



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011111580/10, 28.08.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.08.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
28.08.2008 EP 08163161.6

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2012 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 20.09.2014 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2005073375 A1, 11.08.2005 . EP 0001605058 A1, 14.12.2005 . US 20030033616 A1, 13.02.2003 . US 20050136049 A1, 23.06.2005 . US 20030118592 A1, 26.06.2003 . RU 2209247 C2, 27.07.2003

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 28.03.2011

(86) Заявка РСТ:
EP 2009/006246 (28.08.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/022961 (04.03.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

Томас ЙОШТОК (DE),
Ханс-Петер КНОПФ (DE),
Буркхард ВИЛЬМС (CH),
Одре Жосьян НОММАЙ (CH)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС АГ (CH)

(54) ДИСПЛЕЙ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ИЗОФОРМ НА ОСНОВЕ ПРОЧИТЫВАНИЯ ТЕРМИНИРУЮЩЕГО КОДА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной биологии и генетической инженерии. Предложен способ селекции эукариотической клетки-хозяина, экспрессирующей желаемый уровень интересующего полипептида, включающий трансфекцию клеток гетерологичной нуклеиновой кислотой, содержащей по меньшей мере одну кассету, содержащую по меньшей мере первый полинуклеотид, кодирующий интересующий полипептид, стоп-кодон, расположенный по

направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида, второй полинуклеотид, расположенный по направлению экспрессии относительно стоп-кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен, культивирование клеток-хозяев для экспрессии интересующего полипептида так, чтобы по меньшей мере часть рассматриваемого полипептида экспрессировалась в виде слитого полипептида, содержащего иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен, причем такой

слитый полипептид экспонируется на поверхности указанной клетки-хозяина, селекцию клетки по наличию или количеству слитого полипептида, экспонируемого на клеточной поверхности.

Изобретение может быть использовано в биотехнологии для селекции высокопродуктивных клеточных линий. 6 н. и 9 з.п. ф-лы, 8 табл., 11 пр.

R U 2 5 2 8 8 5 8 C 2

R U 2 5 2 8 8 5 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011111580/10, 28.08.2009**

(24) Effective date for property rights:
28.08.2009

Priority:

(30) Convention priority:
28.08.2008 EP 08163161.6

(43) Application published: **10.10.2012 Bull. № 28**

(45) Date of publication: **20.09.2014 Bull. № 26**

(85) Commencement of national phase: **28.03.2011**

(86) PCT application:
EP 2009/006246 (28.08.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/022961 (04.03.2010)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**Tomas JOSHTOK (DE),
Khans-Peter KNOPF (DE),
Burkkhard VILMS (CH),
Odre Zhos'an NOMMAJ (CH)**

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH)

(54) **DISPLAY ON POLYPEPTIDE ISOFORM CELL SURFACE ON BASIS OF TERMINATION CODON READTHROUGH**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to molecular biology and genetic engineering. What is presented is a method for selecting an eukaryotic host cell expressing a desired level of polypeptide of interest involving cell transfection by heterologous nucleic acid containing at least one cartridge containing at least one first polynucleotide coding the polypeptide of interest, a stop codon arranged towards the expression in relation to the first polynucleotide, a second polynucleotide arranged towards the expression in relation to the stop codon coding an immunoglobulin transmembrane

anchor domain, culturing host cells for the expression of the polypeptide of interest so that a portion of the disclosed polypeptide is expressed in the form of a fused polypeptide containing the immunoglobulin transmembrane anchor domain; this fused polypeptide is exposed on the surface of the above host cell, selecting the cell by the presence or the amount of the fused polypeptide exposed on the cell surface.

EFFECT: invention can be used in biotechnology for selecting the high-production cell lines.

15 cl, 8 tbl, 11 ex

Настоящее изобретение относится к способу селекции высокопродуктивных клеточных носителей млекопитающих, равно как и к векторам и клеткам-носителям, подходящим для применения в соответствующем способе. Помимо этого настоящее изобретение относится к способу эффективной выработки полипептидов с высокими выходами.

5 Селекция высокопродуктивных клеточных линий является важным первым шагом в разработке любых биологических процессов и представляет собой одну из серьезнейших проблем в биотехнологии. Одна из проблем состоит в том, что подобные высокопродуктивные клоны редки и могут затрачивать существенную часть своей энергии на выработку полипептидов, вследствие чего характеризуются пониженными скоростями роста. Это приводит к чрезмерному росту и непродуктивным или
10 низкопродуктивным клеткам. Однако для выработки полипептидов желательно получить клеточные линии, вырабатывающие целевой полипептид с высоким выходом. Традиционно, высокопродуктивные клеточные линии выбирают посредством ряда клонирований методом предельных разведений с последующим анализом продуктов.
15 Однако данный традиционный путь имеет несколько недостатков, будучи одновременно трудозатратным и дорогим. Помимо этого процесс в целом связан с большими затратами времени, его завершение может потребовать нескольких месяцев, и даже после этого отсутствуют гарантии того, что клонированная клеточная линия будет стабильной и, таким образом, полезной для промышленной биотехнологии. Более того, селекция
20 наиболее высокопродуктивных клеток может потребовать компромисса с ограничениями практического характера в отношении числа клеток, для которых может осуществляться скрининг, что потенциально снижает эффективность селекции высокопродуктивных клеток с низким содержанием.

В связи с этим, было потрачено много усилий на разработку альтернативных способов селекции высокопродуктивных клонов. Например, проточная цитометрия облегчила
25 мониторинг продуктивности и выделение клеток с определенными характеристиками. Важные преимущества проточной цитометрии включают способность быстро осуществлять скрининг большого числа клеток с возможностью различать клеточные субпопуляции и способность эффективно выбирать клетки с низким содержанием,
30 демонстрирующие искомые характеристики. Большинство из традиционных подходов к селекции высокопродуктивных клеток, задействующих проточную цитометрию, были введены для селекции гибридомных клеток.

Один из подходов основывается на содержании антител на клеточной поверхности гибридомных клеток, демонстрирующих повышенное количество антител на клеточной
35 поверхности, которые могут быть обнаружены и выделены посредством применения флуоресцентно-меченых антител. Однако количественная корреляция пока не получила широкого описания.

Другие подходы были предназначены для селекции клеток на основе секретируемого антитела в качестве альтернативной стратегии, имеющей целью преодоление некоторых
40 ограничений способов селекции клеток на основе поверхностных антител. Один из подходов задействует аффинную матрицу, другие используют гелевые микрокапельные методики. Последний способ основывается на создании искусственной аффинной матрицы, специфичной в отношении рассматриваемого секретируемого продукта. Секретируемые молекулы связываются с аффинной матрицей на поверхности
45 секретирующей клетки, после чего их метят специфическими флуоресцентными реагентами для проточного цитометрического анализа и клеточного сортирования.

Микрокапельная инкапсуляция включает полную инкапсуляцию одиночных клеток в агарозных гранулах. Данные гранулы содержат специфичные антитела захвата и,

таким образом, одновременно захватывают секретируемый продукт, предотвращая кроссфиндинг продукта между клетками.

Другие способы основываются на коэкспрессии генов-маркеров, детектируемых посредством проточной цитометрии. Недостатками являются слабая связь экспрессии гена-маркера (например, зеленого флуоресцентного белка) с экспрессией рассматриваемого гена. Кроме того, экспрессия гена-маркера требует от клеток дополнительных затрат энергии и может вызвать стресс.

Альтернативный способ основывается на индуцируемой коэкспрессии связанных с мембраной белков захвата. Связанные с мембраной белки захвата прикреплены к клеточной поверхности и захватывают секретируемые полипептиды, как только они высвобождаются из клеток. Эти захваченные молекулы могут быть обнаружены на поверхности клетки. Однако для этого необходимы клетки-хозяева, созданные методами генной инженерии; помимо этого, может происходить кроссфиндинг непродуктивных клеток.

Для селекции продуктивных клеток также использовали секретируемые продукты, временно связывающиеся с клеточной мембраной. Однако при этом происходит кроссфиндинг непродуктивных клеток; кроме того, данный способ характеризуется довольно высокой фоновой активностью. Более того, было обнаружено, что невозможно осуществить несколько циклов обогащения и селекции.

Таким образом, существует потребность в развитии технологии селекции высокопродуктивных клеток-носителей. В связи с этим, объектом настоящего изобретения является способ обнаружения высокопродуктивных рекомбинантных клеток-носителей среди обширной популяции непродуктивных, низкопродуктивных и/или среднепродуктивных клеток, а также способ получения полипептидов с высоким выходом.

Настоящее изобретение решает данную проблему, предлагая способ обогащения или селекции по меньшей мере одной эукариотической клетки-хозяина, экспрессирующей представляющий интерес полипептид на искомом уровне, включающий:

а) получение набора эукариотических клеток-носителей, содержащих гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую хотя бы одну кассету (Cas-POI), содержащую хотя бы первый полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид, по меньшей мере один терминирующий кодон, расположенный по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида, а также второй полинуклеотид, расположенный по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант;

б) культивирование эукариотических клеток-носителей с целью экспрессии представляющего интерес полипептида таким образом, чтобы хотя бы часть рассматриваемого полипептида экспрессировалась в виде гибридного полипептида, включающего иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, причем указанный гибридный полипептид представлен на клеточной поверхности;

в) селекцию по меньшей мере одной эукариотической клетки-хозяева на основании присутствия или количества гибридного полипептида, представленного на клеточной поверхности.

Термин «гетерологичная нуклеиновая кислота» относится к полинуклеотидной последовательности, введенной в клетку-хозяина с помощью, например, рекомбинантных методик, таких как трансфекция. Клетка-хозяин может содержать

или не содержать эндогенный полинуклеотид, соответствующий или идентичный гетерологичному полинуклеотиду. Однако в особенности термин «гетерологичная нуклеиновая кислота» относится к чужеродному полинуклеотиду, введенному в клетку-хозяина. Введение может быть осуществлено в результате, например, трансфекции подходящего вектора, который может встроиться в геном клетки-хозяина (стабильная трансфекция). В случае если гетерологичная нуклеиновая кислота не встраивается в геном, гетерологичная нуклеиновая кислота может быть потеряна на более поздней стадии, например, в процессе митоза (транзистентная трансфекция). Оба варианта являются подходящими, однако, стабильная трансфекция предпочтительна. Подходящие векторы могут также сохраняться в клетке-хозяине без встраивания в геном, например, в результате эписомальной репликации. Однако в соответствующей области ранее были также известны и другие способы внедрения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, которые тоже описаны более подробно ниже.

Термин «полинуклеотид» означает полимер из нуклеотидов, обычно связанных от одной дезоксирибозы или рибозы к другой, и относится к ДНК, равно как и к РНК, в зависимости от контекста. Термин «полинуклеотид» не подразумевает каких-либо размерных ограничений.

Термин «кассета» описывает группу полинуклеотидных элементов, функционально связанных друг с другом, включающую, например, полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид, полинуклеотид, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, полинуклеотид, кодирующий маркер, регуляторные элементы и/или другие описанные в контексте нуклеотиды. Термин «кассета», как он употребляется в контексте, включает по крайней мере два полинуклеотидных элемента. Кассета может включать или не включать регуляторные элементы в качестве полинуклеотидов, такие как, например, промотор, энхансер и/или сайт полиаденилирования. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, кассета является «экспрессионной кассетой», подходящей для экспрессии полипептида. Экспрессионная кассета включает по меньшей мере один иницирующий транскрипцию элемент, например, промотор, в качестве регуляторного элемента, функционально связанного с кодирующей областью, например, полинуклеотидом (Pn-POI), кодирующим представляющий интерес полипептид, который, соответственно, находится под транскрипционным контролем упомянутого иницирующего транскрипцию элемента. Экспрессионная кассета может также включать подходящие регуляторные элементы для терминации транскрипции, такие, как, например, сайт полиаденилирования.

Термин «кассета (Cas-POI)» включает по крайней мере первый полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид, по меньшей мере один терминирующий кодон, расположенный по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида и второй полинуклеотид, расположенный по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант. Предпочтительно, кассета (Cas-POI) является экспрессионной кассетой (Exp-POI).

Термин «экспрессионная кассета (Exp-POI)» означает экспрессионную кассету, подходящую для экспрессии представляющего интерес полипептида (POI). В качестве экспрессионной кассеты она содержит по меньшей мере один иницирующий транскрипцию элемент. Указанная экспрессионная кассета (Exp-POI) либо включает полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид частью своей кодирующей области, либо включает сайт, подходящий для встраивания

соответствующего полинуклеотида (Pn-POI), кодирующего представляющий интерес полипептид, - в зависимости от задействуемого варианта осуществления настоящего изобретения, каковые более подробно описаны ниже.

Общая концепция настоящего изобретения состоит в помещении терминирующего кодона между полинуклеотидом (Pn-POI), кодирующим представляющий интерес полипептид, и полинуклеотидом, кодирующим иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, позволяющий полипептиды прикрепляться к клеточной поверхности. Термины «иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен» и «иммуноглобулиновый трансмембранный домен» употребляются в контексте в качестве синонимов. Терминирующий кодон составляет сигнал терминации трансляции или является его частью и может представлять собой естественный терминирующий кодон полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, то есть, таким образом, терминирующий кодон, используемый в естественных условиях для терминации трансляции. Конструирование кассеты (Cas-POI) приводит при экспрессии к выработке двух различных полипептидов, когда первый и второй полинуклеотиды транскрибируются в транскрипт, каковой необязательно подвергается процессингу, а затем транслируется. Согласно одному из вариантов трансляции, трансляция транскрипта прерывается на (хотя бы одном) терминирующем кодоне, расположенном между полинуклеотидом (Pn-POI), кодирующим представляющий интерес полипептид, и полинуклеотидом, кодирующим иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант. Терминация трансляции на упомянутом терминирующем кодоне приводит к полипептидному продукту, не содержащему трансмембранный якорный домен. Согласно второму варианту трансляции, при трансляции прочитывается по меньшей мере один терминирующий кодон, что приводит к продукту трансляции, содержащему представляющий интерес полипептид и связанный с ним иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, способный прикреплять гибридный белок к клеточной мембране. Подобный гибридный белок переносится на поверхность клетки и закрепляется на ней входящим в его состав иммуноглобулиновым трансмембранным якорным доменом или его функциональным вариантом. Важной характеристикой настоящего изобретения является то, что при экспрессии кассеты (Cas-POI) терминация трансляции на упомянутом терминирующем кодоне внутри рамки считывания оказывается в некоторой степени «ненадежной», поскольку имеют место случаи трансляционного прочитывания, приводящие к описанному гибриднему белку. Поскольку подобное трансляционное прочитывание происходит в определенной доле случаев, на каковую могут также иметь влияние выбор и число терминирующих кодонов и соседствующих с терминирующим кодоном областей, в частности, следующего за терминирующим кодоном нуклеотида, равно как и условия культивирования, уровень связанного с поверхностью гибридного белка непосредственно коррелирует с уровнем экспрессии представляющего интерес полипептида. Количество присутствующего на клеточной поверхности гибридного белка оказывается, таким образом, в некоторой степени пропорциональным общему уровню экспрессии представляющего интерес полипептида соответствующей клеткой, поскольку существует тесная связь между поверхностной экспрессией гибридного полипептида и продуктивностью клетки-хозяина в отношении экспрессии представляющего интерес полипептида. Уровень связанного с поверхностью гибридного белка дает, таким образом, представление об общей продуктивности индивидуальной клетки и позволяет осуществить селекцию по меньшей мере одной эукариотической

клетки-хозяина на основе присутствия или количества гибридного белка, представленного на клеточной поверхности. Цикл селекции, включающий стадии а), б) и в), предоставляет возможность эффективных и воспроизводимых идентификации и выделения высокопродуктивных эукариотических клеток.

