

5'-CAAATAGCCCTTGACCAGGC-3' (SEQ ID NO 6) и

5'-GTGTCCACTCTGAGGTTTCAG-3' (SEQ ID NO 7).

Все продукты PCR расщепляли как NlaIII, так и HinfI с тем, чтобы гарантировать однозначное генотипирование. Фрагменты расщепления анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле и полосы визуализировали окрашиванием EtBr. Количество отдельных генотипов, схожих со структурой фрагмента, определенной посредством RFLP, соответствует количеству отдельных колоний, представляющих каждое из этих шести антител среди общего количества выбранных колоний.

(d.2a) Массовый перенос из фагмидного вектора в вектора млекопитающего после амплификации ДНК в клетках *E. coli* (двустадийный способ амплификации).

Препарат Плазмиды 1 приготовили из каждого из шести запасов в глицерине *E. coli* TG1, содержащего один из шести фагмидных векторов, составляющих библиотеку mini-six. Запасы выращивали отдельно и после нормировки OD₆₀₀ на количество *E. coli* эти шесть культур смешали в равных количествах и использовали для приготовления плазмиды, результатом чего стал Препарат Плазмиды 1. Распределение генотипа шести фагмидных векторов в Препарате Плазмиды 1 тестировали с помощью трансформации в электрокомпетентные клетки TG1 и последующего анализа RFLP. Распределение различных генотипов в клетках TG1 показано на фиг. 5.

Препарат Плазмиды 1, содержащий поликлональный фагмидный вектор, экспрессирующий равную смесь шести отобранных генотипов фрагмента Fab, расщепляли SacI/XhoI. Затем кассету промотора голова-к-голове (CMV промотор/MPSV промотор) вставили посредством лигирования. Распределение генотипа векторов после обмена промоторами в векторе протестировали в клетках TG1 после трансформации ДНК из стадии лигирования (фиг. 6).

Клетки выселили и выращивали на больших агаровых плашках (245 мм × 245 мм) 2×YT и Препарат Плазмиды 2 приготовили для получения фагмидного вектора, теперь содержащего кассету промотора голова-к-голове (pSymvc12).

Из Препарата Плазмиды 2, последовательность, кодирующую варибельную тяжелую цепь, включая промоторную кассету, и полную последовательность каппа-цепи вывели из фагмидного вектора путем расщепления NotI/EcoRI и переносили в вектор (pSymvc20), который уже содержит домены константной области IgG1 мыши. Результатом этого стал набор векторов pSymvc21, который экспрессирует варибельную область шести выбранных клонов антитела, такого как полные антитела IgG1 мыши.

Перенос промоторов можно в качестве альтернативы выполнить в векторе млекопитающего, кодирующем изотип, изменяя порядок расщепления рестрикции, начиная с NotI/EcoRI для переноса представляющей интерес ДНК в вектор млекопитающего и затем фрагмент расщепления рестрикции SacI/XhoI для вставки области промотора.

Распределение генотипов после переноса последовательности, кодирующей варибельную тяжелую цепь, промоторной кассеты и полной последовательности, кодирующей каппа-цепь, в экспрессирующий вектор, протестировали посредством трансформации клеток TG1 ДНК из второй стадии лигирования (фиг. 7). Клетки выселили на больших агаровых плашках (245 мм × 245 мм) 2×YT и приготовили Препарат Плазмиды 3 (pSymvc21), в котором варибельную область шести клонов экспрессировали в контексте конструкции антитела IgG1 мыши.

Препарат Плазмиды 3 можно использовать для полной трансфекции клеток млекопитающего с тем, чтобы получить рекомбинантную поликлональную продуцирующую линию клеток для экспрессии рекомбинантного поликлонального антитела.

Результаты массового переноса из фагмидного вектора в вектор млекопитающего, кодирующий изотип, после амплификации ДНК в клетках *E. coli* показали, что можно получить сбалансированное распределение шести конструкций вектора после их отдельного выращивания и смешения (Препарат Плазмиды 1, фиг. 5). Шесть конструкций, после обмена промоторной кассетой (Препарат Плазмиды 2,

фиг. 6) так же как после вставки в вектор, кодирующий изотип IgG1 мыши (Препарат Плазмиды 3, фиг. 7), были в сравнимой степени детектируемыми.

(d.2b) Массовый перенос из фагмидного вектора в вектор для экспрессии млекопитающего без амплификации ДНК в *E. coli* после стадии Препарата Плазмиды 1 (одностадийный способ амплификации).

ДНК из Препарата Плазмиды 1 (в данном случае использовали 25 мкг), содержащей поликлональный фагмидный вектор (pSymvc10), экспрессирующий равную смесь шести селективированных генотипов фрагмента Fab, расщепили SacI/XhoI для обмена промоторами. Фрагмент вектора SacI/XhoI очистили и лигировали с кассетой промотора голова-к-голове (промотор CMV/промотор MPSV). После обмена промоторами, без проведения амплификации, вектор с промоторной кассетой CMV/MPSV расщепили NotI/EcoRI с тем, чтобы вырезать целую область с последовательностью, кодирующей варибельную тяжелую цепь, включая промоторную кассету и всю последовательность, кодирующую каппа-цепь из фагмидного вектора для массового переноса в вектор для экспрессии млекопитающего.

После лигирования фрагмента NotI/EcoRI кодирующей варибельную тяжелую цепь, промоторную кассету и каппа-цепь в вектор, кодирующий IgG1 мыши (pSymvc20), получили экспрессирующий вектор, который экспрессирует варибельную область шести отобранных клонов в контексте полных антител IgG1 мыши. Композиция этого вектора экспрессии проиллюстрировали на фиг. 1.

После массового переноса, приводящего к обмену промоторами в векторе и переносу нуклеотидных последовательностей, кодирующих варибельную тяжелую цепь, промоторной кассеты и полной каппа-цепи в вектор для экспрессии млекопитающего распределение генотипов проверили с помощью трансформации клеток TG1 плазмидой из второй стадии лигирования. Клетки высевали на больших агаровых плашках (245 мм × 245 мм) 2× YT и приготовили препарат плазмиды этого Препарата Плазмиды двойного расщепления/лигирования (вектор pSymvc21, в котором варибельную область шести клонов экспрессировали в контексте антитела IgG1 мыши в соответствии с Препаратом Плазмиды 3 из d.2a). Распределение генотипа в клетках TG1 после трансформации препаратом плазмиды из одностадийного способа амплификации показано на фиг. 8.

Одностадийный способ амплификации может внести некоторую конкуренцию среди тяжелых и легких цепей от шести последовательностей, кодирующих Fab, получающуюся из-за образования нежелательных продуктов лигирования, которые в обычных условиях исключаются в ходе амплификации в *E. coli*. Однако если такая конкуренция возникает, можно ввести стадию скрининга с тем, чтобы гарантировать поддержание достаточного клонального многообразия.

(d.2c) Прямая трансфекция клеток млекопитающего после обмена промоторами.

С тем чтобы трансфицировать клетки млекопитающего в полном объеме, для экспрессии рекомбинантного поликлонального антитела можно использовать непосредственно продукт из препаратов плазмиды библиотеки mini-six либо из двухстадийного способа амплификации, либо из одностадийного способа амплификации.

(d.3) Тестирование трансфицированных клеток млекопитающего. С тем чтобы проверить и гарантировать, что массовый перенос и трансфекция в клетки млекопитающего протекают путем, поддерживающим клональное многообразие, и не вводят отклонение в композицию генотипов варибельных последовательностей антител в ходе трансфекции и последующего культивирования, можно использовать известную комбинацию антител модели поликлональной системы mini-six. Способы, посредством которых композицию генотипа отслеживают в ходе всего процесса массового переноса, полной трансфекции и экспрессии млекопитающего, могут содержать следующее:

- секвенирование ДНК изолированных клонов,
- анализ RFLP отдельных клонов,
- ELISA полученной смеси антител,
- масс-спектрометрия полученной смеси антител,
- Taqman PCR относительной композиции геномных последовательностей и мРНК, экспрессирующих различные тяжелые и легкие цепи.