5 Подходящие способы обнаружения/селекции, такие как иммуноокрашивание, проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия, магнитно-активируемый клеточный сортинг (MACS), аффинные методы, такие как основанные на использовании магнитных гранул и схожих методиках, позволяют осуществлять идентификацию, селекцию и/или обогащение высокопродуктивных клеток на основе присутствия и
10 уровня связанного с поверхностью гибридного белка. Таким образом, настоящее изобретение приводит к существенному снижению трудозатрат на скрининг, позволяя осуществлять селекцию, а также обогащение по меньшей мере одной высокопродуктивной клетки или популяции высокопродуктивных клеток из популяции непродуктивных, малопродуктивных и/или среднепродуктивных клеток. Также
15 оказывается возможным осуществлять несколько циклов селекции и/или обогащения, предпочтительно, два или три. Например, может быть осуществлена селекция эукариотической клетки-хозяина с существенным или высоким уровнем экспрессии или популяции клеток-носителей с помощью соединения для детектирования, такого как, например, антитело или его фрагмент, распознающее связанный с мембраной гибридный
20 белок. Указанное соединение для детектирования может нести метку и, таким образом, быть обнаружимо с помощью общепринятых способов детектирования.

Согласно идея настоящего изобретения, для прикрепления представляющего интерес полипептида к поверхности клетки используется по меньшей мере один фрагмент
25 иммуноглобулинового трансмембранного якорного домена. В том случае, если используется лишь фрагмент вместо целого иммуноглобулинового трансмембранного якорного домена, соответствующий фрагмент должен позволять гибриднему полипептиду прикрепляться к поверхности клетки. Иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный фрагмент внедрен в
30 клеточную мембрану и, таким образом, жестко прикреплен к ней. Жесткое прикрепление отличает якоря по настоящему изобретению от, например, гликофосфатидитинозольного якоря. Иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен, используемый согласно настоящему изобретению, обеспечивает очень крепкое и, вследствие этого, устойчивое прикрепление гибридного полипептида к
35 клеточной поверхности, которое к тому же не подвержено или хотя бы менее подвержено протеолитическому выделению в среду. Это подтверждается проведенным после очистки анализом продуктов. При проведении масс-спектрального анализа не было обнаружено никаких фрагментов тяжелых цепей, содержащих иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен (или фрагмент иммуноглобулинового трансмембранного якорного домена). Это является важным преимуществом по
40 сравнению с предшествующими подходами в соответствующей области, поскольку при этом также снижается риск загрязнения рассматриваемого секретируемого растворимого полипептида выделяющимися в среду гибридными полипептидами. Более того, согласно проанализированным характеристикам рассматриваемых экспрессируемых полипептидов, также не было отмечено существенных отличий от
45 вещества из стандартных клонов/экспрессионных систем.

Клетки, получаемые способом по настоящему изобретению, характеризуются более высоким средним уровнем экспрессии по сравнению с клетками, клонированными с помощью метода предельных разведений или сходных способов. Они также

характеризуются более высокими средними уровнями экспрессии по сравнению с клетками, клонированными, например, с помощью проточной цитометрии после трансфекции стандартного вектора, не содержащего специфический трансмембранный домен/якорь согласно настоящему изобретению.

5 Клетки, выявленные в результате процедуры скрининга/селекции по настоящему изобретению, как правило, выделяют, и они могут быть обогащены относительно
клеток до селекции из исходной клеточной популяции. Они могут быть выделены и
культивированы как индивидуальные клетки. Они также могут быть задействованы в
одном или нескольких дополнительных циклах селекции для, необязательно,
10 дополнительного качественного или количественного анализа, или могут быть
использованы, например, в разработке линии клеток для выработки белка. Согласно
одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, обогащенная популяция
высокопродуктивных клеток, полученная в результате селекции, как это описано выше,
непосредственно используется в качестве популяции для выработки представляющего
15 интерес полипептида с высоким выходом.

Преимуществом является то, что наблюдаемые характеристики роста и
продуктивности клонов, коэкспрессирующих трансмембранный вариант
представляющего интерес полипептида, в частности, антитела, и клонов, производных
от классического векторного подхода, не коэкспрессирующих трансмембранный
20 вариант представляющего интерес полипептида, оказываются одинаковы. Более того,
также и стабильность клоновой выработки оказывается в равной степени хорошей.

Объектом настоящего изобретения также является способ выработки
представляющего интерес полипептида с высоким выходом, каковой способ включает:

а) получение набора эукариотических клеток-носителей, содержащих гетерологичную
25 нуклеиновую кислоту, содержащую хотя бы одну кассету (Cas-POI), содержащую хотя
бы первый полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид,
по меньшей мере один терминирующий кодон, расположенный по направлению
экспрессии относительно первого полинуклеотида, а также второй полинуклеотид,
расположенный по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона,
30 кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его
функциональный вариант;

б) культивирование эукариотических клеток-носителей с целью экспрессии
представляющего интерес полипептида таким образом, чтобы хотя бы часть
рассматриваемого полипептида экспрессировалась в виде гибридного полипептида,
35 включающего иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его
функциональный вариант, причем указанный гибридный полипептид представлен на
клеточной поверхности;

в) селекцию по меньшей мере одной эукариотической клетки-хозяина на основании
присутствия или количества гибридного полипептида, представленного на клеточной
40 поверхности;

г) культивирование полученной в результате селекции эукариотической клетки-
хозяина в культуральной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию
представляющего интерес полипептида.

Экспрессируемый представляющий интерес полипептид может быть получен
45 посредством разрушения клеток-носителей. Полипептиды могут также
экспрессироваться, например, секретироваться в культуральную среду и могут быть
получены из нее. Также возможны комбинации соответствующих способов. Подобным
образом полипептиды могут быть эффективно выработаны и получены/выделены с

высоким выходом. Полученные полипептиды могут также быть подвергнуты дальнейшим манипуляциям, таким как, например, стадии очистки и/или модификации, с целью получения представляющего интерес полипептида с требуемым качеством. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, упомянутые

5 клетки-хозяева культивируют в бессывороточных условиях. Как было вкратце оговорено выше, посредством встраивания хотя бы одного терминирующего кодона между полинуклеотидом (Pn-POI), кодирующим представляющий интерес полипептид, и

10 вторым полинуклеотидом, кодирующим иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный фрагмент, возможна селекция клеток-носителей с высоким уровнем экспрессии, обеспечивая таким образом выработку представляющего интерес полипептида с высоким выходом. Стадия селекции/обогащения по настоящему изобретению является, таким образом, неотъемлемым и важным компонентом процесса выработки в целом.

Применение иммуноглобулинового трансмембранного якорного домена или его

15 функционального фрагмента согласно идеям настоящего изобретения имеет особые преимущества при выработке иммуноглобулиновых молекул, поскольку упомянутый иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен естественным образом подходит для закрепления иммуноглобулиновых молекул на поверхности клетки. Как

20 было неожиданно обнаружено, иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен может быть использован при экспрессии иммуноглобулиновых молекул в клетках-хозяина млекопитающих, таких как клетки яичников китайского хомячка (СНО). Это неожиданно по той причине, что в предшествующих работах в соответствующей области принималось, что в упомянутых клетках необходима коэкспрессия рецепторных цепей

25 иммуноглобулина-альфа и иммуноглобулина-бета для обеспечения экспрессии прикрепленных к поверхности и, соответственно, к клеточной мембране, антител в случае применения иммуноглобулинового трансмембранного домена в качестве якоря. Данные корцепторы естественным образом экспрессируются, например, в В-клетках и производных В-клеток, таких как гибридомные или миеломные клетки (например,

30 клетки мышинной миеломы SP2/0), но их экспрессия не ожидалась в случае клеток, не относящихся к В-клеткам, таких как клетки СНО. Было, однако, обнаружено, что, несмотря на отсутствие экспрессии корцепторов, поверхностный дисплей представляющего интерес полипептида и, в частности, иммуноглобулиновых молекул хорошо протекает в клетках, не являющихся производными В-клеток, таких как клетки СНО, при использовании иммуноглобулинового трансмембранного якорного домена.

35 Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, используется эукариотическая клетка-хозяина, которая не является В-клеткой или производной от В-клетки. Соответственно, используется эукариотическая клетка-хозяина, предпочтительно, от млекопитающего, которая не экспрессирует в естественных условиях рецепторные цепи иммуноглобулина-альфа и иммуноглобулина-бета. Таким

40 образом, клетка-хозяина предпочтительно является клеткой СНО. Более того, согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, в указанной эукариотической клетке не происходит искусственной коэкспрессии рецепторных цепей иммуноглобулина-альфа и иммуноглобулина-бета.

Всякий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его

45 функциональный фрагмент может быть использован согласно идеям настоящего изобретения. В частности, иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен выбран из группы, включающей иммуноглобулиновые трансмембранные якорные домены, производные от иммуноглобулинов IgM, IgA, IgE, IgG и/или IgD или их

функциональных вариантов. Предпочтительно, иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен является производным от IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4. Особенно подходящим является иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен IgG1 или его функциональный вариант. Предпочтительные примеры производных от IgG трансмембранных якорей представлены в SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:7.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен включает цитоплазматический домен. Применение иммуноглобулинового трансмембранного якорного домена, включающего цитоплазматический домен, является предпочтительным, поскольку оно обеспечивает очень прочную связь между гибридным белком и клеточной поверхностью. В особенности подходящим является применение иммуноглобулинового цитоплазматического домена. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, иммуноглобулиновый цитоплазматический домен является производным от IgG, IgA и IgE или функциональных вариантов вышеперечисленного. Данные иммуноглобулиновые цитоплазматические домены крупнее, чем производные от IgD и IgM. В SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6 представлены подходящие аминокислотные последовательности производных от IgG цитоплазматических доменов, которые могут быть задействованы в качестве цитоплазматического домена. Предпочтительный пример производного от IgG трансмембранного якоря, который включает производный от IgG цитоплазматический домен, представлен в SEQ ID NO:3.

Таким образом, иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен может включать полипептидную последовательность, как она представлена в SEQ ID NO:2 и/или SEQ ID NO:3 или ее функциональные варианты, в частности, ее функциональные фрагменты, которые обеспечивают прикрепление гибридного полипептида к поверхности клетки-хозяина.

Нуклеотидная последовательность секции подходящей кассеты (Cas-POI) представлена как SEQ ID NO:1. Представленные подробности включают терминирующий кодон внутри рамки считывания, подходящий для трансляционного прочтения и полинуклеотид, кодирующий особенно подходящий иммуноглобулиновый (Ig) трансмембранный домен, который может быть задействован согласно идеям настоящего изобретения. Терминирующий кодон находится внутри рамки считывания по направлению экспрессии относительно полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид и, таким образом, от полинуклеотидной последовательности, подвергаемой транскрипции и процессингу с образованием аминокислотной последовательности. Понятие кодирующей последовательности относится к последовательности, транслируемой в аминокислоты. Таким образом, терминирующий кодон не принадлежит к кодирующей последовательности и, соответственно, к полинуклеотиду, кодирующему представляющий интерес полипептид. Терминирующий кодон может быть естественным терминирующим кодоном полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид. В этом случае присутствие дополнительного терминирующего кодона (кодонов) не требуется, но может иметь место (см. выше).

Второй полинуклеотид кассеты (Cas-POI) может кодировать иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, который включает полипептидную последовательность, представленную как SEQ ID NO:2. SEQ ID NO:3 представляет другой вариант подходящего иммуноглобулинового трансмембранного домена, также включающего цитоплазматический домен (цитоплазматический домен сам по себе также представлен как SEQ ID NO:4), предполагаемые аминокислоты,

соответствующие прочитываемому терминирующему кодону и дополнительный кодон (WL) и связующую область (связующая область представлена также как SEQ ID NO:5). Также в положении, соответствующем хотя бы одному терминирующему кодону и соседнему кодону могут присутствовать другие аминокислоты в зависимости от
5 выбранного терминирующего кодона и/или числа терминирующих кодонов, а также задействованного соседнего кодона (кодонов). Поскольку указанные аминокислоты присутствуют лишь в гибридном полипептиде, они не нарушают аминокислотной последовательности представляющего интерес полипептида. В соответствии с этим, в качестве трансмембранного якоря и, как следствие, в описанных способах, равно как
10 и в описанных векторах и клетках-хозяина, могут быть задействованы, согласно идеям настоящего изобретения, иммуноглобулиновый трансмембранный домен, включающий полипептидную последовательность, как она представлена в SEQ ID NO:2 или 3, или его функциональный вариант, в частности, его функциональный фрагмент.

«Функциональный вариант» иммуноглобулинового трансмембранного якорного
15 домена согласно настоящему изобретению включает иммуноглобулиновые трансмембранные якорные домены, содержащие один или несколько отклонений в аминокислотной последовательности (например, пропусков, замен или вставок) по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего естественных иммуноглобулинового трансмембранного домена и функциональных фрагментов выше
20 перечисленного, которые обеспечивают трансмембранное связывание гибридного белка с поверхностью клетки.

В качестве сигнала терминации трансляции и, таким образом, терминирующего кодона может быть задействован любой из трех терминирующих кодонов, опосредующих сигнал терминации синтеза белка (TAA (УАА), TAG (УАГ) и TGA (УГА)
25 - также в различных тетрануклеотидных контекстах, см. ниже), располагающийся между полинуклеотидом (Pn-POI), кодирующим представляющий интерес полипептид, и полинуклеотидом, кодирующим иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, в зависимости от искомого уровня супрессии (прочитывания). Как было вкратце указано выше, терминирующий кодон может также
30 являться естественным терминирующим кодоном полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид. Предпочтительно, указанный сигнал терминации трансляции характеризуется неполной эффективностью терминации, чтобы способствовать трансляционному прочитыванию. На «ненадежность» терминирующего кодона также оказывает влияние кодон (кодоны), расположенный по соседству и, таким
35 образом, по направлению экспрессии относительно хотя бы одного терминирующего кодона; в частности, на транскрипционное прочитывание может оказывать влияние первый нуклеотид (см. ниже).

Кассету (Cas-POI) необходимо транслировать, чтобы обеспечить экспрессию представляющего интерес полипептида. Согласно одному из вариантов осуществления
40 настоящего изобретения кассета (Cas-POI) является, таким образом, экспрессионной кассетой. Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, кассета (Cas-POI) встроена в геном клетки-хозяина таким образом, что кассета (Cas-POI) находится под транскрипционным контролем инициирующего транскрипцию элемента клетки-хозяина, такого как промотор.

45 Транскрипцию нуклеиновой кислоты, содержащейся в кассете (Cas-POI), приводит к транскрипту, включающему, по крайней мере,

- первый полинуклеотид, причем трансляция указанного первого полинуклеотида приводит к представляющему интерес полипептиду;

- по меньшей мере один терминирующий кодон, расположенный по направлению экспрессии относительно упомянутого первого полинуклеотида;
- второй полинуклеотид, расположенный по направлению экспрессии относительно упомянутого терминирующего кодона, причем трансляция указанного второго полинуклеотида приводит к иммуноглобулиновому трансмембранному якорному домену или его функциональному варианту.

По крайней мере часть транскрипта транслируется в гибридный полипептид, включающий представляющий интерес полипептид и иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, в результате трансляционного прочитывания хотя бы одного терминирующего кодона.

Трансляционное прочитывание может происходить естественным образом вследствие выбора терминирующего кодона/конструкции сигнала терминации трансляции, или же может быть стимулировано подбором условий культивирования, например, посредством применения вещества, подавляющего терминацию (см. ниже).

Кассета (Cas-POI), применяемая в способе по настоящему изобретению, может включать лишь один терминирующий кодон, расположенный против направления экспрессии относительно последовательности, кодирующей иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его фрагмент. Также, однако, возможно использование набора из двух или более терминирующих кодонов, например, двух, или трех, или четырех терминирующих кодонов, которые могут быть одинаковыми или различными. На уровне прочитывания также влияет контекст, в котором находится терминирующий кодон, т.е. трехнуклеотидный терминирующий кодон сам по себе, равно как и нуклеотид (нуклеотиды), расположенные непосредственно по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона. Следует, однако, убедиться в том, что некоторый уровень трансляционного прочитывания все еще имеет место, чтобы обеспечить выработку гибридного полипептида, который может быть получен согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения посредством подбора условий культивирования.

Первичный транскрипт может являться предшественником матричной РНК (пре-мРНК), содержащим интроны. Соответствующая пре-мРНК будет подвергнута процессингу (сплайсированию), приводящему к мРНК. Альтернативно, транскрипция может привести непосредственно к мРНК. В процессе трансляции транскрипта мРНК обычно имеет место прочитывание терминирующего кодона (кодонов) на естественном фоновом уровне, или же соответствующий уровень прочитывания может быть стимулирован посредством подбора условий культивирования. Такой уровень прочитывания обуславливает определенную пропорцию гибридных полипептидов, которая также зависит от числа и природы задействованных терминирующих кодонов (кодона), терминирующего кодона по направлению экспрессии и, в особенности, тетрануклеотидного контекста терминирующего кодона (кодонов) и условий культивирования. Соответственно, согласно идеям настоящего изобретения, несмотря на присутствие терминирующего кодона, вырабатывается определенная доля гибридного полипептида. Эти гибридные полипептиды включают иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, прочно связывающий гибридный полипептид с поверхностью клетки. Как следствие, гибридные полипептиды оказываются представлены на поверхности клеток-носителей, что позволяет осуществить селекцию клеток, демонстрирующих высокие уровни связанных с мембраной рекомбинантных гибридных полипептидов (указывающих на высокий уровень секретируемого полипептида) посредством, например, проточной цитометрии,

в частности, посредством флуоресцентно-активируемого клеточного сортирования (FACS) при введении во взаимодействие с соответствующим образом меченым соединением для детектирования.

5 Подходящие сигналы терминации трансляции и, таким образом, терминирующие кодоны и окружение терминирующих кодонов с неполной эффективностью терминации трансляции могут быть сконструированы так, как это описано в предшествующих работах в соответствующей области (см., например Li и др. 1993, Journal of Virology 67 (8), 5062-5067; McCughan и др. 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 5431-5435; Brown и др., 1990, Nucleic Acids Research 18 (21) 6339-6345, каковые документы включены в настоящее
10 описание в качестве ссылки во всей своей полноте).

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения используется нижеследующее окружение терминирующего кодона (терминирующий кодон указан жирным шрифтом и подчеркнут):

15 **ТТАЦТА** нуклеотидная последовательность окружения терминирующего кодона на кодирующей цепи и, таким образом, на уровне ДНК; терминирующий кодон указан жирным шрифтом и подчеркнут
УТАЦУА Нуклеотидная последовательность окружения терминирующего кодона на уровне РНК
Предположительные аминокислоты, соответствующие терминирующему кодону и соседнему кодону, если происходит
W L трансляционное прочитывание; представлен, таким образом, наиболее вероятный продукт прочитывания указанного полинуклеотида.

20 Дополнительные аминокислоты, встроенные в гибридный полипептид вследствие прочитывания терминирующего кодона могут быть любого вида, коль скоро гибридный белок представлен на поверхности клетки. Указанные дополнительные аминокислоты встроены только в гибридный белок, тогда как аминокислоты представляющего интерес полипептида остаются неизменными.

25 Помимо возможного применения многих терминирующих кодонов, следующих за полинуклеотидом (Pn-POI), кодирующим представляющий интерес полипептид, возникают, как правило, преимущества при использовании нескольких терминирующих кодонов по направлению экспрессии по отношению к последовательности, кодирующей иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный
30 фрагмент. Применение нескольких терминирующих кодонов в данном положении, например, до десяти терминирующих кодонов, как, например, до, примерно, шести или восьми терминирующих кодонов, как-то, примерно, двух, трех, четырех или пяти терминирующих кодонов, надежно обеспечит эффективную терминацию трансляции.

35 Количество присутствующего и, таким образом, детектируемого на клеточной поверхности гибридного полипептида обычно возрастает во время синтеза полипептида, поскольку гибридный полипептид остается прикреплен к клеточной мембране и, таким образом, накапливается на клеточной поверхности по мере продолжения экспрессии. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, кассета (Cas-POI) конструируется таким образом, чтобы прочитывание терминирующего кодона приводил к примерно $\leq 50\%$, $\leq 25\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2,5\%$, $\leq 1,5\%$, $\leq 1\%$ или менее
40 $0,5\%$ гибридного полипептида. Остающаяся часть вырабатывается в виде полипептидной формы, не включающей иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный фрагмент. Как было описано, на уровень прочитывания терминирующего кодона может оказывать влияние выбор и число терминирующих кодонов (кодона) и соседние с терминирующим кодоном области, в частности,
45 нуклеотид, следующий за терминирующим кодоном, равно как и условия культивирования, применяемые на стадии б). В зависимости от таких факторов, как естественный фоновый уровень прочитывания для данного терминирующего кодона в данном конструкте, в некоторых случаях может оказаться желательным использовать

более одного терминирующего кодона между полинуклеотидом (Pn-POI), кодирующим представляющий интерес полипептид, и полинуклеотидом, кодирующим иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен, чтобы дополнительно снизить фоновые уровни прочитывания (см. выше). Общее преимущество сравнительно низкого уровня прочитывания состоит в более высокой точности последующей процедуры селекции/обогащения и сортировки, которую предпочтительно осуществляют посредством FACS, что обеспечивает лучшее разрешение между высокопродуктивными и сверхпродуктивными клонами. Если уровни прочитывания слишком высоки, может произойти насыщение емкости клеточной поверхности в отношении связанных с мембраной полипептидов, что может помешать различению уровней экспрессии, в частности, высоких уровней экспрессии. Таким образом, сравнительно низкий уровень прочитывания имеет преимущества с точки зрения селекции сверхэкспрессирующих клонов. Соответственно, предпочтительно лишь $\leq 5\%$, $\leq 2\%$ или даже $\leq 1,5\%$ транскрипта транслируется в гибридный полипептид.

Однако также возможно повысить уровень прочитывания, если то необходимо/желательно, посредством, например, применения подавляющего терминацию вещества во время культивирования. Применение подавляющего терминацию вещества в культуральной среде на стадии б) является одним из путей влияния на уровень прочитывания терминирующего кодона через средство условий культивирования. Вещество, подавляющее терминацию, является химическим веществом, способным подавлять терминацию трансляции, обусловленную присутствием терминирующего кодона. В частности, вещество, подавляющее терминацию может представлять собой антибиотик, принадлежащий к аминогликозидной группе. Аминогликозидные антибиотики известны своей способностью допускать встраивание альтернативных аминокислот в положения, отвечающие терминирующему кодону, приводя, таким образом, к «прочитыванию» терминирующего кодона или окружения терминирующего кодона, которое в ином случае, как правило, приведет к терминации трансляции. Аминогликозидные антибиотики включают G-418, гентамицин, паромомицин, гигромицин, амикацин, канамицин, неомицин, нетилмицин, стрептомицин и тобрамицин. Однако, поскольку преимущества имеет низкий уровень прочитывания, селекцию предпочтительно осуществляют в отсутствие вещества, подавляющего терминацию.

Настоящее изобретение применимо к любому типу клетки-хозяина, в которой прочитывание терминирующего трансляцию кодона протекает хотя бы в малой степени или может быть вызвано добавлением подавляющего терминацию вещества. Примерами подходящих эукариотических клеток-носителей являются клетки-хозяева млекопитающих, включающие, например, клеточные линии яичников китайского хомячка (CHO), клеточные линии зеленой мартышки (COS), мышечные клетки (например, NS/0), клеточные линии почек детенышей хомяка (ВНК) и человеческие клетки и клеточные линии. Предпочтительно, клетка-хозяина относится к клеточной линии CHO.

Тогда как одного цикла селекции достаточно для выявления клеток-носителей с хорошей продуктивностью, согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения осуществляют два или более цикла селекции, где на каждом цикле селекции выбирают хотя бы одну эукариотическую клетку-хозяина на основе присутствия или количества гибридного полипептида, представленного на клеточной поверхности. Экспериментальные результаты показывают, что второй цикл селекции обычно приводит к улучшенным результатам.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, стадия

селекции в) включает взаимодействие набора клеток-носителей с соединением для детектирования, связывающимся с гибридным полипептидом, и селекцию по меньшей мере одной клетки-хозяина на основе присутствия или количества детектируемого соединения, связанного с клеточной поверхностью.

5 Соединение для детектирования, используемое для связывания с гибридным полипептидом, может иметь хотя бы одну из следующих характеристик:

- указанное соединение является меченым;
- указанное соединение является флуоресцентно меченым;
- указанное соединение является антигеном;

10 - указанное соединение является молекулой иммуноглобулина или ее связывающимся фрагментом;

- указанное соединение является А-, G- и/или L-белком.

Детектирующее соединение, задействуемое для связывания с гибридным полипептидом на поверхности клетки, может, например, представлять собой молекулу
15 иммуноглобулина или ее фрагмент, такой как антитело или фрагмент антитела, распознающее гибридный полипептид. В основном, могут быть детектированы все доступные части гибридного полипептида; соответственно, может быть обнаружена также часть, соответствующая представляющему интерес полипептиду, секретируемому параллельно с гибридным полипептидом в растворимой форме.

20 Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, соединение для детектирования является антигеном. Данный вариант осуществления применим, если экспрессируемый представляющий интерес полипептид представляет собой, например, молекулу иммуноглобулина или ее фрагмент, такой как антитело, связывающиеся с соответствующим антигеном.

25 С целью обеспечения детектирования и селекции, упомянутое соединении для детектирования, применяемое для связывания с гибридным полипептидом, может быть меченым. Меченое соединение для детектирования, связывающееся с гибридным полипептидом, представленным на поверхности клетки, таким образом метит, в частности, окрашивает, клеточную поверхность. Чем выше количество гибридного
30 полипептида, экспрессируемого клеткой-хозяином, тем больше меченого соединения для детектирования связывается. Это имеет то преимущество, что селекция клеток-носителей может быть легко осуществлена, поскольку, благодаря наличию меток, может быть определено не только присутствие, но и количество связанного соединения для детектирования. Для выбора высокопродуктивных клеток-носителей эти клетки-
35 хозяева выбирают из такой популяции клеток-носителей, которая наиболее эффективно, т.е. интенсивно может быть помечена соединением для детектирования.

Предпочтительной является флуоресцентная метка, поскольку она обеспечивает легкое обнаружение с помощью флуоресцентных методов детектирования, таких как, например, проточная цитометрия. Подходящие флуоресцентные метки известны специалисту в
40 соответствующей области.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, для отбора по меньшей мере одной эукариотической клетки-хозяина на основе степени связывания соединения для детектирования с клеточной поверхностью могут быть осуществлены один или несколько циклов селекции, предпочтительно, два или три. Согласно данному
45 варианту осуществления настоящего изобретения, в каждом цикле селекции отбирают хотя бы одну эукариотическую клетку-хозяина на основании количества связанного соединения для детектирования. Таким образом, те клетки-хозяева, которые были наиболее эффективно/интенсивно мечены, отбирают на основе степени, т.е. количества,

окрашивания клеточной поверхности. Например, могут быть отобраны 5% или 2% наиболее интенсивно окрашенных клеток-носителей.

В том случае, если предполагается совместная селекция нескольких эукариотических клеток-носителей в виде пула (так называемое обогащение в пуле), отбирают и включают в клеточный пул несколько клеток, например, хотя бы 10, хотя бы 50, хотя бы 500, хотя бы 1000 или хотя бы 50.000. Данный вариант осуществления настоящего изобретения имеет особенное преимущество с точки зрения быстрого получения больших количеств представляющего интерес полипептида, поскольку клеточный пул, содержащий несколько высокопродуктивных клеток-носителей, отобранных согласно идеям настоящего изобретения, может разрастись быстрее, чем, например, клеточный клон.

Таким образом, помимо применения к селективному клеточному клонированию, настоящее изобретение может также быть применено для обогащения высокопродуктивных клеток в пуле, причем могут быть получены титры, сопоставимые с кленовыми клеточными линиями.

Высокопродуктивные клетки-хозяева могут быть выделены, и/или популяция высокопродуктивных клеток может быть обогащена на основе степени связывания соединения для детектирования с клеточной поверхностью, в частности, с гибридным полипептидом. Связывание соединения для детектирования с гибридным полипептидом на поверхности может быть обнаружено с помощью проточной цитометрии, предпочтительно, флуоресцентно-активируемого клеточного сортирования (FACS).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения клетки-хозяева, содержащие большое количество гибридных полипептидов, что, соответственно, обуславливает большой сигнал, сортируют с помощью флуоресцентно-активируемого клеточного сортирования (FACS). В контексте настоящего изобретения сортирование FACS имеет особые преимущества, поскольку позволяет осуществлять быстрый скрининг больших количеств клеток-носителей с целью выявления и обогащения тех клеток, которые экспрессируют представляющий интерес полипептид с высоким выходом. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, примерно лишь 5% полипептида или менее вырабатывается в виде гибридного полипептида, более сильная флуоресценция, обнаруживаемая на поверхности клетки, должна соответствовать более высокому уровню экспрессии также и представляющего интерес полипептида, который может быть, например, секретирован в культуральную среду. Такие клетки, демонстрирующие наиболее высокий уровень флуоресценции, могут быть выявлены и выделены с помощью FACS. Обнаружена и подтверждена примерами положительная и статистически значимая корреляция между флуоресценцией, определяемой с помощью FACS, и количеством выработанного полипептида. Таким образом, сортирование FACS может использоваться не только для качественного анализа с целью идентификации экспрессирующих представляющий интерес полипептид клеток в целом, но может в действительности применяться и количественно с целью выявления тех клеток-носителей, которые экспрессируют высокие уровни представляющего интерес полипептида. Таким образом, высокопродуктивные клетки-хозяева могут быть подвергнуты селекции/обогащению на основе степени связывания меченого соединения для детектирования с гибридным полипептидом, закрепленным на поверхности клетки. Подобным образом может быть осуществлена селекция/обогащение наиболее продуктивных клеток. Экспериментальные результаты демонстрируют, что применение процедуры селекции согласно настоящему изобретению в сочетании с анализом с применением FACS приводит к существенному снижению количества непродуктивных клонов в отобранных клеточных популяциях. Более того, существенно повышенная

средняя продуктивность клонов позволяет достичь существенного снижения трудозатрат на скрининг клонов, например, в процессе разработки клеточной линии для биофармацевтического производства. Таким образом, могут быть разработаны клеточные линии для существенно большего числа кандидатов или проектов с меньшими затратами ресурсов по сравнению с классическими скрининговыми подходами. Кроме того, данный способ позволяет оценивать потенциал продуктивности и распределение клонов в трансфицированных и подвергнутых селекции пулах с помощью поверхностного окрашивания и анализа с применением FACS вместо требующих длительного времени анализов продуктивности. Поверхностное окрашивание может также быть использовано для анализа стабильности выработки клонов с точки зрения гомогенности клеточной популяции. Возникающие непродуцирующие или низкопроизводительные субпопуляции будут легко обнаружимы.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, кассета (Cas-POI) и/или (Cas-POI') дополнительно включает:

- 15 - полинуклеотид (Pn-TAG), кодирующий аффинную метку, расположенный по направлению экспрессии относительно хотя бы одного терминирующего кодона, расположенного по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида, где указанный полинуклеотид (Pn-TAG) расположен против направления экспрессии относительно второго полинуклеотида кодирующего иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, и/или
- 20 - полинуклеотид (Pn-MARKER), кодирующий селективируемый маркер.

Введения полинуклеотида (Pn-TAG), как он определен выше, между терминирующим кодоном и полинуклеотидом, кодирующим иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен, имеет то преимущество, что аффинная метка встраивается в гибридный белок. Поскольку аффинная метка расположена по направлению экспрессии относительно хотя бы одного терминирующего кодона, она оказывается включена лишь в гибридный вариант представляющего интерес полипептида. Термин «аффинная метка» относится к короткой аминокислотной последовательности, которая может быть обнаружена/связана с помощью связывающихся соединений/агентов, таких как антитела. В основном, аффинная метка служит в качестве мишени для агентов захвата и/или соединений для детектирования. Поскольку она расположена между представляющим интерес полипептидом и иммуноглобулиновым трансмембранным якорным доменом или его функциональным вариантом, она также представлена на клеточной поверхности и, соответственно, доступна, например, для соединений для детектирования. Аффинная метка может, таким образом, также выступать в качестве мишени для соединения для детектирования, чтобы позволить осуществить селекцию подходящих эукариотических клеток-носителей. Применение, например, хорошо охарактеризованной аффинной метки в качестве мишени для детектирования/селекции имеет то преимущество, что для детектирования могут быть задействованы существующие и хорошо охарактеризованные соединения для детектирования. Более того, то же самое соединение для детектирования может быть применено для других видов представляющего интерес полипептида, которые должны быть экспрессированы. Согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения, генерация соединений для детектирования, специфичных в отношении различного представляющего интерес полипептида, не будет иметь употребления, поскольку будет использоваться одно и то же соединение для детектирования, специфичное в отношении аффинной метки. Поскольку аффинная метка составляет неотъемлемую часть гибридного полипептида, она также крепко связана с поверхностью эукариотической клетки-хозяина

вследствие присутствия трансмембранного якорного домена. Крепко связанные гибридные полипептиды не должны быть подвержены высвобождению в среду (см. выше).