Отклонения в композиции генотипа, введенной в ходе процесса трансфекции, в случае, если они произойдут, могут быть вызваны случайной интеграцией или множественными интегрированными молекулами. Как описано в подробном описании, это вряд ли вызовет проблемы, если использовать линию клеток-хозяев, заранее спроектированную для сайт-специфичной интеграции. Однако ей можно управлять различными способами. Можно провести селекцию против интеграции в случайную область генома (область, отличную от сайт-специфичной области) с применением очень низких количеств ДНК, например 1 мкг/10⁷ клеток, трансфекции с применением липофектамина или 0,2 мкг/10⁷ клеток, при выполнении трансфекции с применением электропорации. Кроме того, ДНК для интеграции можно обеспечить в суперскрученной форме; форме, которая, как известно, не подходит для случайной интеграции.

Единичную или многократную интеграцию вне предварительно разработанного сайта-мишени исключают за счет отрицательной селекции, потому что селективируемый маркер присутствует в геноме без промотора или стартового кодона. Таким образом, реципиенты этих случайных событий интеграции не выживают в процессе селекции.

Трансформанты, продуцирующие многократную интеграцию, в которой одно из событий рекомби-

нации происходит на сайте-мишени, выживают в процессе селекции; однако вероятность этого типа многократной интеграции чрезвычайно низка. Поэтому это событие приводит к минимальной конкуренции поликлонального белка. Также, если встречается многократная интеграция, поскольку имеется от 100 до 1000 других клонов, кодирующих тот же рекомбинантный поликлональный белок, даже если уровень эктопической экспрессии высок, эффект конкуренции составил бы меньше чем приблизительно 1%. Как предварительно упомянуто, вероятность эктопической интеграции можно уменьшить путем уменьшения количества ДНК, используемой в данном способе.

Наименее вероятным событием является многократная тандемная интеграция на сайте-мишени. С применением системы рекомбиназы F1p, описанной в настоящем изобретении, этот тип события происходит редко, поскольку активность вырезания из хромосомы является значительно более высокой, чем активность интеграции. Однако в случае, если тандемная интеграция происходит с неприемлемо высокой частотой, систему F1p можно заменить на систему, в которой возможна вставка только единичной копии (см., например, WO 99/25854; приведенной полностью в качестве ссылаемого материала).

(е) Экспрессия шести определенных антител в известной комбинации в клетках млекопитающего.

В общей сложности для того чтобы свести к минимуму переменные скорости пролиферации, предпочтительно интегрировать каждый определенный GOI (в этом случае каждый отдельный элемент библиотеки mini-six) по меньшей мере в 100, предпочтительно в 1000 и наиболее предпочтительно в 10000 клеток. Предполагается, что поликлональная линия клеток, содержащая большое количество отдельных клеток, экспрессирующих один и тот же GOI (для всех GOI's), со статистической точки зрения меньше подвержена влиянию различий в скоростях пролиферации отдельных клеток и у нее меньше вероятность отклонения в конечной композиции поликлонального белка.

Также может быть полезным обеспечение гомогенной линии клетки-хозяина для экспрессии. Этого можно достичь путем субклонирования линии клетки-хозяина до трансфекции. Этот процесс описан в параграфе, относящемся к клональному многообразию.

Для поликлональных библиотек, в которых требуется дополнительный контроль отклонения, конечную композицию поликлонального белкового продукта можно контролировать путем введения индуцибельного элемента транскрипционного контроля в платформу вектора экспрессии. Подходящие индуцибельные элементы контроля включают, например, BD Tet on/off (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) и GeneSwitch (Invitrogen, Carlsbad, CA). Эти транскрипционные переключатели можно индуцировать в подходящий момент времени (например, когда резерв клеток полностью расширен), чтобы свести к минимуму любое отклонение пролиферации из-за изменения в экспрессии гена или белковом продукте. Настоящий эксперимент выполняют без таких элементов контроля.

После переноса шести выбранных GOI из фагмидного вектора в векторы экспрессии млекопитающего либо отдельно, как описано в (d.1), либо путем массового переноса, как описано в (d.2), векторы экспрессии млекопитающего использовали для трансфекции в горячую точку линии клеток CHO-F1p-In путем применения сайт-специфичной интеграции для экспрессии шести определенных антител, как описано ниже.

Для отдельно перенесенного GOI (d.1) плазмидные ДНК размножали по отдельности и использовали для индивидуальной трансфекции в клетки CHO F1p-In, или размножали по отдельности запасы TG1 и после нормировки OD₆₀₀ на количества клеток E. coli данные шесть культур смешали и использовали для препарата плазмиды. Этот препарат плазмиды, содержащий данные шесть представляющих интерес генов, использовали для полной трансфекции клеток млекопитающего для экспрессии рекомбинантного поликлонального антитела.

Для перенесенного массой GOI (d.2a или d.2b) плазмидные ДНК либо трансфицировали в клетки CHO-F1p-In, либо амплифицировали и очищали (Препарат Плазмиды 3) согласно процедуре, описанной в (d.2a или d.2b,) и затем использовали для полной трансфекции.

(е. 1) Клеточная культура.

Линию клеток-хозяев CHO F1p-In (Invitrogen, Carlsbad, CA) содержали в среде Ham's F-12, с добавлением глутамина (2 мМ) и FCS (1%) и 100 мкг/мл Zeocin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Для субкультивирования клетки отделили с помощью трипсина и разделили в соответствии с инструкциями изготовителя. Клетки выращивали при 5% CO₂, 37°C. Среда и добавки к среде были от Gibco.

Эта линия клеток устойчиво экспрессирует ген слияния lacZ-Zeocin, делая клетки устойчивыми к антибиотиком Zeocin, устойчивость, которая утрачивается при сайт-специфичной интеграции чужеродного гена. Клетки содержат отдельную копию сайта-Мишени Рекомбинации F1p (FRT) и, таким образом, готовы к использованию в качестве линии клеток-хозяев для сайт-направленной интеграции при помощи системы F1p-In (Invitrogen, Carlsbad, CA).

(е.2) Трансфекция клеток CHO.

6-луночные плашки с культурой ткани инокулировали 4,0×10⁵ клеток CHO-F1p-In на лунку и культивировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. Трансфекцию этих клеток выполняли, тестируя различные способы трансфекции с применением FuGENE™6 (Rouche), Lipofectine™, LipofectAmine™ или LipofectAMINE 2000™ (Gibco) в соответствии с инструкциями изготовителя. В этом примере LipofectAMINE

2000™ использовали в качестве реагента трансфекции. Вкратце, в день перед трансфекцией экспоненциально растущие клетки CHO-Flp-In высевали, как описано выше, и культивировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. Лунки с 85-95% слиянием клеток использовали для совместной трансфекции.

Приготовили две пробирки со следующим содержанием.

Пробирка 1. 0,5 мкг отдельного вектора экспрессии с GOI, описанным в (d.1) (например, pSymvc21 с OVA), + 4,5 мкг mp040 (максипрепарат pOG44) (плазмиды, экспрессирующей рекомбиназу Flp) добавили к 250 мкл Optimem (1,5 мл пробирки Eppendorf).

Пробирка 2. 7,5 мкл LipofectAMINE 2000™ добавили к 250 мкл Optimem (1,5 мл пробирки Eppendorf) и культивировали при комнатной температуре (RT, КТ) в течение 5 мин.

Содержимое пробирки 2 перенесли в пробирку 1 с последующей инкубацией при КТ в течение 20 мин.

Комплексы ДНК-Lipofectamine перенесли в лунки с клетками, в соответствии с инструкциями изготовителя.

После 24 ч клетки отделяли с помощью трипсина, разделяли (1:3) и распределяли между колбой Т-25 и 100 мм чашками Петри и выращивали в свежей Питательной Смеси F-12 Ham + 10% FCS + 2 мМ L-глутаминовой среды с 900 мкг Гигромицина В/мл в качестве давления отбора.

(е.3) Селекция сайт-специфичных интегрированных молекул и субкультивирование трансфицированных клеток.

Клетки выращивали под давлением отбора Гигромицина В в течение двух-трех недель, в течение этого периода клетки снабжали каждые 2-4 дня новой питательной средой, содержащей ту же самую концентрацию селектирующего агента. Резерв выживших клеток в колбе Т-25 и в чашках Петри отделили с помощью трипсина, разделили (1:6) и распределили по Т-колбам для дальнейшего размножения при указанном выше давлении отбора. Некоторые отдельные клоны брали (используя так называемые цилиндры клонирования) из чашек Петри, содержащих трансфектанты, произведенные в соответствии со способом, описанным в (d.1), и переносили в новые лунки для размножения и применения в исследованиях уровня экспрессии.