5 Высвобождение в среду связанного с мембраной гибридного полипептида может представлять собой, в зависимости от предполагаемого применения секретлируемого полипептида, проблему загрязнения, даже если высвобождение в среду является редким событием при применении иммуноглобулинового трансмембранного якорного домена. Например, при экспрессии терапевтических полипептидов/белков желателно получать секретлируемый продукт в столь возможно чистом виде. При применении аффинной
10 метки, такой как, например, полигистидиновая метка, такая аффинная метка будет хотя бы частично содержаться в высвобожденном в среду белке. Благодаря присутствию аффинной метки будет возможно удалять высвобожденные в среду гибридные полипептиды (если таковые будут наличествовать) из образца секретлируемых полипептидов посредством стандартных способов аффинной очистки (например, с
15 использованием Ni - NTA (нитрилотриуксусной кислоты) в случае полигистидиновой метки). Аффинная метка является, таким образом, полезной для легкого удаления из образца потенциальных загрязнений.

Помимо этого аффинная метка может быть использована с целью контроля чистоты экспрессируемого/получаемого полипептида. Для тех применений, в которых
20 необходимы высокочистые белки/полипептиды, может также быть предпочтительно/необходимо обеспечить подходящие анализы для демонстрации чистоты получаемого продукта и, соответственно, отсутствия в нем загрязнений от высвобожденных в среду гибридных полипептидов. Подобный анализ может основываться на детектировании аффинной метки. Поскольку аффинная метка присутствует только в гибридном
25 полипептиде, она может служить специфичным маркером присутствия в образце гибридных полипептидов (или их деградированных/высвобожденных в среду вариантов). Если аффинная метка все еще может быть обнаружена в полученном продукте при использовании соединения для детектирования, специфичного в отношении аффинной метки, это означает, что в образце все еще присутствуют следы высвобожденного в
30 среду гибридного полипептида, и что образец может потребовать, в зависимости от количества, дальнейшей очистки. Если в образце не обнаруживается аффинной метки, то в анализируемом образце высвобожденный в среду гибридный полипептид присутствовать не должен или, соответственно, он присутствует в очень низких количествах, что удостоверяет достаточную чистоту образца для предполагаемого
35 применения.

Соответственно, при выработке представляющего интерес полипептида, получаемый представляющий интерес полипептид может быть дополнительно подвергнут следующим манипуляциям:

- 40 - удалению загрязнений высвободившегося в среду гибридного полипептида с помощью аффинных методов очистки, мишенью которых служит аффинная метка и/или
- обнаружению присутствия или отсутствия высвободившегося в среду гибридного белка посредством поиска аффинной метки.

Подходящими примерами аффинных меток являются, например, V5,
45 полигистидиновая метка, FLAG, Strep, HA, с-Мус или им подобные. Подходящие аффинные метки могут также быть созданы искусственно.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, кассета (Cas-POI) и/или (Cas-POI') включает дополнительный полинуклеотид (Pn-MARKER),

кодирующий селективируемый маркер. Предпочтительно, такой селективируемый маркер расположен вниз полинуклеотида, кодирующего иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен, и, таким образом, находится в результате экспрессии конструктора на цитоплазматическом сайте клеточной мембраны, когда на ней
5 представлен гибридный белок. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, между полинуклеотидом, кодирующим иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант и полинуклеотидом (Pn-MARKER) отсутствует терминирующий кодон, поскольку предполагается их экспрессия в виде гибридного полипептида. Подходящие терминирующие кодоны и
10 сигналы терминации транскрипции должны присутствовать по направлению экспрессии относительно кодирующей последовательности полинуклеотида (Pn-MARKER), чтобы обеспечить эффективную терминацию транскрипции и трансляции после экспрессии полинуклеотида (Pn-MARKER). Указанный полинуклеотид (Pn-MARKER) может, например, являться геном резистентности к лекарству или репортерным геном.
15 Подходящие примеры описаны в контексте. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, в качестве белка-репортера используют зеленый флуоресцентный белок (GFP) или люциферазу. Это позволяет осуществлять селекцию эукариотических клеток-носителей на основе двух характеристик гибридного белка.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, кассета
20 (Cas-POI) и/или (Cas-POI') является экспрессионной кассетой. Специалисты в соответствующей области должны быть способны выбрать подходящие векторы, контрольные последовательности экспрессии и носители для осуществления способов по настоящему изобретению. Например, при выборе вектора следует учитывать носитель, поскольку может потребоваться репликация вектора внутри него и/или
25 возможность его встраивания в хромосому. Подходящие векторы, которые могут применяться в способах селекции и выработки согласно настоящему изобретению также описаны ниже и в примерах.

Также объектом настоящего изобретения является нуклеиновая кислота-вектор, подходящая для экспрессии хотя бы одного представляющего интерес полипептида в
30 эукариотической клетке-хозяина, предпочтительно, клетке млекопитающего, включающая хотя бы одну кассету (Cas-POI), включающую сайт встраивания для первого полинуклеотида (Pn-POI), кодирующего представляющий интерес полипептид, и/или первый полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид, хотя бы одного терминирующего кодона по направлению экспрессии
35 относительно первого полинуклеотида и второго полинуклеотида по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона, кодирующего иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант.

«Нуклеиновая кислота-вектор» согласно настоящему изобретению является полинуклеотидом, способным нести по меньшей мере один чужеродный нуклеиново-
40 кислотный фрагмент. Векторная нуклеиновая кислота действует как «молекулярный носитель», доставляя фрагменты нуклеиновых кислот в клетку-хозяина. Она может включать хотя бы одну экспрессионную кассету, включающую регуляторные последовательности. Предпочтительно, нуклеиновая кислота-вектор включает хотя бы одну экспрессионную кассету. Чужеродные нуклеотиды могут быть встроены в
45 экспрессионную кассету (кассеты) нуклеиновой кислоты-вектора, чтобы они могли быть экспрессированы оттуда. Нуклеиновая кислота-вектор согласно настоящему изобретению может присутствовать в кольцевой или линейной форме. Термин «нуклеиновая кислота-вектор» также включает искусственные хромосомы или сходные

соответствующие полинуклеотиды, обеспечивающие перенос фрагментов чужеродных нуклеиновых кислот.

Соответствующий вектор может быть задействован в качестве экспрессионного вектора для осуществления вышеописанных способов скрининга и выработки.

5 Преимущества соответствующей нуклеиновой кислоты-вектора также описаны выше в связи со способ скрининга.

Упомянутая нуклеиновая кислота-вектор может дополнительно включать о крайней мере:

- первый полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид;
- 10 - экспрессионную кассету (Exp-MSM), содержащую селективируемый маркерный ген млекопитающего; и/или
- экспрессионную кассету (Exp-MASM), содержащую амплифицируемый селективируемый маркерный ген млекопитающего.

15 Термин «экспрессионная кассета (Exp-MSM)» определяет экспрессионную кассету, содержащую селективируемый маркерный ген млекопитающего.

Термин «экспрессионная кассета (Exp-MASM)» определяет экспрессионную кассету, содержащую амплифицируемый селективируемый маркерный ген млекопитающего.

Термины «5'» и «3'» употребляются по соглашению для описания характеристик последовательности нуклеиновых кислот в связи или с положением генетических элементов, и/или с направлением процессов (от 5' к 3'), таких как, например, транскрипция под действием РНК-полимеразы или трансляция, опосредованная рибосомой, протекающая в направлении от 5' к 3'. В качестве синонимов используют указания «против направления экспрессии» (5') и «по направлению экспрессии» (3').
 20 Общепринятым является изображение последовательностей ДНК, генных карт, векторных карт и последовательностей РНК, где направление от 5' к 3' идет слева направо, или же направление от 5' к 3' указано стрелками, указывающих в направлении 3'. Соответственно, 5' (против направления экспрессии) указывает на генетические элементы, расположенные в направлении левого конца, а 3' (по направлению экспрессии) указывает на генетические элементы, расположенные в направлении правого конца,
 25 если следовать указанному соглашению.
 30

Важным аспектом также является устройство и ориентация экспрессионных кассет. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, экспрессионная кассета (Exp-MASM) расположена с со стороны 5'-конца, а экспрессионная кассета (Exp-MSM) расположена со стороны 3'-конца от экспрессионной кассеты (Exp-POI).

35 Дополнительные экспрессионные кассеты могут быть встроены между экспрессионными кассетами (Exp-POI) и (Exp-MSM), как то, например, дополнительная экспрессионная кассета (Exp-POI') для экспрессии дополнительного представляющего интерес полипептида (описанная более подробно ниже). Экспрессионные кассеты (Exp-MASM), (Exp-POI) и (Exp-MSM) предпочтительно расположены в одной и той же ориентации
 40 от 5' к 3'. Авторы изобретения обнаружили, что данная конкретная конфигурация нуклеиновых кислот обеспечивает быструю генерацию высокопродуктивных клеточных линий.

Согласно одному из альтернативных вариантов, экспрессионная кассета (Exp-POI') не содержит полинуклеотида (Pn-POI), кодирующего представляющий интерес полипептид. В связи с этим, объектом настоящего изобретения является «пустой» экспрессионный вектор с экспрессионной кассетой (Exp-POI), которая еще не содержит полинуклеотида (Pn-POI), кодирующего представляющий интерес полипептид. Однако указанный полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид,

может быть встроен в экспрессионную кассету (Exp-POI) с помощью подходящих способов клонирования, например, посредством использования для встраивания полинуклеотида (Pn-POI), кодирующего представляющий интерес полипептид, в экспрессионную кассету (Exp-POI) ферментов рестрикции. Для этой цели экспрессионная кассета (Exp-POI) может включать, например, сайт множественного клонирования (СМК), который может, например, быть задействован во всех рамках считывания. Соответствующая «пустая» нуклеиновая кислота-вектор может быть, например, предоставлена потребителям, которые затем осуществляют встраивание своего конкретного представляющего интерес нуклеотида в экспрессионную кассету (Exp-POI). Полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид, встраивают таким образом, что между полинуклеотидом (Pn-POI), кодирующим представляющий интерес полипептид, и полинуклеотидом, кодирующим трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, наличествует терминирующий кодон. Экспрессионная кассета (Exp-POI) может также включать замещаемый полинуклеотид или спейсерную последовательность нуклеиновых кислот, которые могут быть удалены и заменены полинуклеотидом (Pn-POI), кодирующим представляющий интерес полипептид. Объектом настоящего изобретения также является нуклеиновая кислота-вектор, как она определена выше, включающая экспрессионную кассету (Exp-POI), содержащую первый полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид, по меньшей мере один терминирующий кодон по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида и второй полинуклеотид по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант. Данный вариант осуществления изобретения в основном относится к конечной нуклеиновой кислоте экспрессионного вектора. Преимущественно, то же самое относится к случаю использования кассеты (Cas-POI) вместо экспрессионной кассеты (Exp-POI).

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, нуклеиновая кислота-вектор является кольцевой, экспрессионная кассета (Exp-MSM) находится со стороны 3'-конца от экспрессионной кассеты (Exp-POI), а экспрессионная кассета (Exp-MASM) находится со стороны 3'-конца от экспрессионной кассеты (Exp-MSM).

Экспрессионный вектор согласно настоящему изобретению может включать дополнительную экспрессионную кассету (Exp-POI') для экспрессии представляющего интерес полипептида. В конечной нуклеиновой кислоте-векторе указанная дополнительная экспрессионная кассета (Exp-POI') включает дополнительный полинуклеотид для экспрессии дополнительного представляющего интерес полипептида. В зависимости от полипептидов, экспрессия которых предполагается, указанная дополнительная экспрессионная кассета (Exp-POI') может включать или не включать полинуклеотид, кодирующий мембранный якорь (или сигнальный пептид для присоединения соответствующего якоря, такого как гликофосфатидилинозитольный якорь), отделенный от полинуклеотида, кодирующего дополнительный представляющий интерес полипептид, терминирующим кодоном. Таким образом, также возможна ситуация, когда несколько экспрессионных кассет для экспрессии различных полипептидов объединены экспрессионный вектор согласно настоящему изобретению. Однако только в экспрессионной кассете (Exp-POI) должна содержаться структура с «ненадежным» терминирующим кодоном и, таким образом, терминирующий кодон по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида (Pn-POI), кодирующего представляющий интерес полипептид, и второй полинуклеотид по направлению

экспрессии относительно терминирующего кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, тогда как дополнительные экспрессионные кассеты (Exp-POI) могут содержать или не содержать соответствующую структуру с терминирующим кодоном.

5 В том случае, когда происходит экспрессия молекулы иммуноглобулина или ее функционального фрагмента, особыми преимуществами характеризуется соответствующий вариант осуществления настоящего изобретения, действующий по крайней мере две экспрессионные кассеты (Exp-POI) и (Exp-POI') для экспрессии представляющего интерес полипептида. Соответственно, объектом настоящего
10 изобретения является нуклеиновая кислота-вектор для экспрессии по меньшей мере одной молекулы иммуноглобулина или ее функционального фрагмента, включающая:
- экспрессионную кассету (Exp-POI) включающую первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую и/или легкую цепь молекулы иммуноглобулина или ее функциональный фрагмент, хотя бы терминирующий кодон по направлению экспрессии
15 относительно первого полинуклеотида и второй полинуклеотид по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона, кодирующий по меньшей мере один иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный фрагмент; и/или

- дополнительную экспрессионную кассету (Exp-POI'), включающую полинуклеотид,
20 кодирующий тяжелую и/или легкую цепь молекулы иммуноглобулина или ее функциональный фрагмент. Экспрессионная кассета (Exp-POI') кодирует иммуноглобулиновую цепь, соответствующую иммуноглобулиновой цепи экспрессионной кассеты (Exp-POI) (т.е. если экспрессионная кассета (Exp-POI) кодирует тяжелую цепь, экспрессионная кассета (Exp-POI') кодирует легкую цепь, и наоборот).
25 Таким образом, на основе вектора может быть осуществлена экспрессия функциональной иммуноглобулиновой молекулы (или ее фрагмента).

Предпочтительно, экспрессия тяжелой цепи или ее функционального фрагмента происходит из экспрессионной кассеты (Exp-POI) и, таким образом, в некоторой степени экспрессируется в виде, соответственно, гибридного полипептида. Экспрессия
30 соответствующей легкой цепи или ее функционального фрагмента происходит, согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, из экспрессионной кассеты (Exp-POI'). Указанная экспрессионная кассета (Exp-POI') может находиться в той же нуклеиновой кислоте-векторе. Однако она также может находиться в отдельной нуклеиновой кислоте-векторе. Предпочтительно, все же, экспрессионные кассеты (Exp-
35 POI) и (Exp-POI') находятся в одной нуклеиновой кислоте-векторе. Также возможно осуществить экспрессию обеих цепей (тяжелой цепи и соответствующей легкой цепи) из одной экспрессионной кассеты. Они могут, например, экспрессироваться в виде гибридного полипептида, включающего сигнал самосплайсирования или сайт, подверженный действию протеазы, чтобы обеспечить получение двух отдельных цепей.
40 Также возможна би- или полицистронная реализация, при которой два или более полипептида (POI и POI') получают из одной мРНК, которая может включать, например, один или более внутренних сайт связывания рибосомы.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, его объектом является нуклеиновая кислота-вектор для экспрессии по меньшей мере одной
45 иммуноглобулиновой молекулы или ее функционального фрагмента, включающая:
- экспрессионную кассету (Exp-POI) включающую первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь молекулы иммуноглобулина или ее функциональный фрагмент, хотя бы терминирующий кодон по направлению экспрессии относительно

первого полинуклеотида и второй полинуклеотид по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный фрагмент; и

5 - дополнительную экспрессионную кассету (Exp-POI'), включающую полинуклеотид, кодирующий соответствующую легкую цепь молекулы иммуноглобулина или ее функциональный фрагмент.