Каждый резерв клеток или отдельных клонов, которые проявляли устойчивость к пороговой концентрации Гигромицина В, впоследствии выращивали для слияния в 6-луночных плашках, пересеивали в чашки Петри, колбы Т-25, Т-80 и Т-175 в соответствующей питательной среде с Гигромицином В. Когда экспоненциально растущие клетки достигают 80%-ного слияния в колбах Т80 с культурой ткани, пробирки каждой линии клеток замораживали и хранили в N₂(L)-морозильнике с жидким азотом.

Для трансфекции смесью плазмид, содержащих данные шесть представляющих интерес генов (библиотеку mini-six), шесть отдельных культур нормировали при OD₆₀₀ на количества E. coli, смешали и использовали для поликлонального препарата плазмиды, содержащего данные шесть представляющих интерес генов. Выполнили процедуру трансфекции, использующую в 7,5 раз больше реактивов и клеток, описанных выше, получая рекомбинантную поликлональную линию клеток, экспрессирующих смесь шести определенных антител.

Шесть линий клеток, экспрессирующих отдельные элементы отобранных антител, и линия клеток, экспрессирующих смесь шести определенных антител в ходе культивирования и размножения тестировали на выработку антитела антиген-специфичным ELISA.

(f) Контроль композиции поликлональной линии клеток, экспрессирующих шесть определенных антител в известной комбинации.

Получили поликлональную линию клеток, экспрессирующую шесть определенных антител путем получения смеси шести отобранных представляющих интерес генов, расположенных в векторах экспрессии, с последующей полной трансфекцией и сайт-специфичной интеграцией в клетки CHO-Flp-In.

За линией клеток наблюдали в течение 34 дней, за которые отслеживали распределение генотипов, экспрессию антитела и скорости пролиферации. Результаты описаны ниже.

(f.1) Распределение генотипов шести отобранных представляющих интерес генов в клетках CHO-Flp-In, трансфицированных препаратом плазмиды из нормированной OD₆₀₀ смеси клеток.

Поликлональную линию клеток CHO-Flp-In трипсинизировали и суспензию клеток разбавили до 10 клеток/мл. После этого 200 мкл перенесли в каждую лунку десяти 96-луночных плашек. Приблизительно по прошествии 10 дней лунку с отдельными колониями идентифицировали посредством микроскопии. Лунки с отдельными колониями промыли, 1× в PBS и добавили 50 мкл воды. Чашки культивировали при 80°C в течение 10 мин и лизаты перенесли в другую 96-луночную плашку. Десять мкл лизатов использовали в 25 мкл OneStep RT-PCR (Qiagen) со следующими праймерами:

5'-CAAATAGCCCTTGACCAGGC-3' (SEQ ID NO 6) и

5'-GTGTCCACTCTGAGGTTTCAG-3' (SEQ ID NO 7)

RFLP выполнили с применением HinfI и NlaIII на 10 мкл смесей RT-PCR в 15 мкл реакциях, которые культивировали при 37°C в течение 2 ч. Фрагменты расщепления визуализировали с применением электрофореза в агарозном геле, с последующим окрашиванием геля EtBr. Распределение генотипов клеток, получающих анти-OVA, анти-AP, анти-β₂m, анти-HAP, анти-FVIII и анти-LYS, наблюдали в течение

некоторого времени (дни 16 и 34 после трансфекции), см. фиг. 9.

(f. 2) ELISA образцов, полученных из клеток CHO-Flp-In, трансфицированных препаратом плазмиды из нормированной OD₆₀₀ смеси E. coli (d. 1).

Поликлональную линию клеток CHO-Flp-In (e. 3) трипсинизировали и 3×10^6 клеток выселили в колбы T-75 в F-12 HAM + 10% FCS + 2 mM L-глутамин и 900 мкг гигромицина. Среда заменялась каждый день, и на день 3 супернатанты селективировали на ELISA. Антигены, (β_2 -микроглобулин (подарок от University of Copenhagen), щелочная фосфатаза (Sigma), овалбумин (Sigma), фактор VIII (подарок от Novo Nordisk, Denmark), лизоцим яичного белка курицы (Sigma) и гаптоглобин (Sigma)) разбавили в 50 mM карбонатном буфере до 10 мкг/мл. Плашки ELISA покрыли антигеном (50 мкл в каждую лунку) и культивировали в течение ночи при 4°C. Лунки промыли 4 раза с промывающим буфером (1x PBS/0,05% Tween 20) и блокировали в течение 1 ч 2%-ным обезжиренным молочным порошком в промывающем буфере (100 мкл в каждую лунку). 50 мкл образцов добавили в лунки и плашки культивировали в течение 1 ч при 37°C. Чашки промыли 4x и вторичные антитела (козий анти-мышинный IgG/HRP, конъюгат (Sigma)) добавляли в течение 1 ч с последующим 4x промыванием. ELISA проводили с субстратом TMB (50 мкл в каждую лунку, DAKO S1600) в течение 5 мин и реакции останавливали путем добавления 50 мкл 1M H₂SO₄. Плашки сразу считывали при 450 нм. Данные, демонстрирующие экспрессию всех шести представляющих интерес антител в лизатах, полученных на день 34 после трансфекции смесью векторов экспрессии, кодирующих шесть представляющих интерес генов, показаны на фиг. 10. Следует отметить, что поскольку данные, представленные на фиг. 10, получены из шести различных антиген-специфичных анализов ELISA, считывания OD₄₅₀ не являются непосредственно сопоставимыми в пересчете на количество антител.

Уровни экспрессии антитела дополнительно проанализировали посредством анти-каппа ELISA оболочки в резервах клеток CHO-Flp-In, трансфицированных каждым отдельным GOI или смесью шести GOI. Результат показан на фиг. 11. Это указывает на то, что уровни экспрессии антител являются сопоставимыми среди индивидуально трансфицированных линий клеток (например, линия клеток, трансфицированная вектором, кодирующим анти- β_2m , экспрессирует сопоставимое количество антитела по сравнению с линией клеток, трансфицированной вектором, кодирующим антитело анти-AP). Здесь используют термин резервы клеток CHO-Flp-In, трансфицированных отдельным GOI, поскольку отдельные линии клеток получают не из отдельных клонов, а резервов клонов, как описано в e. 3.

(g) Выводы из эксперимента.

Во-первых, данные оценки (тесты) сохранения поликлональности в продуцирующей системе показали, что массовый перенос шести отобранных представляющих интерес генов из библиотеки mini-six (кодирующей анти-OVA, анти-AP, анти- β_2m , анти-HAP, анти-FVIII, и анти-LYS) из фагмидных векторов в векторы экспрессии млекопитающего был возможен без внесения отклонения селекции или пролиферации (фиг. 7), таким образом, заканчиваясь с сопоставимыми частотами шести отобранных представляющих интерес генов.

Во-вторых, полная трансфекция клеток CHO-Flp-in смесью конструкций, содержащих шесть отобранных представляющих интерес генов, также привела к сопоставимому распределению конструкций в изолированных клетках млекопитающего. Распределения генотипов шести отобранных представляющих интерес генов в течение некоторого времени (день 16 и 34 после трансфекции) также были сходны (фиг. 9), что указывает на то, что система экспрессии вплоть до дня 34 сохраняла первоначальное, равное распределение этих шести генотипов без внесения отклонения пролиферации.

В-третьих, клетки, трансфицированные в полном объеме смесью этих шести представляющих интерес генов, демонстрировали экспрессию всех шести антител, как показало исследование антиген-специфичного ELISA на супернатантах от клеток спустя 34 дня после трансфекции (фиг. 10). Результаты ELISA для различных антигенов не являются непосредственно сопоставимыми в переводе на количества антител, из-за разницы в средстве связывания. Однако ELISA захвата, основанный на покрытии козым анти-мышинным антителом каппа-цепи, выполненным на супернатантах от: а) шести индивидуально трансфицированных линий клеток CHO-Flp-In, произведенных с применением препарата вектора, как описано в (d.1) и b) на супернатантах поликлональной линии клеток, экспрессирующей смесь шести отобранных представляющих интерес генов, показал сопоставимые уровни экспрессии антитела от данных шести генотипов.