Предпочтительно, экспрессионная кассета (Exp-POI) включает тяжелую цепь, а обе экспрессионные кассеты (Exp-POI) и (Exp-POI') имеют одинаковую ориентацию.

10 Предпочтительно, экспрессионная кассета (Exp-POI') расположена со стороны 5'-конца от экспрессионной кассеты (Exp-POI). Расположение экспрессионной кассеты для легкой цепи со стороны 5'-конца от экспрессионной кассеты для тяжелой цепи оказывается более выгодным с точки зрения скорости экспрессии молекул иммуноглобулина.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, его объектом также является такой экспрессионный вектор, что экспрессионная кассета (кассеты) 15 уже включают иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен и по меньшей мере один «ненадежный» терминирующий кодон (например, содержащийся в спейсерной последовательности), а также, необязательно, хотя бы часть константных областей молекулы иммуноглобулина. Фрагменты, кодирующие переменные области молекул иммуноглобулина, могут быть впоследствии встроены в экспрессионные кассеты 20 пользователем/потребителем для получения конечного экспрессионного вектора с помощью подходящих стратегий клонирования.

Не ограничивающие примеры селективируемых маркерных генов млекопитающих, которые могут содержаться в экспрессионной кассете (Exp-MSM), включают гены резистентности к антибиотикам, например, обеспечивающие резистентность к G418; 25 гигромицину (hyg или hph, коммерчески доступен от компании Life Technologies, Inc. Gaithersboro, Md.); неомицину (neo, коммерчески доступен от компании Life Technologies, Inc. Gaithersboro, Md.); зеоцину (Sh Ble, коммерчески доступен от компании Pharmingen, San Diego Calif.); пурамицину (pac, пурамицин-N-ацетилтрансфераза, доступен от компании Clontech, Palo Alto Calif.), убаину (oua, доступен от компании Pharmingen) и 30 бластицидину (доступен от компании Invitrogen). Подобные селективируемые маркерные гены млекопитающих позволяют осуществлять селекцию клеток-носителей млекопитающих, включающих упомянутые гены, и, таким образом, клеток-носителей, содержащих вектор. Термин «ген», как он употребляется в контексте, относится не только к кодирующей последовательности немутантного гена, но также относится и 35 к последовательности, нуклеиновых кислот, кодирующей функциональный вариант селективируемого маркера, обеспечивающий искомую резистентность. Как следствие, сюда входят все укороченные или мутированные варианты немутантного гена, если они обеспечивают искомую резистентность. Селективируемый маркерный ген млекопитающего предпочтительно включает чужеродные регуляторные элементы, 40 такие как, например, сильный конститутивный промотор. Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, упомянутая экспрессионная кассета (Exp-MSM) включает ген, кодирующий ферментативно функциональную неомицинофосфотрансферазу (I или II), предпочтительно включающую чужеродные регуляторные элементы, такие как, например, сильный конститутивный промотор, 45 такой как промотор обезьяньего вируса SV40. Данный вариант осуществления настоящего изобретения дает хорошие результаты в сочетании с применением гена, кодирующего ферментативно функциональной дигидрофолатредуктазы (ДФФР) в качестве амплифицируемого селективируемого маркерного гена млекопитающего.

Аmplифицируемые селективируемые маркерные гены млекопитающего, встроенные в экспрессионную кассету (Exp-MASM) позволяют осуществлять селекцию содержащих вектор клеток-носителей, равно как и амплификацию гена. Не ограничивающим примером амплифицируемого селективируемого маркерного гена млекопитающего является ген дигидрофолатредуктазы (ДФФР), кодирующий фермент ДФФР. Амплифицируемый селективируемый маркерный ген млекопитающего предпочтительно включает чужеродные регуляторные элементы, такие как, например, сильный конститутивный промотор. Другими системами, применяемыми в настоящее время среди прочих, являются глутаминсинтазная (ГС) система (Bebbington и др., 1992) и управляемая гистидином селекционная система (Hartmann и Mulligan, 1988). Данные амплифицируемые маркеры также являются селективируемыми маркерами и смогут, таким образом, быть применены для селекции содержащих вектор клеток. ДФФР и глутаминсинтаза обеспечивают хорошие результаты. В обоих случаях селекция происходит в отсутствие подходящего метаболита (гипоксантина и тимидина в случае ДФФР, глутамина в случае ГС), что предотвращает рост непреобразованных клеток. При использовании амплифицируемых систем, таких как система ДФФР, экспрессия рекомбинантного белка может быть повышена посредством взаимодействия клеток с определенными веществами, стимулирующими амплификацию генов, такими как, например, метотрексат (МТК) в случае системы ДФФР. Может быть использована, например, кодирующая последовательность немутантного гена ДФФР или мутантного варианта ДФФР, обеспечивающего, например, селекцию клеточных линий ДФФР+. Подходящим ингибитором ГС, стимулирующим амплификацию генов, является сульфоксимин метионина (МСИ). Взаимодействие с МСИ также приводит к амплификации гена.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, упомянутая экспрессионная кассета (Exp-MASM) включает ген, кодирующий ферментативно функциональную дигидрофолатредуктазу (ДФФР), который предпочтительно используют в сочетании с промотором SV40.

Соответственно, объектом настоящего изобретения являются нуклеиновые кислоты-векторы, в которых экспрессионные кассеты содержат по меньшей мере один промотор и/или промоторный/энхансерный элемент. Хотя физические границы между этими двумя контролирующими элементами не всегда ясны, термин «промотор» обычно относится к такому сайту молекулы нуклеиновой кислоты, с которым связывается РНК-полимераза и/или любой связанный с последней фактор, и на котором инициируется трансляция. Энхансеры потенцируют активность промоторов, во времени, равно как и в пространстве. Многие промоторы транскрипционно активны в широком диапазоне типов клеток. Промоторы могут быть разделены на два класса: на те, которые действуют конститутивно, и те, которые регулируются индукцией или подавлением. Промоторы, задействуемые для выработки белков на высоком уровне в клетках млекопитающих должны быть сильными и, предпочтительно, активными в широком диапазоне типов клеток. Сильные конститутивные промоторы, управляющие экспрессией во многих типах клеток, включают, не ограничиваясь перечисленными, главный поздний промотор аденовируса, предранний промотор цитомегаловируса человека, промоторы вирусов SV40 и саркомы Роуса, а также промотор мышинной 3-фосфоглицераткиназы, EF1a. Хорошие результаты достигаются с экспрессионным вектором по настоящему изобретению, когда промотор и/или энхансер получены или из цитомегаловируса (ЦМВ) и/или SV40.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения,

экспрессионная кассета (кассеты) для экспрессии представляющего интерес полипептида (полипептидов) включает (включают) более сильный промотор и/или энхансер, чем экспрессионные кассеты для экспрессии селективируемых маркеров. Подобная организация приводит к тому эффекту, что образуется больше транскрипта для представляющего интерес полипептида, чем для селективируемых маркеров. Это имеет то преимущество, что выработка представляющего интерес секретизируемого полипептида преобладает над выработкой селективируемых маркеров, поскольку способность индивидуальной клетки к выработке гетерологичных белков не может быть неограниченной и должна, таким образом, сфокусироваться на представляющем интерес полипептиде.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, экспрессионные кассеты (Exp-POI) и (Exp-POI') (если таковые наличествуют), применяемые (применяемая) для экспрессии представляющего интерес полипептида, включают в качестве регуляторных элементов промотор/энхансер ЦМВ. Экспрессионная кассеты (Exp-MSM) и (Exp-MASM), которые предпочтительно экспрессируют маркерные гены ДГФР и неомицина, включают промотор SV40 или промотор/энхансер SV40. Как известно, промотор ЦМВ является одним из сильнейших промоторов, доступных для экспрессии клетками млекопитающих, и обеспечивает очень хорошую скорость экспрессии. Полагают, что он дает существенно большее количество транскрипта, чем промотор SV40.

Большинство нативных эукариотических мРНК поли(А)-хвост на своем 3'-конце, добавляемый в результате сложного процесса, включающего расщепление первичного транскрипта и сопряженную реакцию полиаденилирования. Поли(А)-хвост несет преимущества с точки зрения стабильности и трансферабельности мРНК. Как следствие, экспрессионные кассеты вектора согласно настоящему изобретению обычно включают сайт полиаденилирования. Существует несколько эффективных сигналов полиаденилирования, которые могут быть задействованы в экспрессионных векторах млекопитающих, включая производные от бычьего гормона роста (bgh), мышинового бета-глобина, ранней транскрипционной единицы SV40 и гена тимидинкиназы вируса простого герпеса. Однако известны также и синтетические сайты полиаденилирования (см., например, экспрессионный вектор pCI-neo компании Promega, основывающийся на работе Levitt и др., 1989, Genes Dev. 3, (7): 1019-1025). Сайт полиаденилирования может быть выбран из группы, включающей сайт полиаденилирования SV40, такой как поздний и ранний сайт полиаденилирования SV40 (см., например, плазмиду pSV2-DHFR, как она описана в Subramani и др., 1981, Mol. Cell. Biol. 854-864), синтетический сайт полиаденилирования (см., например, экспрессионный вектор pCI-neo компании Promega, основывающийся на работе Levitt и др., 1989, Genes Dev. 3, (7): 1019-1025) и сайт полиаденилирования bgh (бычьего гормона роста).

Помимо того, экспрессионные кассеты могут включать подходящий сайт терминации транскрипции. Продолжающаяся транскрипция от промотора сверху по направлению экспрессии через вторую транскрипционную единицу может ингибировать функцию промотора снизу по направлению экспрессии, данное явление известно как окклюзия промотора или транскрипционная интерференция. Данное явление было описано как для прокариотов, так и для эукариотов. Правильное расположение сигналов терминации транскрипции между двумя транскрипционными единицами может предотвратить окклюзию промотора. Сайты терминации транскрипции хорошо охарактеризованы, причем показано, что их встраивание в экспрессионные векторы оказывает разнообразное благоприятное влияние на экспрессию генов.

Экспрессионные кассеты могут включать энхансер (см. выше) и/или интрон. Согласно

одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, экспрессионная кассета (кассеты) для экспрессии представляющего интерес полипептида включают интрон. Большинство генов высших эукариотов содержат интроны, удаляемые при процессинге РНК. Геномные конструкторы экспрессируются в трансгенных системах более эффективно, чем идентичные конструкторы без интронов. Обычно интроны располагают на 5'-конце открытой рамки считывания. Соответственно, интрон может быть включен в экспрессионную кассету (кассеты) для экспрессии представляющего интерес полипептида (полипептидов) с целью повышения скорости экспрессии. Такой интрон может быть расположен между промотором и/или промоторным/энхансерным элементом (элементами) и 5'-концом открытой рамки считывания экспрессируемого полипептида. В связи с этим, объектом настоящего изобретения является нуклеиновая кислота-вектор, в котором по крайней мере экспрессионная кассета (Exp-POI) включает интрон, расположенный между промотором и стартовым кодоном полинуклеотида, для экспрессии представляющего интерес полипептида. В соответствующей области известно несколько подходящих интронов, которые могут быть задействованы в связи с настоящим изобретением.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, интрон, используемый в экспрессионных кассетах для экспрессии представляющего интерес полипептида, является синтетическим интроном, таким как интрон SIS или RK. Интрон RK является сильным синтетическим интроном, предпочтительно располагаемым перед стартовым кодоном АТГ представляющего интерес гена. Интрон RK состоит из интронного донорного сайта сплайсинга промотора ЦМВ и акцепторного сайта сплайсинга варибельной области тяжелой цепи мышиного IgG (см., например, Eaton и др., 1986, *Biochemistry* 25, 8343-8347, Neuberger и др., 1983, *EMBO J.* 2(8), 1373-1378; он может быть получен из вектора pRK-5 (BD PharMingen)).

Неожиданным образом, помещение интрона на 3'-конце открытой рамки считывания гена ДГФР оказывает благоприятное воздействие на скорость экспрессии/амплификации конструктора. Задействуемый в экспрессионной кассете ДГФР интрон приводит к уменьшенному, нефункциональному варианту гена ДГФР (Grillari и др., 2001, *J. Biotechnol.* 87, 59-65). Таким образом, уровень экспрессии гена ДГФР понижается. Это приводит к повышенной чувствительности в отношении МТК и более точным условиям селекции. В связи с этим, объектом настоящего изобретения является, нуклеиновая кислота-вектор, в котором экспрессионная кассета (MASM) включает интрон, расположенный со стороны 3'-конца от амплифицируемого селективируемого маркерного гена. Подходящий интрон может быть получен из вектора pSV2-DHFR (см., например, выше).

Упомянутый вектор может включать хотя бы одну дополнительную экспрессионную кассету (Exp-PSM), содержащую прокариотический селективируемый маркерный ген. Указанная экспрессионная кассета (Exp-PSM) может быть расположена между экспрессионными кассетами (Exp-MSM) и (Exp-MASM). Упомянутый селективируемый маркер может опосредовать резистентность к антибиотикам, таким как, например, ампициллин, канамицин, тетрациклин и/или хлорамфеникол. Упомянутая экспрессионная кассета (Exp-PSM) предпочтительно расположена в той же ориентации от 5' к 3', что и прочие экспрессионные кассеты (Exp-POI), (Exp-MSM) и (Exp-MASM).

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, экспрессионная кассета (Exp-POI) и/или (Exp-POI') содержащаяся в векторе, дополнительно включает (включают):

- полинуклеотид (Pn-TAG), кодирующий аффинную метку, расположенную по

направлению экспрессии относительно хотя бы одного терминирующего кодона, который расположен по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида, где упомянутый полинуклеотид (Pn-TAG) расположен вверх по направлению экспрессии относительно второго полинуклеотида, кодирующего иммуноглобулиновый

5 трансмембранный якорный домен и/или

- полинуклеотид (Pn-MARKER), кодирующий селективируемый маркер.

Преимущества были вкратце упомянуты выше.

Нуклеиновая кислота-вектор может быть трансфицирована в клетку-хозяина в своей кольцевой форме. Сверхспиральные векторные молекулы обычно преобразуются в ядре в линейные молекулы в результате активности эндо- и экзонуклеаз. Однако
10 линейаризация нуклеиновой кислоты-вектора перед трансфекцией зачастую повышает эффективность стабильной трансфекции. Кроме того, точка линейаризации может быть контролируема, если вектор линейаризуют прежде трансфекции.

В связи с этим, согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, вектор включает предварительно заданный сайт рестрикции, который может быть
15 задействован для линейаризации нуклеиновой кислоты-вектора прежде трансфекции. Разумный выбор такого сайта рестрикции-линейаризации очень важен, поскольку подобный сайт рестрикции определяет, где нуклеиновая кислота-вектор раскрывается/линейаризуется и, таким образом, определяет порядок/расположение экспрессионных
20 кассет при встраивании конструктора в геном эукариотической клетки, в частности, клетки млекопитающего.

В соответствии с этим, нуклеиновая кислота-вектор может включать сайт рестрикции-линейаризации для линейаризации вектора, причем такой сайт рестрикции-линейаризации расположен между экспрессионными кассетами (Exp-MSM) и (Exp-MASM).

Предпочтительно, указанный сайт рестрикции-линейаризации является уникальным и
25 входит в экспрессионную нуклеиновую кислоту-вектор лишь однократно. Может быть, например, задействован такой сайт рестрикции-линейаризации, который распознается рестриктазным ферментом, характеризуемым низкой частотой расщепления, чтобы обеспечить расщепление вектора лишь по сайту рестрикции-линейаризации, но не (или
30 лишь в редких случаях) внутри, например, экспрессионной кассеты (кассет) или остова вектора. Это может быть, например, достигнуто посредством использования сайта рестрикции для рестриктазного фермента, характеризуемого распознаваемой последовательностью из более шести пар оснований, или же распознающего последовательности, мало представленные в хромосомной ДНК. Подходящим примером
35 является фермент Swell; вектор может, таким образом, включать сайт SwaI в качестве уникального сайта линейаризации-рестрикции. В том случае, если упомянутый сайт линейаризации-рестрикции присутствует в последовательности нуклеиновой кислоты-вектора (включая полинуклеотиды, кодирующие представляющий интерес полипептид) более одного раза, или в том случае, если используется рестриктазный фермент,
40 производящий несколько расщеплений в последовательности нуклеиновой кислоты-вектора, в объем настоящего изобретения также входит, например, варьирование/мутация сайтов рестрикции помимо сайта рестрикции-линейаризации, расположенного между экспрессионными кассетами (Exp-MSM) и (Exp-MASM), с целью устранения данных дополнительных сайтов рестрикции и получения уникального или хотя бы
45 редкого сайта линейаризации-рестрикции.

В том случае, когда вектор используется в качестве стандартного экспрессионного вектора, задействуемого, например, в качестве средства для экспрессии нескольких различных полипептидов, может предоставить преимущества использование сайта

рестрикции-линеаризации, включающего несколько сайтов распознавания для ферментов с низкой частотой расщепления. Выбираемые для линеаризации рестриктазные ферменты не должны, предпочтительно, производить расщеплений внутри экспрессионных кассет для селективируемых маркеров или прочих последовательностей из остова вектора, чтобы
5 надежно обеспечить лишь одиночное расщепляющее действие фермента, должным образом линеаризующее вектор. Вводя сайт рестрикции-линеаризации, включающий несколько сайтов распознавания для рестриктазных ферментов с низкой частотой расщепления, пользователь может выбрать подходящий рестриктазный фермент для линеаризации из предоставляемых возможностей, чтобы безопасно избежать рестрикции
10 внутри полинуклеотида (Pn-POI), кодирующего представляющий интерес полипептид. Однако, как было вкратце указано выше, дополнительные сайты рестрикции могут быть мутированы, или же может произойти частичное рестрикционное расщепление.

Размещение сайта рестрикции-линеаризации между экспрессионной кассетой (Exp-MSM) и экспрессионной кассетой (Exp-MASM) приводит к тому, что экспрессионная
15 кассета (Exp-POI) (и дополнительные экспрессионные кассеты для экспрессии представляющего интерес полипептида, если таковые присутствуют) имеет своим соседом со стороны 5'-конца экспрессионную кассету (Exp-MASM). Экспрессионная кассета (Exp-MSM) при линеаризации расположена со стороны 3'-конца от экспрессионной кассеты (Exp-POI). Таким образом, экспрессионные кассеты (MSM) и
20 (MASM) разделяются при линеаризации кольцевой нуклеиновой кислоты-вектора. Если присутствует экспрессионная кассета (Exp-PSM) для бактериального селективирующего маркера (см. ниже), сайт рестрикции-линеаризации предпочтительно располагают между экспрессионными кассетами (Exp-PSM) и (Exp-MASM). В результате этого бактериальный селективирующий маркерный ген расположен с 3'-конца и, таким образом, «вне»
25 «принадлежащих млекопитающим» областей линеаризованной нуклеиновой кислоты-вектора. Подобное расположение оказывается благоприятным, поскольку бактериальные гены предположительно не имеют преимуществ для экспрессии с помощью клеток млекопитающих, поскольку бактериальные последовательности могут приводить к повышенному уровню метилирования или другим эффектам сайленсинга в клетках млекопитающих.
30

Представляющий интерес полипептид не ограничен каким-либо конкретным белком или группой белков, но может, напротив, являться любым белком, любого размера, функции ли происхождения, селекция и/или экспрессия которого с помощью описанных в контексте способов может быть сочтена желательной. Соответственно, могут
35 экспрессироваться/вырабатываться несколько различных представляющего интерес полипептида. Термин «полипептид» относится к молекуле, включающей полимер из аминокислот, связанных друг с другом пептидной связью (связями). Полипептиды включают белки и/или пептиды с любой активностью или биологической активностью, включая, например, биологически активные полипептиды, такие как ферментативные
40 белки или пептиды (например, протеазы, киназы, фосфатазы), рецепторные белки или пептиды, транспортные белки или пептиды, бактерицидные и/или связывающие эндотоксины белки, структурные белки или пептиды, иммунные полипептиды, токсины, антибиотики, гормоны, факторы роста, вакцины и им подобные. Упомянутый полипептид может быть выбран из группы, включающей пептидные гормоны,
45 интерлейкины, тканевые активаторы пламиногена, цитокины, иммуноглобулины, в частности, антитела или фрагменты антител, или их варианты.

Термин «молекула иммуноглобулина», как он употребляется в контексте в качестве примера представляющего интерес полипептида, относится к белку, включающему

один или несколько полипептидов, в существенной степени или частично кодируемых иммуноглобулиновыми генами или фрагментами иммуноглобулиновых генов, например, фрагментом, содержащим одну или более область, определяющую комплементарность (CDR). Известные иммуноглобулиновые гены включают гены константной области каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю, равно как и множество генов 5 вариабельной области иммуноглобулина. Легкие цепи классифицируются, как правило, как, например, либо каппа, либо лямбда.

Тяжелые цепи, как правило, классифицируются как, например, гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, что, в свою очередь, определяет классы иммуноглобулинов, IgG, 10 IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Указанный иммуноглобулин может принадлежать к любому изотипу. Очень часто в качестве терапевтических белков вырабатывают/ требуются молекулы IgG (например, IgG1). Типичная структурная единица иммуноглобулина (антитела) включает тетрамер. В природе каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где в каждой паре присутствуют одна 15 «легкая» (около 25 кДа) и одна «тяжелая» цепь (около 50-70 кДа). N-конец каждой из цепей определяет вариабельную область из примерно 100-110 или более аминокислот, преимущественно ответственных за распознавание антигена. Термины «вариабельная легкая цепь» (VL) и «вариабельная тяжелая цепь» (VH) относятся к данным легкой и тяжелой цепям, соответственно.

Антитела существуют в виде интактных иммуноглобулинов или в виде ряда хорошо охарактеризованных фрагментов, которые могут, например, вырабатываться 20 посредством расщепления различными пептидазами. Фрагментным антителом является любой такой фрагмент антитела, который включает не менее 20 аминокислот из упомянутого цельного антитела, предпочтительно, не менее 100 аминокислот, и все 25 еще сохраняет способность к связыванию с антигеном. Фрагментное антитело может включать область связывания антитела, такую как фрагмент Fab, фрагмент F(ab)₂, мультиантитела, включающие несколько областей связывания, такие как диатела, триатела или тетратела, однодоменные антитела или аффинные антитела. Вариант антитела является производным антитела или фрагментом антитела, обладающим той 30 же функцией связывания, но, например, измененной аминокислотной последовательностью. Подобное антитело и/или фрагмент антитела может включать мышиную легкую цепь, человеческую легкую цепь, гуманизованную легкую цепь, человеческую тяжелую цепь и/или мышиную тяжелую цепь, равно как и их активные фрагменты или производные. Таким образом, оно может являться, например, мышиным, 35 человеческим, химерным или гуманизованным. Тогда как различные фрагменты антител определяются в терминах расщепления интактного антитела, специалист в соответствующей области должен понимать, что подобные фрагменты Fab' или F(ab)₂ могут быть синтезированы заново либо химическим путем, либо с помощью подходов на основе рекомбинантной ДНК, пептидного дисплея и им подобных. Таким образом, 40 термин «антитело», как он употребляется в контексте, также включает фрагменты антител, как получаемые в результате модификации цельных антител, так и синтезируемые заново с помощью подходов на основе рекомбинантных ДНК. Антитела также включают однолучевые составные моноклональные антитела, одноцепочечные антитела, включая одноцепочечные антитела Fv(scFv), в которых вариабельная тяжелая и вариабельная легкая цепи соединены (непосредственно или через пептидный линкер), образуя непрерывный полипептид, равно как и диатела, триатела и тетратела (см., например, Pack и др. J Mol Biol., февраль 1995 10; 246(1):28-34; Pack и др. Biotechnology (N Y), ноябрь 1993; 11(11):1271-7; Pack & Plueckthun Biochemistry, февраль 1992 18; 31

(6):1579-84). Антитела могут являться, например, поликлональными, моноклональными, химерными, гуманизированными, одноцепочечными, фрагментами Fab, одноцепочечными Fab (Hust и др., VMC Biotechnol (2007) 7:14), фрагментами, вырабатываемыми экспрессионной библиотекой Fab, или им подобными.

5 Полипептиды, получаемые согласно настоящему изобретению, могут быть выделены с помощью известных в соответствующей области способов. Например, полипептиды могут быть выделены из питательной среды с помощью общепринятых методик, включающих, не ограничиваясь перечисленным, центрифугирование, фильтрование, ультрафильтрацию, экстракцию или осаждение. Очистка может быть осуществлена с
10 помощью разнообразных методик, известных в соответствующей области, включая, но, не ограничиваясь перечисленным, хроматографию (например, ионообменную аффинную, гидрофобную, хроматофокусирование и эксклюзионную хроматографию), электрофоретические методы (например, препаративное изоэлектрическое фокусирование), подходы на основе дифференциальной растворимости (например, осаждение сульфатом аммония) или экстракцию. Помимо этого, полипептид может
15 быть получен из клеток-носителей посредством разрушения клеток.

Объектом настоящего изобретения также является способ получения нуклеиновой кислоты-вектора, как он описан выше, включающий стадию сборки по меньшей мере одной кассеты (Cas-POI), предпочтительно, экспрессионной кассеты (Exp-POI), в вектор
20 таким образом, что упомянутая кассета включает первый полинуклеотид (Pn-POI), кодирующий представляющий интерес полипептид, по меньшей мере один терминирующий кодон по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида и второй полинуклеотид по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный
25 якорный домен или функциональный вариант. Данный способ может дополнительно включать сборку:

- экспрессионной кассеты (Exp-MSM), включающей селективируемый маркерный ген млекопитающего,

- экспрессионной кассеты (Exp-MASM), включающей амплифицируемый
30 селективируемый маркерный ген млекопитающего, предпочтительно осуществляемую таким образом, что экспрессионная кассета (Exp-MASM) расположена со стороны 5'-конца, а экспрессионная кассета (Exp-MSM) расположена со стороны 3'-конца от экспрессионной кассеты (Exp-POI), причем экспрессионные кассеты (Exp-MASM), (Exp-POI) и (Exp-MSM) расположены в одинаковой ориентации от 5' к 3'.

35 Объектом настоящего изобретения также является эукариотическая клетка-хозяина, предпочтительно, млекопитающего, получаемая с помощью описанного выше способа скрининга. Также объектом настоящего изобретения является эукариотическая клетка-хозяина, предпочтительно, млекопитающего, содержащая кассету (Cas-POI), включающую гетерологичный и, таким образом, чужеродный полинуклеотид,
40 кодирующий представляющий интерес полипептид, по меньшей мере один терминирующий кодон по направлению экспрессии относительно такого гетерологичного полинуклеотида и полинуклеотид по направлению экспрессии относительно терминирующего кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант. Кассета (Cas-POI)
45 может быть внедрена, например, с помощью нуклеиновой кислоты-вектора согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, кассета (Cas-POI) и/или кассета (Cas-POI') является экспрессионной кассетой.

Другие характеристики кассеты (Cas-POI) и подробности в отношении подходящих

векторов описаны выше и равно относятся к клетке-хозяина по настоящему изобретению. Подходящие эукариотические клетки-хозяева описаны выше. Предпочтительно, эукариотическая клетки-хозяина является клеткой-хозяина млекопитающего. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения эукариотическая клетки-хозяина не является В-клеткой или производным В-клетки. В соответствии с этим, эукариотическая клетки-хозяина, предпочтительно млекопитающего, представляет собой клетку-хозяина, которая не экспрессирует в естественных условиях рецепторные цепи Ig-альфа и Ig-бета. Помимо этого, согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, в указанной клетке-хозяина не происходит искусственной коэкспрессии рецепторных цепей Ig-альфа и Ig-бета. Предпочтительными клетками-хозяина являются клетки СНО.

Объектом настоящего изобретения также является способ получения эукариотической клетки-хозяина, как она описана выше, в котором эукариотическая клетки-хозяина трансфицируется нуклеиновой кислотой-вектором согласно настоящему изобретению и/или гетерологичной нуклеиновой кислотой, включающей кассету (Cas-POI) согласно настоящему изобретению. Из предшествующих работ в данной области известно несколько подходящих способов введения экспрессионного вектора в клетку-хозяина млекопитающего. Соответствующие способы включают, не ограничиваясь перечисленным, кальций-фосфатную трансфекцию, электропорацию, липофекцию, биолистически- и полимерно-опосредованный генный трансфер. Помимо традиционных способов на основе случайной интеграции, для переноса кассеты (Cas-POI) в геном клетки-хозяина могут также быть применены опосредованные рекомбинацией подходы. Подобные рекомбинационные способы могут включать применение сайт-специфических рекомбиназ, таких как Cre, Flp или фС31 (см., например, Oumard и др., *Cytotechnology* (2006) 50: 93-108), которые могут опосредовать непосредственное встраивание трансгенов. Альтернативно, для встраивания кассеты (Cas-POI) может быть задействован механизм гомологичной рекомбинации (обзор которому дан в Sorrell и др., *Biotechnology Advances* 23 (2005) 431-469). Встраивание гена на основе рекомбинации позволяет минимизировать число элементов, которые нужно включить в гетерологичную нуклеиновую кислоту, переносимую, вводимую в клетку-хозяина. Например, может быть использован локус встраивания, уже содержащий промотор и сайт полиаденилирования (экзогенный или эндогенный), вследствие чего в клетку-хозяина остается перенести/трансфицировать лишь оставшиеся элементы (например, представляющий интерес полинуклеотид, терминирующий кодон и полинуклеотид, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный фрагмент). Даже перенос частей кассеты (Cas-POI) окажется достаточным, если в сайте встраивания будут присутствовать недостающие части. Варианты осуществления подходящего экспрессионного вектора согласно настоящему изобретению, равно как и подходящие клетки-хозяева и представляющие интерес полипептиды, подробно описаны выше; следует обратиться к вышеприведенному описанию.

Объектом настоящего изобретения также является полипептид, полученный способом согласно настоящему изобретению, как он определен выше и в формуле изобретения. Указанный полипептид предпочтительно является молекулой иммуноглобулина или ее фрагментом. Полипептиды, полученные согласно способам по настоящему изобретению, демонстрируют хорошие свойства в части стабильности. Данные результаты также показывают, что полипептиды экспрессируются в функциональной форме и, следовательно, в правильной конформации. В связи с этим, объектом

настоящего изобретения также являются полипептиды, полученные посредством способа выработки согласно настоящему изобретению с помощью экспрессионного вектора, описанного подробно выше. Как было вкратце указано выше, полипептиды получают с хорошими выходами, благодаря задействованной стадии селекции/скрининга.

5 Полипептид предпочтительно является молекулой иммуноглобулина, такой как антитело или его фрагмент.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано нижеследующими примерами, которые не являются ограничивающими, но все же описывают предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения.

10 Примеры

Пример 1: Конструкция вектора трансмембранной версии Ig

Синтетический фрагмент ДНК 1113 bp, кодирующий часть константной области тяжелой цепи IgG1 плюс спейсер с «ненадежным» терминирующим кодоном и трансмембранный и цитоплазматический домены Ig, встраивают в pBW201 (стандартный вектор, содержащий тяжелую цепь IgG1 и легкую цепь каппа) по сайтам AgeI и AscI, образуя вектор pNT11 (см. таблицу 1). Нуклеотидная последовательность трансмембранного домена Ig представлена в SEQ ID No:1, где указан спейсер с «ненадежным» терминирующим кодоном. Безусловно, в соответствии с принципами настоящего изобретения могут также быть использованы варианты кодируемого трансмембранного домена Ig, обеспечивающие такую же функцию прикрепления к мембране. Подобные варианты гомологичны кодируемому трансмембранному домену Ig и могут, например, быть получены путем консервативного замещения аминокислот. Они характеризуются степенью гомологичности не менее 80%, 85%, 90%.

Полинуклеотиды, кодирующие соответствующие варианты могут, например, гибридизоваться с указанной последовательностью в строго определенных условиях.

Селектируемый маркерный ген wt DHFR из pNT11 и pBW201 может быть заменен синтетическим фрагментом 1252 bp, кодирующим точечного мутанта ДГФР L23P по сайтам SwaI и BglII, что будет приводить к pNT29 и pBW478. Мутант ДГФР позволяет осуществлять селекцию клеточных линий ДГФР+.