Суммируя вышесказанное, было продемонстрировано, что существует возможность переноса поликлонального GOI в массу из фагмидного вектора в экспрессирующий вектор млекопитающего. Это было предварительно описано Sharon (US 57 89208). Кроме того, смесь конструкций экспрессии млекопитающего можно трансфицировать в клетки млекопитающего в полном объеме и поддерживать при сопоставимой частоте по меньшей мере до дня 34 после трансфекции.

Пример 3А.

Оценка сохранения поликлональности в клеточных культурах, произведенных посредством полной трансфекции субклона от линии клеток CHO-Flp-In библиотекой mini-six.

(a) Субклонирование "исходной" линии клеток CHO Flp-In.

Исходную линию клеток CHO Flp-In (Invitrogen) культивировали, как описано (Пример 3 секция e.1). После трипсинизации клетки подсчитывали и высевали 1 клетку в лунку в 96-луночной культуральной плашки. Приблизительно 14 дней спустя 20 лунок с отдельными колониями идентифицировали и клетки трипсинизировали и переносили в 24-луночные плашки. Один из субклонов, клон 019 CHO-Flp-In, селектировали для будущих исследований после характеристики режима роста, а также уровней экспрессии.

(b) Полная трансфекция и селекция клеток клона 019 CHO-Flp-In.

Трансфекцию выполнили трехкратно и селекцию клеток клона 019 CHO-Flp-In существенным образом выполнили, как описано (пример 3, секция e.2 и e.3), за исключением того, что маркер селекции Неомицина замещает маркер Гигромицина в pSymvc21 (фиг. 4.e). Следовательно, в ходе селекции и культивирования клеток вместо Гигромицина В использовали Генитицин (450 мкг/мл).

(c) ELISA образцов, полученных от клеток клона 019 CHO Flp-In, трансфицированных в полном объеме библиотекой mini-six.

Клетки культивировали в течение 73 дней после трансфекции и образцы для ELISA брали на день 17, 31, 45, 59 и 73. Выполняли количественный ELISA (с применением отдельно очищенных антител mini-six в качестве стандартов), как описано (пример 3, секция f.2). Результаты трех независимых трансфекции показаны на фиг. 12. Наблюдали различные профили экспрессии между различными трансфекциями. Однако все шесть антител были детектируемыми во всех экспериментах вплоть до дня 59.

(d) Вывод из эксперимента.

Эксперименты с системой селекции Неомицина на клетках клона 019 CHO Flp-In показывали относительно слабо меняющиеся профили экспрессии отдельных групп, в течение двух месяцев после полной трансфекции (фиг. 12). Такой период стабильности достаточен для целей производства. С наблюдаемой изменчивостью от партии к партии можно столкнуться при выработке и хранении большого замороженного запаса отдельной группы до получения.

Пример 3В.

Оценка сохранения поликлональности в клеточных культурах, полученных путем смешения индивидуально трансфицированных клеток CHO Flp-In после селекции.

(a) Индивидуальная трансфекция и селекция клеток CHO-Flp-In.

Экспериментальные процедуры для получения данных шести линий клеток, экспрессирующих отдельные элементы библиотеки mini-six, были описаны предварительно (пример 3, секция e.3). Данные шесть линий клеток, экспрессирующих отдельные элементы библиотеки mini-six, смешали сразу после селекции в равных количествах (5×10^5 каждой линии клеток) и смешанную популяцию клеток культивировали в течение 85 дней. Из отдельных линий клеток сделали три отдельные смеси.

(b) ELISA образцов, полученных от поликлональных клеточных культур, полученных в (a).

Образцы брали каждые две недели и композицию антител, экспрессированных из библиотеки mini-six, определяли с помощью ELISA, как описано (пример 3, секция f.2). ELISA выполняли на день 8, 17, 30, 45, 57, 72 и 85 после смешивания. Результаты (среднее \pm SD троекратного эксперимента) показаны на фиг. 13. Все шесть антител были детектируемыми в течение 85 дней после смешивания. Как предварительно указано (пример 3, секция f.2), считывания для различных антител не были непосредственно сопоставимыми, но данные представленные на фиг. 13, показывают относительно устойчивые профили экспрессии, по меньшей мере, вплоть до дня 45 после смешивания, после которого наблюдали основной спад производительности. Кроме того, сравнение результатов, полученных от трех независимых смесей, показало сходные профили экспрессии антител mini-six в течение долгого времени, что указывает на то, что результаты были воспроизводимыми.

(c) Вывод из экспериментов.

Поликлональные клеточные культуры, составленные из смесей клеток, индивидуально трансфицированных определенными элементами библиотеки mini-six, демонстрировали сохранение композиции, по меньшей мере, вплоть до дня 45 после смешивания. Сохранение композиции в течение 45 дней в большинстве случаев является достаточным временем для целей производства. Кроме того, трехкратные эксперименты дали схожие результаты, что таким образом указывает на то, что смешивание клеток, индивидуально трансфицированных различными конструкциями, приводит к смешанным клеточным культурам с низкой изменчивостью от партии к партии.

Пример 4.

Создание рекомбинантной поликлональной линии клеток, продуцирующей антитело антиовальбумина.

(a) Экспрессия поликлональной композиции антитела антиовальбумина.

Коллекцию полностью охарактеризованных овальбумин-связывающих фаговых клонов идентифицировали следующим образом. Четыре восьминедельных самки мышей BALB/c иммунизировали i.p. и s.c. 50 мкг OVA в полном Адьюванте Фрейнда и стимулировали OVA в неполном адьюванте Фрейнда на день 21 и 42 после дня иммунизации 0 и установили, что у всех животных сыворотка была преобразована против OVA, в соответствии с измерением антиген-специфичным ELISA. Из мышей с лучшим ответом

собрали селезенки на день 31 и 52. Фагмидные библиотеки с Fab-дисплеем получали из РНК селезенки с применением фагмидного вектора (pSymvc10), как предварительно описано. Получающиеся библиотеки содержали приблизительно 10^6 независимых клонов. Селекцию этих библиотек выполняли с помощью реакции 5×10^{11} фагмид с Fab-дисплеем с OVA, нанесенными на NUNC immunotubes, с последующей промывкой и кислотной элюцией связывающих фагов. В то время как элюаты от первого цикла пэннинга содержали значительную пропорцию молекул, связывающих OVA, элюаты от первого и второго циклов пэннинга исследовали на наличие OVA-связывающих фаговых клонов.

Вначале OVA-реактивные фаговые клоны идентифицировали с помощью ELISA. Вкратце, плашки ELISA покрывали OVA, и они реагировали с Fabs фагового дисплея, сопровождаемые вторичным анти-телом, конъюгированным с HRP. Для отрицательных контролей использовали несоответствующие антигены (BSA) или несоответствующие Fabs фагового дисплея (анти-AP).

Кроме того, создали способ HDS, основанный на иммобилизации OVA на мембранах PVDF. Результатом этих двух способов стала идентификация отдельных субпопуляций клонов, то есть некоторых клонов, которые узнавали OVA в одной установке, но не в другой и наоборот. Для фаговых клонов с Fab-дисплеем, которые реагировали с OVA посредством либо ELISA, либо HDS, определяли нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен V_H путем секвенирования ДНК, и генетическое многообразие оценивали с помощью филогенетического анализа, с применением программного пакета Vector NTI. Получающаяся группа включает 127 OVA-связывающих клонов, для всех из которых установили нуклеотидные последовательности вариабельной части V_H .

Фрагменты Fab, экспрессированные 127 OVA-связывающими клонами, могут связывать овальбумин как в нативной, так и в денатурированной форме. Из этого набора идентифицировали приблизительно 30 различных клонов, содержащихся в фагмидном векторе, например pSymvc10, для использования в массовом переносе и экспрессии млекопитающего. Эти антитела экспрессируются в форме как IgA, IgG2A, так и IgG2B антитела мыши. Поскольку последовательности ДНК этих клонов, продуцирующих антитела, полностью охарактеризовали, можно контролировать распределение генотипов на протяжении всего массового переноса и процедуры экспрессии млекопитающего с применением тех же способов, которые используют для модельной системы с шестью определенными антителами, описанными в примере 3.

(b) Массовый перенос OVA-специфичных последовательностей антител в вектор для экспрессии млекопитающего.

Перенос представляющих интерес генов из фагмидного вектора в экспрессирующий вектор представляет собой двустадийную процедуру (проиллюстрированную на фиг. 4), в которой первая стадия представляет собой обмен промоторами с промоторной кассетой с ориентацией отобранных промоторов млекопитающего голова-к-голове, за этим следует перенос вариабельной области представляющих интерес генов и промоторной кассеты в экспрессирующий вектор. Кассету промотора голова-к-голове (промотор А/промотор В) можно вставить в фагмидный вектор каждого клона с использованием расщепления SacI/XhoI, с последующим лигированием, приводящим к замещению бактериального промотора промотором млекопитающего (pSymvc12).

Затем расщепление EcoRI и NotI переносит последовательности, кодирующие вариабельную тяжелую цепь, кассету промотора голова-к-голове (промотор А/промотор В) и полную каппа-цепь из фагмидного вектора (pSymvc12) в вектор, кодирующий изотип, pSymvc20. Вектор pSymvc20 может принять любой фрагмент NotI/EcoRI от фагмидного вектора. Этот фрагмент переносит последовательность, кодирующую вариабельную тяжелую цепь, для присоединения к последовательностям константной тяжелой цепи в pSymvc20, а также для присоединения всей последовательности, кодирующей каппа-цепь, к последовательности bGH Поли А. Результатом этого массового переноса становятся векторы экспрессии, как показано на фиг. 1, которые экспрессируют вариабельные тяжелые области и полные каппа-цепи, как антитела IgG2B мыши после массового переноса.

Вектор, pSymvc20, может содержать константные области тяжелой цепи генов IgA, IgG2A, IgG2B, IgE или IgG1 мыши, и таким образом, может экспрессировать любой из выбранных подходящих изотипов иммуноглобулина мыши.

(c) Экспрессия рекомбинантного поликлонального антитела анти-овальбумина.

Посредством массового переноса последовательности, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи, промоторы и всю каппа-цепь, переносят из фаговой библиотеки векторов в векторы, кодирующие изотип, результатом чего становится поликлональная композиция вектора экспрессии млекопитающего. За этим следует трансфекция и сайт-специфичная интеграция в линию клеток CHO-Flp-In, создающая продуцирующую линию клеток рекомбинантного поликлонального антитела. Эту последнюю линию клеток производят путем направления представляющего интерес гена, кодирующего каждый элемент рекомбинантного поликлонального белка в ту же специфичную область в геноме каждой трансфицированной клетки, и в то же время интегрирования только одной копии конструкции экспрессии, содержащей указанную последовательность нуклеиновой кислоты в каждой трансфицированной клетке.

Клеточные культуры и процедура трансфекции и селекции являются теми же, что описаны в примере 3 (e.1-e.3).

(d) Контроль стабильности композиции.

С тем чтобы гарантировать, что массовый перенос и трансфекция в клетки млекопитающего встречаются без внесения значительного отклонения в отношении клонирования, экспрессии и многообразия среди отдельных клонов, процесс массового переноса и экспрессию млекопитающего можно проверить следующими способами:

- 1) анализ времени образования резервов клеток от каждой трансфицированной конструкции,
- 2) анализ уровня экспрессии резервов клеток от каждой трансфицированной конструкции,
- 3) анализ RFLP на отдельных клетках,
- 4) ELISA полученной смеси антител,
- 5) масс-спектрометрия полученной смеси антител,
- 6) анализ Taqman PCR (PCR в реальном времени) на определенном объеме серии с использованием определенных V область-специфичных праймеров с тем, чтобы установить долю каждого несходного клона, или
- 7) анализ группы, культивируемой в течение некоторого времени с давлением отбора и без него (гигромицин), можно выполнить для следующих параметров:
 - a) клональное распределение,
 - b) белковые уровни экспрессии (количество и распределение),
 - c) геномная стабильность,
 - d) эффекты адаптации к питательным средам без сыворотки,
 - e) получение композиции рекомбинантного поликлонального антитела анти-овальбумина.

Линию клеток CHO-Flp-In, продуцирующую рекомбинантное поликлональное антитело, выращивают в различных культуральных системах, включая обычные малые культуральные колбы, многоуровневые фабрики клеток Nunc и малые биореакторы с высоким выходом (MiniPerm, INTEGRA-CELLine). Дополнительно, линии клеток адаптируют к свободной сывороточной суспензии для последующего культивирования в центрифужных пробирках, полых волокнах и биореакторах.

Среды, используемые для роста селектированных линий клеток, представляют собой среды, не содержащие сыворотку, не содержащие белки или химически определенные среды, рекомендованные изготовителем (Invitrogen, B&D, Nyclone).

Собирают супернатанты от прикрепленных клеток или клеток в суспензии, которые культивируют без селекции (гигромицин). Собранные супернатанты анализируют и характеризуют, как описано (3f). Выход получения, функциональность и качество полученных антител проверяют в течение и после роста клеток в условиях с подпиткой или в условиях перфузии. Клетки в суспензии используют для инокуляции больших центрифужных пробирок или биореакторов.

Поликлональное антитело из собранных супернатантов очищают для дальнейшего применения в исследовании на животных.

Другие варианты выполнения изобретения очевидны для специалистов в данной области техники после рассмотрения описания и при выполнении на практике раскрытого здесь изобретения. Предполагается, что описание и примеры должны рассматриваться только в качестве примеров, а истинные объем и сущность изобретения указаны в следующей формуле изобретения.

Список последовательностей

<110> Synphogen A/S
 <120> СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ
 <130> 15685PCT00
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 1
 gaagttccta ttccgaagtt cctattctct aaaaagtata ggaacttc 48
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетический ПЦР-праймер
 <400> 2
 gcattgacag gaggttgagg c 21
 <210> 3
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетический ПЦР-праймер
 <400> 3
 gctgcccacc gctgctgctg gtc 23
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетический ПЦР-праймер
 <400> 4
 gcattgacag gaggttgagg c 21
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетический ПЦР-праймер
 <400> 5
 gtgtccactc tgaggttcag 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетический ПЦР-праймер
 <400> 6
 caaatagccc ttgaccagcc 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетический ПЦР-праймер
 <400> 7
 gtgtccactc tgaggttcag 20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения линии клеток, продуцирующей рекомбинантный поликлональный белок, предусматривающий:

а) получение библиотеки векторов, содержащей совокупность вариантных последовательностей нуклеиновых кислот, где каждый из указанных векторов включает 1) одну-единственную копию определенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей определенный элемент поликлонального белка, содержащего элементы, которые связывают специфический антиген, и 2) одну или несколько последовательностей узнавания рекомбиназы;

б) введение указанной библиотеки векторов в линию клеток-хозяев, где геном каждой отдельной клетки указанной линии клеток-хозяев в единственном специфичном сайте содержит последовательности узнавания рекомбиназы, соответствующие последовательностям узнавания рекомбиназы вектора;

в) обеспечение присутствия в указанных клетках одной или нескольких различных рекомбиназ с тем, чтобы вариантные последовательности нуклеиновых кислот стадии (а) были сайт-специфически интегрированы в клетки линии клеток-хозяев, где указанная одна или несколько рекомбиназ либо i) экспрессируются указанными клетками, в которые была введена указанная последовательность нуклеиновой кислоты; либо ii) оперативно кодируется векторами стадии (а); либо iii) обусловлена экспрессией дополнительного вектора, кодирующего рекомбиназу; либо iv) вводится в клетку; и

д) селекцию клеток, содержащих интегрированную копию указанной библиотеки вариантных последовательностей нуклеиновых кислот, для получения линии клеток, продуцирующей рекомбинантный поликлональный белок.

2. Способ по п.1, где поликлональный белок является гетерологичным по отношению к указанной линии клеток.

3. Способ по п.1 или 2, где указанный поликлональный белок представляет собой поликлональное антитело или фрагмент антитела.

4. Способ по п.1 или 2, где указанный поликлональный белок представляет собой поликлональный рецептор Т-клетки или фрагмент рецептора Т-клетки.