30 Векторы для FACS (pNT11, pNT29) имеют в своей основе стандартные векторы для экспрессии антител (pBW201, pBW478). pNT11 и pBW201 отличаются от pNT29 и pBW478 кассетой селектируемого маркера ДГФР, которую они несут. Помимо этого, их остовы идентичны. Вектор характеризуется моноцистронным «тандемным» устройством и содержит экспрессионные кассеты для легкой и тяжелой цепей антитела, обе управляемые промотором/энхансером ЦМВ. Единственной модификацией при получении векторов для FACS является встройка трансмембранного и цитоплазматического доменов IgG1 со стороны 3'-конца от кДНК тяжелой цепи антитела (НС). Между НС и трансмембранным доменом помещают короткий спейсер с «ненадежным сигналом терминации трансляции». Подобранные для терминирующего кодона окружение в последовательности должно, как предполагается, приводить к уровню прочитывания до 5%. Все четыре вектора кодируют одно и то же человеческое антитело IgG.

Как вкратце указано выше, выбранные нуклеиновые кислоты-векторы, используемые для экспрессии, в частности, ориентация и взаиморасположение элементов векторов, обеспечивают очень эффективную экспрессию молекул иммуноглобулина. Подходящие векторы, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением и которые описаны выше, проиллюстрированы в нижеследующей таблице (стрелки указывают ориентацию генетических элементов от 5' к 3'):

Карта вектора	
	pNT11 - «вектор для FACS»
	промотор/энхансер ЦМВ →
5	RK-интрон →
	mAB-LC →
	SV40-поли(A) →
	промотор/энхансер ЦМВ →
	RK-интрон →
	mAB-НС →
	спейсер + «ненадежный» терминирующий кодон
10	Трансмембранный и цитоплазматический домены Ig →
	SV40-поли(A) →
	Область фага f1 →
	промотор/энхансер SV40 →
	Neo →
	Синтетический поли(A)
15	Amp →
	промотор/энхансер SV40 →
	ДГФР →
	SV40-поли(A) →

Сокращения, употребляемые в таблице 1, соответствуют стандартным значениям, как то должно быть очевидно специалисту в соответствующей области и как описано выше, и, в частности, обозначают следующее:

промотор/энхансер ЦМВ = предранний промотор/энхансер цитомегаловируса человека

RK-интрон включает интронный донорный сайт сплайсирования промотора ЦМВ и акцепторный сайт сплайсирования вариабельной области тяжелой цепи мышинового IgG (см., например, Eaton и др., 1986, Biochemistry 25, 8343-8347, Neuberger и др., 1983, EMBO J. 2(8), 1373-1378; он может быть получен из вектора pRK-5 (BD Pharmingen))

mAB-LC = легкая цепь моноклонального антитела

mAB-НС = тяжелая цепь моноклонального антитела

SV40-поли(A) = сайт полиаденилирования SV40

промотор/энхансер SV40 = промотор/энхансер SV40

Neo = неомицинофосфотрансфераза

синтетический поли(A) = синтетический сайт полиаденилирования

Amp = ген резистентности к бета-лактамам антибиотикам

ДГФР = ген дигидрофолатредуктазы.

Пример 2: Трансфекция и селекция клеток CHO

Культивирование, трансфекцию и скрининг осуществляют во встряхиваемых колбах, посредством выращивания клеток CHO из суспензии в специализированной химически охарактеризованной культуральной среде. Клетки трансфицируют посредством или липофекции, или электропорации (нуклеофекции), следуя инструкциям производителя. Эффективность трансфекции проверяют с помощью трансфекции репортерной плазмиды GFP (зеленого флуоресцентного белка) и проточного цитометрического анализа трансфицированных клеток. Селекцию начинают через 24-48 часов после трансфекции в зависимости от жизнеспособности клеток посредством добавления к клеткам содержащей G418 селективной среды. Когда жизнеспособность клеток восстанавливается до уровня выше 80%, осуществляют вторую стадию селекции посредством переноса клеток в не содержащую G418 среду, содержащую метотрексат (МТК). После получения клеток от селекции под действием МТК продолжают культивирование в содержащей

МТК среде в продолжение циклов обогащения, контролируемых с помощью FACS, контролируемого с помощью FACS клонирования или клонирования методом предельных разбавлений и скрининга.

Рост и жизнеспособность клеток отслеживают с помощью автоматизированной системы (ViCell, Beckmann Coulter).

Пример 3: Анализ с применением FACS, обогащение и клонирование клеток

Снабжение клеток метками: 2×10^7 клеток на трансфицированный пул центрифугируют и промывают 5 мл охлажденного PBS (забуференного фосфатом солевого раствора) и заново суспендируют в 1 мл холодного PBS. К клеткам добавляют подходящее количество помеченного FITC (изотиоцианатом флуоресцеина) антитела анти-IgG и осуществляют инкубирование на льду в темноте в течение 30 минут. После этого клетки дважды промывают при комнатной температуре 5 мл PBS, заново суспендируют в 1 мл PBS, фильтруют и помещают в пробирку для FACS с целью анализа, сортировки и клонирования.

Анализ, сортировка и клонирование клеток: клеточный сортировка осуществляют с помощью прибора FACSAria (Becton Dickinson), оборудованного автоматизированным устройством для сбора клеток (ACDU) с использованием программного обеспечения FACSDiva. Для возбуждения флуоресцеиновых красителей, связанных со вторичным антителом, используют охлаждаемый воздухом твердотельный лазер (Coherent® Sapphire™ твердотельный) на низкой мощности, настроенный на длину волны 488 нм. Относительную интенсивность флуоресценции FITC измеряют на детекторе E с использованием фильтра 530/30 BP. Пять процентов клеток с наиболее интенсивной флуоресценцией FITC отбирают и подвергают сортировке, блоком или как отдельные клетки, в 96 ячеечных планшетах.

Пример 4: Определение продуктивности и стабильности клонов

Продуктивность клонов анализируют в опытах с периодическими культурами и с периодическими культурами с подпиткой, используя различные форматы. Начальный скрининг клонов осуществляют с помощью периодических анализов в 24-ячеечных планшетах, осуществляя посев клеток в 24-ячеечные планшеты. Концентрацию антител в надсадочных жидкостях клеточных культур определяют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на А-белке через 10 дней после начала культивирования. Наиболее продуктивные клоны также анализируют во встряхиваемых колбах в периодическом режиме и периодическом режиме с подпиткой. Производят посев периодической культуры в 500 мл встряхиваемые колбы при рабочем объеме 100 мл и осуществляют культивирование в камере для встряхивания (без увлажнения) при 150 об./мин и 10% CO₂. Жизнеспособность клеток должна составлять в начале анализа >90%. Плотность посева клеток составляет 2×10^5 клеток/мл. Определение концентрации продукта, числа клеток и жизнеспособности определяют на 3-7, 10 и 13 сутки. Опыты в режиме периодических культур с подпиткой осуществляют в тех же условиях, но с начальной плотностью клеток 4×10^5 клеток/мл и при регулярной подпитке. Стабильность клонов оценивают посредством культивирования клеток в продолжение 14 недель с измерениями продуктивности каждые две недели в варианте со встряхиваемой колбой в режиме периодических культур.

Пример 5: Анализ транзистентно трансфицированных клеток

Для выяснения того, присутствуют ли связанные с мембраной продукты трансляции на клеточной поверхности после трансфекции новым вектором для FACS (здесь - pNT11 или pNT29), анализируют транзистентно трансфицированные клетки с помощью

иммуноокрашивания и проточной цитометрии. Через 48 часов после трансфекции клетки окрашивают с помощью меченого FITC антитела, направленного против человеческого IgG. Клетки, трансфицированные экспрессионным вектором для GFP, используют в качестве контроля трансфекции, рассчитанная эффективность трансфекции составляет около 60%. Нетрансфицированные клетки и клетки, трансфицированные стандартным вектором (не включающим трансмембранный домен), не демонстрируют значимых уровней связанного с поверхностью антитела, тогда как 16% клеток, трансфицированных вектором для FACS, демонстрируют окрашивание выше фонового уровня. Это показывает, что гибридный белок, в данном случае - молекула антитела, закрепленный на клеточной мембране, может быть обнаружен на клеточной поверхности.

Пример 6: Анализ и обогащение стабильно трансфицированных клеток

Удостоверившись в присутствии связанного с мембраной антитела у транзитивно трансфицированных клеток, анализируют уровни экспрессии на поверхности и распределение в полученных при селекции пулах трансфицированных клеток. Таким образом можно показать, что продуктивные клетки могут быть селективно обогащены с помощью сортировки с применением FACS. Для этого осуществляют селекцию клеток после трансфекции в присутствии G418, а затем в присутствии МТК. Получаемые таким образом пулы резистентных клеток окрашивают с помощью меченого FITC антитела анти-IgG и анализируют посредством проточной цитометрии. В качестве контроля окрашивают и анализируют Нетрансфицированные клетки. В подвергнутых селекции пулах, трансфицированных вектором для FACS, обнаруживают субпопуляции меченых клеток. Распределение меченых клеток различается, таким образом, между двумя анализируемыми пулами. Для оценки того, могут ли быть обогащены высокопродуктивные клетки, на основе их флуоресцентного сигнала (и, как следствие, для осуществления количественной селекции), клетки с наивысшей интенсивностью флуоресценции (верхние 5%) из каждого из двух пулов подвергают сортировке и субкультивируют для сравнения продуктивности с пулом до обогащения.

Пример 7: Анализ продуктивности обогащенных и необогащенных клеток

Анализ продуктивности подвергнутых селекции пулов до и после обогащения с помощью проточной цитометрии осуществляют на периодических культурах во встряхиваемых колбах, сравнивая концентрацию конечного продукта на 13 сутки. На 13 сутки собирают надосадочную жидкость и анализируют на содержание IgG с помощью ВЭЖХ с А-белком. В обоих пулах наблюдают существенное увеличение уровня выработки уже после осуществления одного цикла обогащения с помощью FACS согласно идеям настоящего изобретения. Тогда как концентрация продукта для пула 1 увеличивается примерно в 2 раза, для пула 2 она увеличивается примерно в 10 раз, что демонстрирует селективное обнаружение высокопродуктивных клеток в процессе окрашивания и сортировки. Уже на первом цикле обогащения могут быть достигнуты концентрации антитела почти 250 мг/л.

Пример 8: Селективное клонирование высокопродуктивных клеток на основе проточной цитометрии

Для сортировки и посева индивидуальных окрашенных клеток согласно их профилю окрашивания может быть применена проточная цитометрия. Для анализа того, приводит ли такое селективное клонирование к повышению числа высокопродуктивных клонов по сравнению с клонированием методом предельных разведений, генерируют клоны с помощью обоих способов и анализируют продуктивность в периодических культурах в 24-ячеечных планшетах. Получают периодические культуры в 24-ячеечных планшетах,

на 10 сутки собирают надосадочную жидкость и измеряют содержание в ней IgG с помощью ВЭЖХ с А-белком. Получают нижеследующие результаты.

результаты сортировки методами FACS и предельных разбавлений (ПР)						
Способ	0-25 мг/л	26-50 мг/л	51-75 мг/л	76-100 мг/л	101-125 мг/л	126-150 мг/л
Клоны, полученные методом ПР	12	0	1	0	1	0
Клоны, полученные с применением FACS	2	2	2	2	0	1

Клоны, полученные с помощью проточной цитометрии, характеризуются более высокой средней продуктивностью по сравнению с клонами, полученными методом предельных разбавлений, что также отражается в распределении клонов по диапазонам продуктивности.

Пример 9: Сравнение вектора для FACS и стандартного вектора

Для подтверждения положительно эффекта от обогащения трансфицированных клеток с помощью проточной цитометрии и для сравнения применения вектора для FACS (pNT29) со стандартным вектором клетки трансфицируют и подвергают селекции в присутствии G418 и МТК. Три клеточных пула, трансфицированных вектором для FACS (образцы 1, 2 и 3) и три клеточных пула, трансфицированных стандартным вектором (образцы 7, 8 и 9) анализируют с помощью проточной цитометрии и подвергают сортировке 5% клеток с наиболее сильным сигналом от окрашивания. Для сравнения концентрации продукта после обогащения осуществляют опыты с периодическими культурами во встряхиваемых колбах. Трансфицированные и подвергнутые селекции пулы окрашивают и подвергают сортировке посредством проточной цитометрии для обогащения 5% клеток с наиболее сильной интенсивностью флуоресценции. До и после обогащения проводят опыты с периодическими культурами во встряхиваемых колбах и анализируют через 13 суток надосадочные жидкости с помощью ВЭЖХ с А-белком. Получают приблизительно следующие результаты.

Результаты, полученные с вектором для FACS					
Образец	Концентрация продукта	Образец	Концентрация продукта	Образец	Концентрация продукта
Образец 1; Вектор для FACS, до обогащения	10 мг/л	Образец 2; Вектор для FACS, до обогащения	40 мг/мл	Образец 3; Вектор для FACS, до обогащения	15 мг/мл
Образец 1; Вектор для FACS, 1-е обогащение	55 мг/мл	Образец 2; Вектор для FACS, 1-е обогащение	65 мг/мл	Образец 3; Вектор для FACS, 1-е обогащение	95 мг/мл
Образец 1; Вектор для FACS, 2-е обогащение	100 мг/мл	Образец 2; Вектор для FACS, 2-е обогащение	90 мг/мл	Образец 3; Вектор для FACS, 2-е обогащение	155 мг/мл
Образец 1; Вектор для FACS, 3-е обогащение	365 мг/мл	Образец 2; Вектор для FACS, 3-е обогащение	340 мг/мл	Образец 3; Вектор для FACS, 3-е обогащение	85 мг/мл

Результаты, полученные со стандартным вектором	
------------------------------------------------	--

	Образец	Концентрация продукта	Образец	Концентрация продукта	Образец	Концентрация продукта
5	Образец 7; Стандартный вектор, до обогащения	40 мг/л	Образец 8; Стандартный вектор, до обогащения	5 мг/мл	Образец 9; Стандартный вектор, до обогащения	5 мг/мл
10	Образец 7; Стандартный вектор, 1-е обогащение	55 мг/мл	Образец 8; Стандартный вектор, 1-е обогащение	10 мг/мл	Образец 9; Стандартный вектор, 1-е обогащение	2 мг/мл
10	Образец 7; Стандартный вектор 2-е обогащение	50 мг/мл	Образец 8; Стандартный вектор, 2-е обогащение	12 мг/мл	Образец 9; Стандартный вектор, 2-е обогащение	10 мг/мл
15	Образец 7; Стандартный вектор, 3-е обогащение	25 мг/мл	Образец 8; Стандартный вектор, 3-е обогащение	15 мг/мл	Образец 9; Стандартный вектор, 3-е обогащение	10 мг/мл

Как следует из результатов, уровень продуктивности для клеток, трансфицированных вектором для FACS существенно увеличивается в трех исследуемых пулах, тогда как в случае стандартного вектора только в одном пуле наблюдалось существенное увеличение концентрации продукта. Средняя концентрация продукта после обогащения в случае вектора для FACS существенно выше, чем в случае стандартного вектора. Осуществляют два дополнительных последовательных цикла обогащения с помощью FACS для обогащения высокопродуктивных клеток, показывая, что только в случае вектора для FACS повышается продуктивность клеточных популяций. Окончательное увеличение концентраций продукта может составить от 4- до 30-кратного.

Для сравнения пригодности обоих векторов для селективного клонирования подвергают селективному сортированию с помощью проточной цитометрии клоны со сравнимой продуктивностью из необогащенных пулов. После этого анализируют продуктивность клонов в периодических культурах в 24-ячеечных планшетах. Обнаруживается, что клоны, полученные из пулов, трансфицированных вектором для FACS характеризуются более высоким уровнем экспрессии, чем клоны из пулов, трансфицированных стандартным вектором. Распределение клонов по продуктивности демонстрирует, что в случае вектора для FACS получают большее число клонов с хорошей продуктивностью (см. таблицу 5):

Таблица 5

Сравнение результатов со стандартным вектором и вектором для FACS (pNT29)							
Способ	0-50 мг/л	51-100 мг/л	101-150 мг/л	151-200 мг/л	201-250 мг/л	251-300 мг/л	301-350 мг/мл
Стандартный вектор	31	7	0	2	0	1	0
Вектор для FACS	21	20	4	4	4	2	1

Пример 10: Дополнительное сопоставление вектора для FACS и стандартных экспрессионных векторов

а) Конструкция вектора

Векторы pBW201, pNT11, pBW478 и pNT29 получают так, как это описано в примере 1.