5. Способ по любому из пп.1-4, где указанную библиотеку векторов вводят в указанную линию клеток-хозяев посредством частичной трансфекции аликвот указанных клеток-хозяев фракциями, содержащими от 5 до 50 отдельных векторов указанной библиотеки векторов, и указанные клетки объединяют до или после селекции на стадии (д) с получением линии клеток, продуцирующей рекомбинантный поликлональный белок.

6. Способ по любому из пп.1-4, где указанную библиотеку векторов для сайт-специфичного интегрирования вводят в указанную линию клеток-хозяев посредством отдельной трансфекции указанных клеток-хозяев индивидуальными представителями указанной библиотеки векторов и указанные клетки объединяют с получением линии клеток, продуцирующей рекомбинантный поликлональный белок, до или после селекции на стадии (д).

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где популяцию вариантных нуклеиновых кислот стадии (а) выделяют или идентифицируют с помощью процедуры скрининга, которая позволяет идентифицировать и/или выделить нуклеиновые кислоты, кодирующие белок, который связывает указанный специфический антиген.

8. Способ по п.7, где процедура скрининга включает стадию биопэннинга и/или иммунологического анализа.

9. Способ по п.7 или 8, где указанная процедура скрининга выбрана из группы, состоящей из фагового дисплея, рибосомного дисплея, ДНК дисплея, РНК-пептидного дисплея, ковалентного дисплея, дисплея бактериальной поверхности, дисплея дрожжевой поверхности, дисплея эукариотического вируса, ELISA и ELISPOT.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная библиотека вариантных последовательностей нуклеиновых кислот включает по меньшей мере 3 вариантные последовательности нуклеиновых кислот.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где стадия д) п.1 включает отбор клеток, в которых отдельные представители указанной библиотеки вариантных последовательностей нуклеиновых кислот интегрированы в единственный специфичный сайт, который способен опосредовать высокоэффективную экспрессию каждого элемента указанного рекомбинантного поликлонального белка.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где каждая отдельная последовательность нуклеиновой кислоты содержит пару сегментов гена, которые кодируют элемент поликлонального белка, состоящего из двух различных полипептидных цепей.

13. Способ по п.12, где указанная пара сегментов гена содержит последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела, и последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи антитела.

14. Способ по п.12, где указанная пара сегментов гена содержит последовательность, кодирующую переменную область альфа-цепи рецептора Т-клетки, и последовательность, кодирующую переменную

ную область бета-цепи рецептора Т-клетки.

15. Способ по п.12, где указанная пара сегментов гена содержит последовательность, кодирующую варируемую область гамма-цепи рецептора Т-клетки, и последовательность, кодирующую варируемую область дельта-цепи рецептора Т-клетки.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная библиотека вариантов последовательностей нуклеиновых кислот содержит варианты последовательности нуклеиновых кислот с природным многообразием.

17. Способ по п.16, где природное многообразие локализовано в областях, кодирующих CDR, присутствующих в указанных вариантных последовательностях нуклеиновых кислот.

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная линия клеток представляет собой линию клеток млекопитающего.

19. Способ по п.18, где указанная линия клеток млекопитающего выбрана из группы, состоящей из клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток COS, клеток ВНК, YB2/O, NIH 3T3, клеток миеломы, фибробластов, HeLa, HEK 293, PER.C6 и линий клеток, полученных на их основе.

20. Способ получения поликлонального белка, где указанный поликлональный белок содержит определенные элементы, которые связывают специфический антиген, предусматривающий:

а) получение линии клеток в соответствии со способом по любому из пп.1-19, содержащей популяцию вариантных последовательностей нуклеиновых кислот, где каждая из указанных последовательностей нуклеиновых кислот кодирует определенный элемент указанного поликлонального белка и где каждая из указанных последовательностей нуклеиновых кислот интегрирована в один и тот же единственный сайт генома каждой отдельной клетки указанной линии клеток;

б) культивирование указанной линии клеток в условиях, способствующих экспрессии указанного поликлонального белка; и

с) выделение указанного экспрессированного поликлонального белка из клеток или супернатанта клеточной культуры.

21. Способ по п.20, где поликлональный белок является гетерологичным по отношению к указанной линии клеток.

22. Способ по любому из пп.20-21, где популяцию вариантных нуклеиновых кислот стадии (а) выделяют или идентифицируют на более ранней стадии с помощью процедуры скрининга, которая позволяет идентифицировать и/или выделить нуклеиновые кислоты, кодирующие белок, который связывает указанный специфический антиген.

23. Способ по п.22, где процедура скрининга включает стадию биопаннинга и/или иммунологического анализа.

24. Способ по п.22 или 23, где указанная процедура скрининга выбрана из группы, состоящей из фагового дисплея, рибосомного дисплея, ДНК дисплея, РНК-пептидного дисплея, ковалентного дисплея, дисплея бактериальной поверхности, дисплея дрожжевой поверхности, дисплея эукариотического вируса, ELISA и ELISPOT.

25. Способ по любому из пп.20-24, где указанный поликлональный белок представляет собой поликлональное антитело или фрагмент антитела.

26. Способ по любому из пп.20-24, где указанный поликлональный белок представляет собой поликлональный рецептор Т-клетки или фрагмент рецептора Т-клетки.

27. Способ по любому из пп.20-26, где во время культивирования указанной линии клеток измеряют относительные уровни экспрессии вариантных последовательностей нуклеиновых кислот.

28. Способ по п.27, где указанные уровни экспрессии измеряют по уровню мРНК и/или уровню белка.

29. Способ по п.27 или 28, где культивирование на стадии (б) завершают не позднее момента, когда относительные уровни экспрессии окажутся вне заранее определенного диапазона.

30. Линия клеток, продуцирующая рекомбинантный поликлональный белок, состоящая, по существу, из клеток, трансфицированных библиотекой векторов, включающей совокупность вариантных последовательностей нуклеиновых кислот, где каждая клетка указанной линии трансфицирована одним представителем библиотеки векторов и способна экспрессировать одну определенную последовательность нуклеиновой кислоты, где указанная последовательность нуклеиновой кислоты а) кодирует определенный элемент поликлонального белка, который связывает специфический антиген, б) расположена на одном и том же единственном сайте в геноме отдельных клеток указанной линии, и с) не ассоциирована в природе с указанными клетками, составляющими линию.

31. Линия клеток, продуцирующая рекомбинантный поликлональный белок, по п.30, где указанная библиотека вариантных последовательностей нуклеиновых кислот кодирует поликлональное антитело или фрагмент антитела с природным разнообразием отдельных элементов указанного поликлонального антитела или фрагментов антитела.

32. Линия клеток, продуцирующая рекомбинантный поликлональный белок, по п.30, где указанная библиотека вариантных последовательностей нуклеиновых кислот кодирует поликлональный рецептор Т-клетки или фрагмент рецептора Т-клетки с природным разнообразием отдельных элементов указанно-

го поликлонального рецептора Т-клетки или фрагмента рецептора Т-клетки.

33. Линия клеток, продуцирующая рекомбинантный поликлональный белок, по любому из пп.30-32, где указанная линия клеток представляет собой линию клеток млекопитающего.

34. Линия клеток, продуцирующая рекомбинантный поликлональный белок, по п.33, где указанная линия клеток млекопитающего выбрана из группы, состоящей из клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток COS, клеток ВНК, YB2/O, NIH 3T3, клеток миеломы, фибробластов, HeLa, HEK 293, PER.C6 и линий клеток, полученных на их основе.

35. Библиотека векторов для сайт-специфичной интеграции, содержащая совокупность природных вариантных последовательностей нуклеиновых кислот, где каждый из указанных векторов включает 1) одну-единственную копию определенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей определенный элемент поликлонального белка, содержащего элементы, которые связывают специфический антиген, и 2) одну или несколько последовательностей узнавания рекомбиназы.

36. Библиотека по п.35, где указанная совокупность природных вариантных последовательностей нуклеиновых кислот кодирует поликлональное антитело или фрагмент антитела.

37. Библиотека по п.35, где указанная совокупность природных вариантных последовательностей нуклеиновых кислот кодирует поликлональный рецептор Т-клетки или фрагмент рецептора Т-клетки.

38. Библиотека по любому из пп.35-37, где каждый представитель указанной библиотеки векторов дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбиназу.

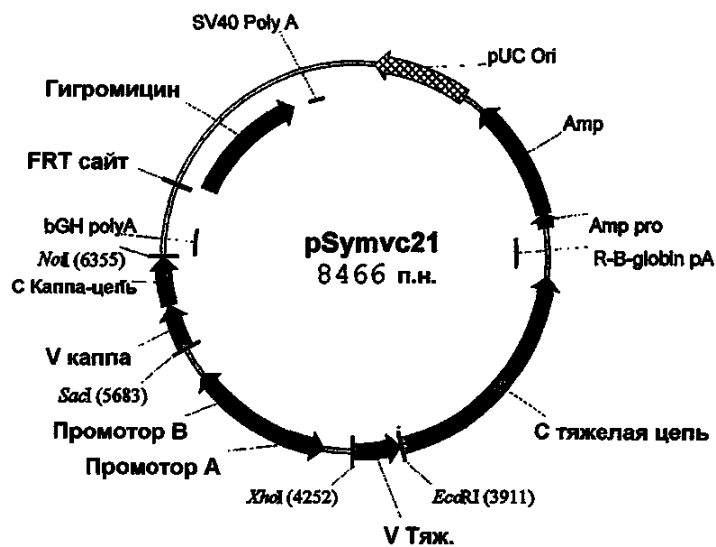
39. Популяция клеток, содержащая совокупность вариантных последовательностей нуклеиновых кислот, где каждая из указанных последовательностей нуклеиновых кислот кодирует определенный элемент поликлонального белка, содержащего элементы, которые связывают специфический антиген, и где каждая из указанных последовательностей нуклеиновых кислот интегрирована в один и тот же единственный сайт генома каждой отдельной клетки указанной популяции.

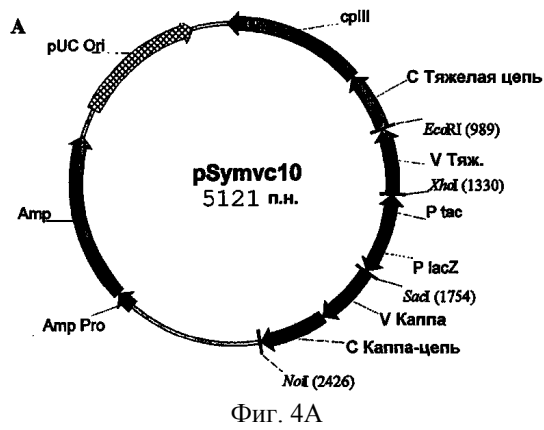
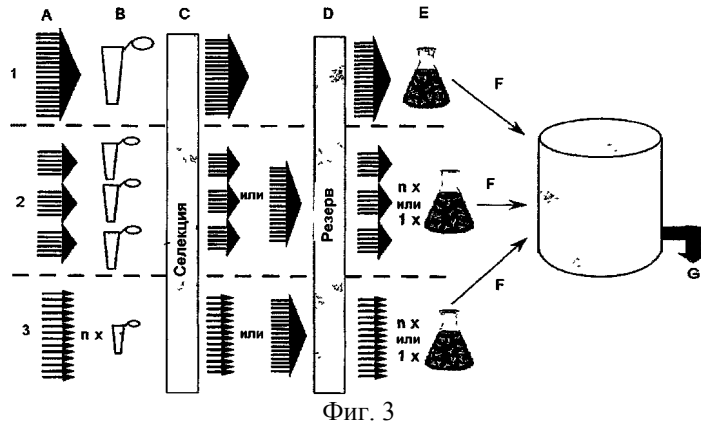
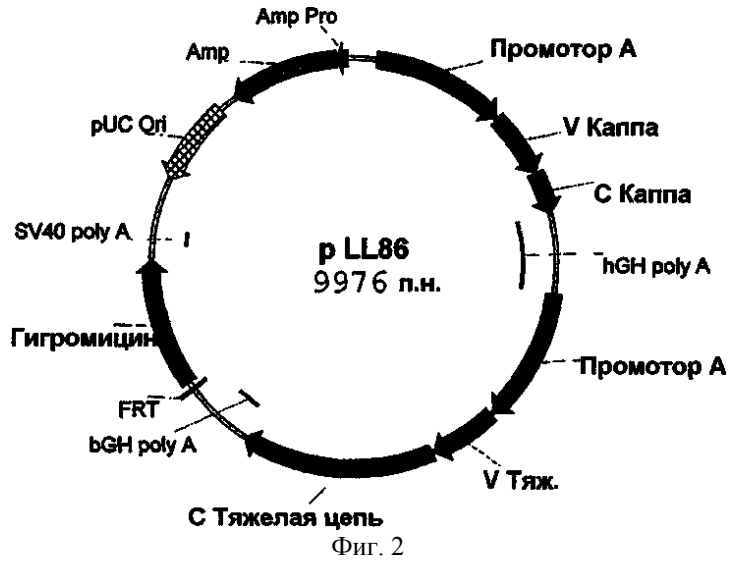
40. Популяция клеток по п.39, где совокупность вариантных последовательностей нуклеиновых кислот входит в состав библиотеки по любому из пп.35-38.

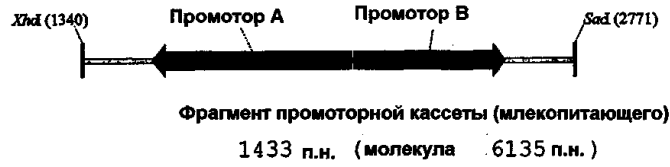
41. Популяция клеток по п.40, где по меньшей мере 50% кодирующих последовательностей, изначально присутствующих в библиотеке по любому из пп.35-38, могут быть идентифицированы как различные отдельные элементы поликлонального белка, экспрессированного указанной популяцией клеток.

42. Линия клеток по п.31, экспрессирующая поликлональное антитело, трансфицированная библиотекой пар сегментов генов V_H и V_L , где каждая клетка линии клеток трансфицирована и способна экспрессировать одну пару генов V_H и V_L библиотеки, кодирующую определенный элемент поликлонального антитела, связывающий специфический антиген, и расположенную в одном том же единственном сайте в геноме отдельных клеток указанной линии клеток, где указанная последовательность нуклеиновой кислоты не ассоциирована в природе с указанными клетками.

43. Линия клеток по п.42, где библиотека пар сегментов генов V_H и V_L представляет собой библиотеку по п.36.



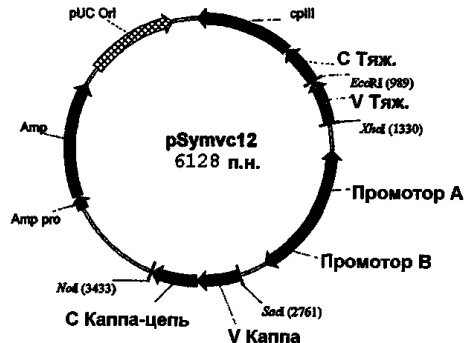




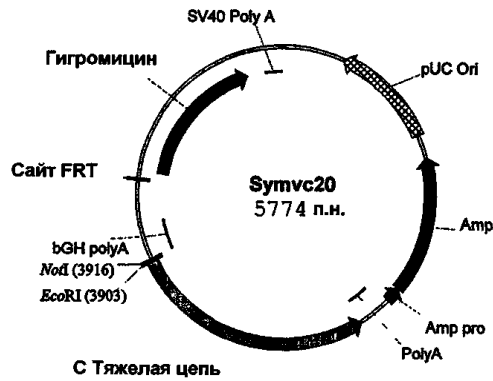
Стадия 1: ↓ Расщепление с помощью SacI+XhoI, лигирование фрагментов из А и В, для получения *sumvc12*

продолжение на следующей странице

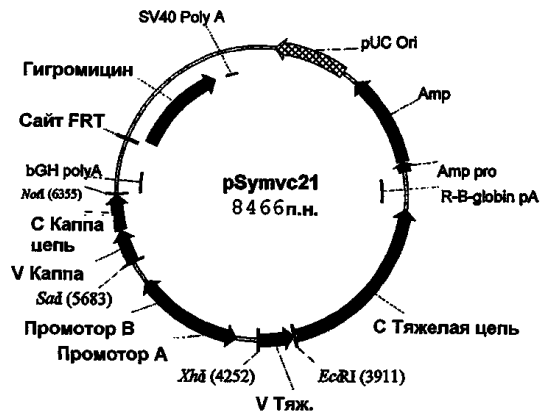
Фиг. 4В



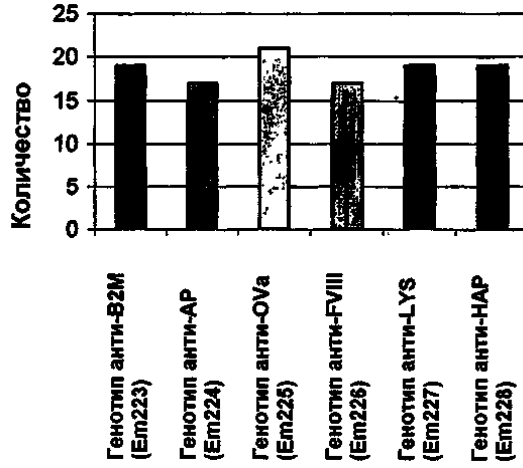
Стадия 2 → Расщепление *sumvc12+Sumvc20* с помощью EcoRI/NotI и лигирование



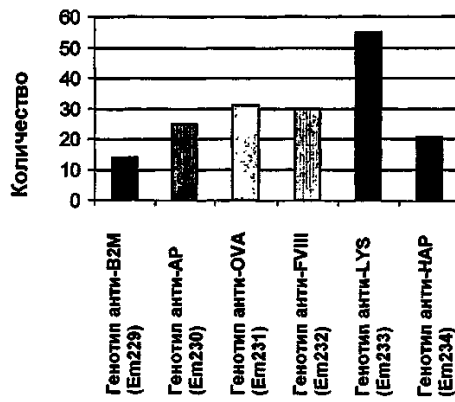
Фиг. 4С-4D



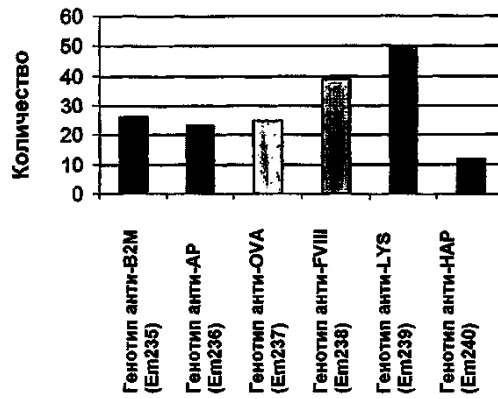
Фиг. 4Е



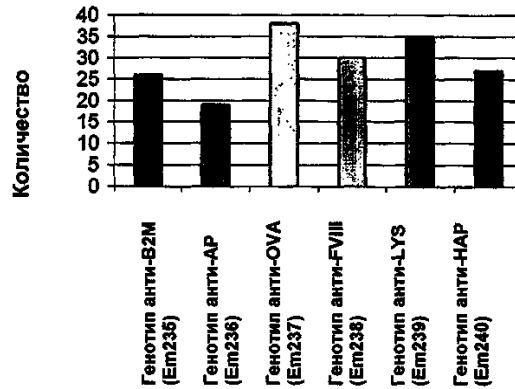
Фиг. 5



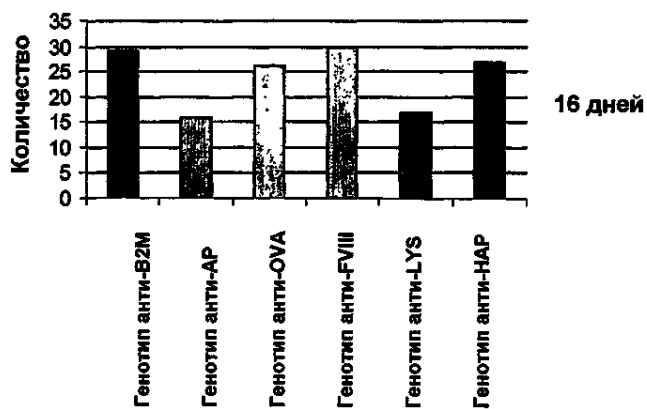
Фиг. 6



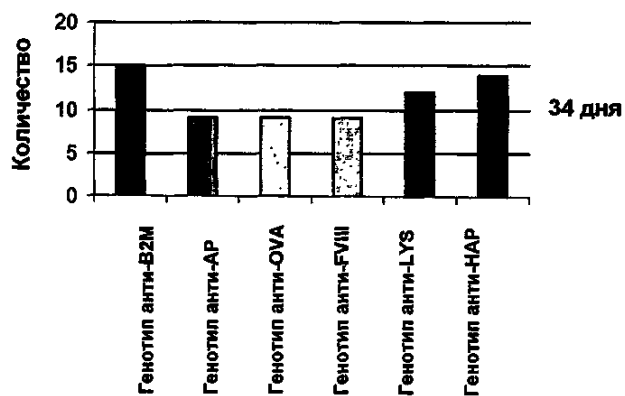
Фиг. 7



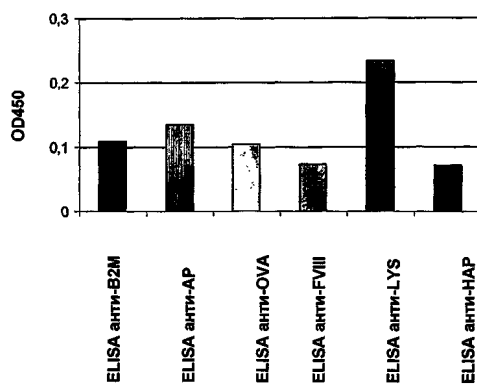
Фиг. 8



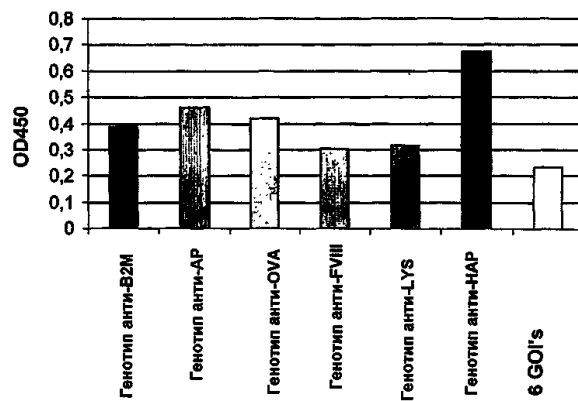
Фиг. 9А



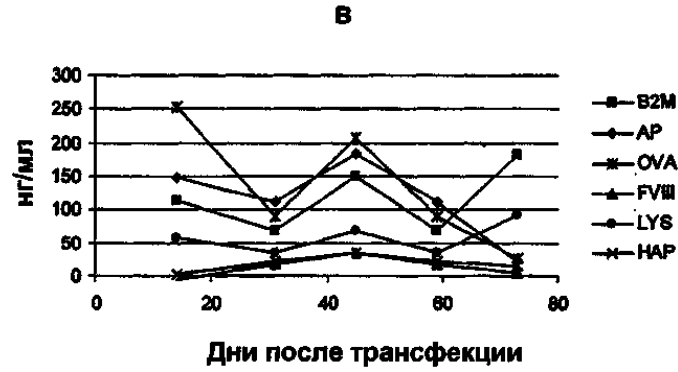
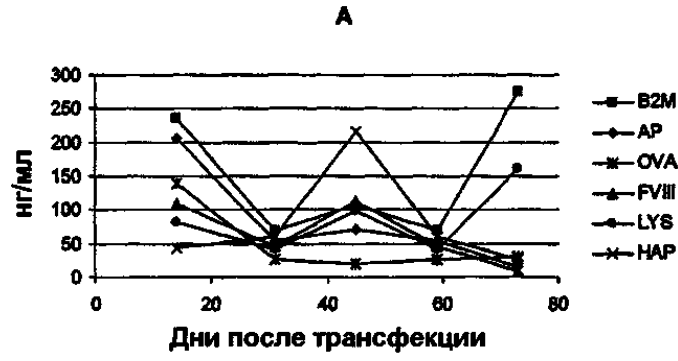
Фиг. 9В



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