б) Трансфекция, селекция и клонирование клеток CHO

Осуществляют так, как это описано в примере 2.

в) Анализ с применением FACS, обогащение и клонирование клеток

Осуществляют так, как это описано в примере 3.

г) Определение продуктивности по антителу и стабильности клонов

Продуктивность клонов и пулов анализируют в опытах с периодическими культурами и с периодическими культурами с подпиткой в различных форматах. Пулы до и после обогачения с помощью FACS анализируют на периодических культурах во встряхиваемых колбах, осуществляя посев 1×10^5 клеток на миллилитр (клеток/мл) в рабочем объеме 50 мл, используя 250 мл встряхиваемые колбы. Содержание IgG анализируют с помощью ВЭЖХ с А-белком для образцов, взятых на 13 сутки культивирования в периодических культурах. Начальный скрининг клонов осуществляют в 24-ячеечных планшетах, осуществляя посев клеток во встряхиваемые 24-ячеечные планшеты. Концентрации антитела в надосадочной жидкости клеточной культуры определяют с помощью количественной ВЭЖХ с А-белком через 10 суток после начала культивирования. Наиболее продуктивные клоны анализируют во встряхиваемых колбах в режимах периодических культур и периодических культур с подпиткой. Осуществляют посев периодических культур во встряхиваемые колбы (емкостью 500 мл) при рабочем объеме 100 мл и проводят культивирование в камере для встряхивания (без увлажнения) при 150 об/мин, $36,5^\circ\text{C}$ и 10% CO_2 . Выживаемость клеток в начале анализа составляет $>90\%$. Плотность посева клеток составляет 2×10^5 клеток/мл. Определение концентрации антитела, числа клеток и жизнеспособности определяют на 3-7, 10 и 13 сутки. Опыты в режиме периодических культур с подпиткой осуществляют в тех же условиях, но с длительностью 17 суток с начальной плотностью клеток 4×10^5 клеток/мл и при регулярной подпитке, начиная с плотности жизнеспособных клеток 7×10^6 клеток/мл. Стабильность клонов оценивают посредством культивирования клеток в продолжение 12 недель с измерениями продуктивности каждые две недели в варианте со встряхиваемой колбой в режиме периодических культур.

д) Анализ и обогачение стабильно трансфицированных клеток

Анализируют поверхностную экспрессию в стабильно трансфицированных клеточных популяциях, чтобы выяснить, возможно ли селективно обогащать высокопродуктивные клетки посредством сортировки с применением FACS. Для этого осуществляют селекцию клеток после трансфекции в присутствии G418, а затем в присутствии МТК. Получаемые таким образом пулы (10 на каждый вектор) резистентных клеток окрашивают, как это описано выше, и анализируют посредством проточной цитометрии. С задействованной методикой окрашивания меченые субпопуляции клеток могут быть обнаружены в клеточных пулах, трансфицированных как pBW478 так и pNT29. Как и ожидалось, более высокое количество FACS-положительных клеток обнаруживается там, где применялся вектор для FACS.

Для оценки того, могут ли быть обогащены высокопродуктивные клетки, на основе их флуоресцентного сигнала, клетки с наивысшей интенсивностью флуоресценции (верхние 5%) из каждого из двух пулов подвергают сортировке и суб-культивируют для сравнения продуктивности с пулом до обогачения. Второй цикл обогачения осуществляют после разрастания и формирования пула уже однажды подвергнутых сортировке клеточных популяций. Процент окрашенных клеток, неожиданно, более всего увеличивается там, где при первом обогачении использовался стандартный вектор. Пулы, трансфицированные вектором для FACS, демонстрируют при данной методике окрашивания сходные кратности обогачения и, как правило, наблюдаются существенные вариации от пула к пулу. После второго цикла обогачения получают

практически гомогенные популяции FACS-положительных клеток (см. таблицы ба и бб).

Таблицы ба и бб: Средние результаты окрашивания и продуктивности до и после сортировки

5

Таблица ба						
Анализ окрашенных клеток с применением FACS до и после циклов обогащения посредством FACS						
% клеток с уровнем окрашивания FITC выше фонового	pBW478 (вектор сравнения)			pNT29 (вектор для FACS)		
	без FACS	1× FACS	2× FACS	без FACS	1× FACS	2× FACS
среднее	5,9	83,2	90,4	14,2	46,6	90,5
стандартное отклонение	3,396403	15,80158	1,126795	8,974284	13,51148	1,422439

10

Таблица ба: подвергнутые трансфекции и селекции пулы окрашивают для обнаружения поверхностного IgG. Представлен средний процент клеток, окрашенных выше уровня нетрансфицированных клеток. До обогащения наблюдается более высокий процент окрашенных клеток в случае вектора для FACS. После первого цикла обогащения 5% наиболее окрашенных клеток доля окрашенных клеток оказывается больше для стандартного вектора. После второго цикла обогащения в обоих подходах оказываются окрашены более 90% всех клеток.

20

Таблица бб						
Продуктивность до и после обогащения посредством FACS в опытах на периодических культурах во встряхиваемых колбах						
mAb (мг/л)	pBW478 (вектор сравнения)			pNT29 (вектор для FACS)		
	без FACS	1× FACS	2× FACS	без FACS	1× FACS	2× FACS
среднее	38,5	123,4	68,3	46,5	171,8	363
стандартное отклонение	17,66509	101,8563	6,592926	15,30614	114,1936	70,19259

25

Таблица бб: продуктивность клеточных пулов анализируют из опытов на периодических культурах во встряхиваемых колбах с помощью ВЭЖХ с А-белком на 13 сутки. Первый цикл обогащения приводит к существенному росту продуктивности в обоих случаях. После второго цикла обогащения только для пулов, трансфицированных вектором для FACS наблюдается дополнительное увеличение продуктивности.

30

е) Анализ продуктивности обогащенных и необогащенных клеток

Анализ продуктивности подвергнутых селекции пулов до и после обогащения с помощью проточной цитометрии осуществляют на периодических культурах во встряхиваемых колбах, сравнивая конечные титры на 13 сутки. Продуктивность пулов до обогащения находится в сопоставимом диапазоне для обоих задействованных векторов. После первого цикла обогащения индивидуальных пулов достигается существенное улучшение средней продуктивности для всех подходов, причем снова наблюдаются существенные отклонения между индивидуальными пулами (см. таблицу бб). Неожиданным образом, продуктивность пулов, трансфицированных стандартным вектором оказывается не выше, чем у трансфицированных вектором для FACS, несмотря на наблюдение до этого гораздо более высокого уровня FACS-положительных клеток. После второго цикла сортировки из пулов подвергнутых сортировке клеточных популяций в случае стандартного вектора уже не наблюдается дополнительного улучшения продуктивности. Напротив, наблюдается более низкая продуктивность, несмотря на то, что результаты окрашивания в методе FACS свидетельствуют о том, что почти 100% клеток должны вырабатывать антитело (см. таблицу ба). Продуктивность пулов,

45

трансфицированных вектором для FACS может быть существенно улучшена в результате второго цикла сортировки. Задействованный способ на основе FACS приводит к более селективному обогащению высокопродуктивных клеток с не менее чем восьмикратным ростом продуктивности по сравнению с популяцией до сортировки и не менее чем

двукратным по сравнению с пулами после одного цикла сортировки.

ж) Селективное клонирование высокопродуктивных клеток на основе проточной цитометрии

Для сортировки и посева индивидуальных окрашенных клеток согласно их профилю окрашивания может быть применена проточная цитометрия. Для выяснения того, может ли подобное селекционное клонирование обеспечить большее число высокопродуктивных клонов при применении вектора для FACS по сравнению со стандартным вектором, получают клоны с помощью обоих способов и анализируют продуктивность на периодических культурах в 24-ячеечных планшетах.

На первом этапе клетки непосредственным образом клонируют с применением FACS из клеточных пулов, подвергнутых селекции в присутствии МТК без предварительного обогащения. Отбирают по три клеточных пула на каждый вектор на основе их профиля окрашивания. Клоны генерируют из 5% наиболее окрашенных клеток из подвергнутых окрашиванию клеточных пулов, анализируя всего около 500 клонов. Тогда как средняя продуктивность клонов с вектором сравнения составляет 39 мг/л, продуктивность клоны с вектором для FACS в среднем составляет 87 мг/л. Как показано в таблице 7а, это также отражается в распределении клонов, подтверждающем, что более высокую долю высокопродуктивных клонов получают с вектором для FACS. Интересно отметить, что один из более чем 270 проанализированных клонов, трансфицированных стандартным вектором, демонстрирует почти в 2 раза большую продуктивность по сравнению с остальными. Этот исключительный клон получил обозначение LP. Таким образом, оказывается в целом возможным выявление подобного высокопродуктивного клеточного клона в варианте со стандартным вектором в сочетании с процедурой скрининга с применением FACS. Однако подобное событие очень легко и, таким образом, является вопросом удачи. Это также является существенным отличием от способа селекции согласно идеям настоящего изобретения. Тогда как стандартная процедура позволяет осуществить селекцию (очень) высокопродуктивных клонов только в исключительных и, таким образом, редких случаях, способ по настоящему изобретению позволяет осуществить селекцию (очень) высокопродуктивных клонов воспроизводимо и, таким образом, надежно.

Второй опыт по клонированию с применением FACS осуществляют исходя из 10 пулов на каждый вектор, получаемых из популяций после первого цикла обогащения. В этот раз подвергают скринингу примерно 240 клонов в периодических культурах в 24-ячеечных планшетах. И в этом случае клоны, полученные с применением вектора для FACS, демонстрируют гораздо более высокую среднюю продуктивность, чем стандартный вектор сравнения. Для вектора сравнения не обнаружено улучшения по сравнению с клонированием без предварительного обогащения, причем средняя продуктивность клонов составляет 40 мг/л. Клон LP снова не был выявлен. В случае клонов, трансфицированных вектором для FACS, с помощью метода FACS была достигнута средняя продуктивность клонов 275 мг/л. Распределение клонов четко демонстрирует преимущество методики с вектором для FACS в отношении селективного клонирования высокопроизводительных клонов (см. таблицу 7б).

Таблицы 7а и 7б: Сопоставление продуктивности клонов

Таблица 7а

Распределение клонов в опытах с периодическими культурами в 24-ячеечных планшетах		
	pBW478	pNT29
0-50 мг/л	196	163
51-100 мг/л	70	22
101-150 мг/л	8	11
151-200 мг/л	2	5
201-250 мг/л	0	13
251-300 мг/л	2	9
301-350 мг/л	1	10
351-400 мг/л	0	6
401-450 мг/л	0	5
451-500 мг/л	0	2
501-550 мг/л	0	1
551-600 мг/л	1	0

Таблица 7а: Клоны получают с помощью проточной цитометрии из 5% наиболее интенсивно окрашенных клеток из трех подвергнутых окрашиванию пулов с наиболее высоким процентом окрашенных клеток после селекции. Для анализа продуктивности проводят опыты в периодических культурах в 24-ячеечных планшетах, собирают на 10 сутки надосадочную жидкость и измеряют содержание IgG посредством ВЭЖХ с А-белком. Представлены распределения клонов по диапазонам продуктивности. Существенно более высокая доля высокопродуктивных клонов достигается при применении вектора для FACS (pNT29).

Таблица 7б Опыты на периодических культурах в 24-ячеечных планшетах для пулов, из пулов, полученных посредством клонирования с использованием FACS		
	pBW478	pNT29
0-50 мг/л	102	22
51-100 мг/л	17	2
101-150 мг/л	13	5
151-200 мг/л	5	3
201-250 мг/л	2	7
251-300 мг/л	0	11

	pBW478	pNT29
301-350 мг/л	0	11
351-400 мг/л	0	15
401-450 мг/л	0	9
451-500 мг/л	0	7
501-550 мг/л	0	7
551-600 мг/л	0	1
601-650 мг/л	0	3

Таблица 7б: Анализируют клоны, полученные в результате клонирования с использованием FACS из 5% наиболее интенсивно окрашенных клеток из подвергнутых окрашиванию объединенных пулов после одного цикла обогащения. Положительного эффекта от предварительного обогащения для клеток, трансфицированных вектором сравнения (pBW478), не обнаруживается, тогда как в случае клеток, трансфицированных вектором для FACS (pNT29), предварительное обогащение приводит к существенному снижению количества непродуктивных клеток и к повышению средней продуктивности клонов.

з) Характеристика клонов

Клон LP, полученный с использованием стандартного вектора, равно как и 10 наиболее продуктивных клонов, полученных с использованием вектора для FACS,

переносят для разрастания во встряхиваемые колбы и исследуют с помощью базовых моделей на периодических культурах и периодических культурах с подпиткой во встряхиваемых колбах с целью оценки их производственного потенциала.

Обнаруживаемая продуктивность в периодических культурах оказывается примерно одинаковой для всех исследуемых клонов, имея порядок 1 г/л. Величины продуктивности в периодических культурах с подпиткой также сопоставимы для всех клонов лежат в диапазоне 3,5-4 г/л (см. таблицу 8). Не обнаруживается существенных различий в параметрах роста при сопоставлении клонов, трансфицированных вектором для FACS с клонами, трансфицированными вектором сравнения (LP и клоны из предыдущих опытов). Кроме того, отмечается высокая стабильность продуктивности для клонов, производных от вектора для FACS, причем лишь один из 10 анализируемых клонов демонстрирует снижение продуктивности более чем на 25% по прошествии 12 недель культивирования, каковая доля нестабильных клонов ниже наблюдаемой со стандартным вектором сравнения в предшествующих экспериментах (данные не приведены).

	mAb (г/л)	
	периодическая культура, ВК	периодическая культура с подпиткой, ВК
1 = LP	1.1	4,3
2	0.9	3,7
3	1.0	3,9
4	1,0	3,8
5	1,0	3,8
6	1,0	3,9
7	1,2	3,3
8	1,0	3,8
9	0,9	3,6
10	1,0	3,7
11	0,9	3,3

Таблица 8: Наиболее продуктивный клон, полученный с использованием стандартного вектора (pBW478) и 10 клонов, производных от вектора для FACS (pNT29), анализируют на периодических культурах и периодических культурах с подпиткой во встряхиваемых колбах. Содержание анализируют с помощью ВЭЖХ с А-белком на 13 сутки (периодические культуры) или 17 сутки (периодические культуры с подпиткой). Продуктивность всех анализируемых клонов находится на сопоставимом уровне.

Пример 11: Крупномасштабное производство полипептидов с помощью трансфицированных клеток СНО

Крупномасштабное производство полипептидов может быть осуществлено, например, в волновых или стеклянных биореакторах или биореакторах из нержавеющей стали. Для этой цели клеткам дают разрастись, исходя, обычно, из одного замороженного флакона, например, флакона из главного банка клеток. Клетки оттаивают и проводят через несколько стадий разрастания. В биореакторы различных масштабов помещают соответствующие количества клеток. Плотность клеток может быть повышена посредством добавления в биореакторы питательных растворов и добавок. Клетки выдерживают в условиях высокой жизнеспособности в течение продолжительного времени. При крупномасштабных опытах достигают концентрации продуктов в реакторе в пределах от нескольких сотен миллиграмм на литр до нескольких граммов на литр. Очистку осуществляют с помощью стандартных хроматографических подходов, которые могут включать стадии аффинной, ионообменной, гидрофобной или

экслюзивной хроматографии. Размер биореактора может достигать нескольких тысяч литров в объеме для конечных масштабов (см., например, также F. Wurm, Nature Biotechnology т.22, 11, 2004, 1393-1398).

Формула изобретения

1. Способ селекции по меньшей мере одной эукариотической клетки-хозяина, экспрессирующей желаемый уровень интересующего полипептида, включающий:

а) трансфекцию эукариотических клеток с получением клеток-хозяев, содержащих гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую по меньшей мере одну кассету, содержащую по меньшей мере первый полинуклеотид, кодирующий интересующий полипептид, по меньшей мере один стоп-кодон, расположенный по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида, а также второй полинуклеотид, расположенный по направлению экспрессии относительно стоп-кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант;

б) культивирование эукариотических клеток-хозяев для экспрессии интересующего полипептида таким образом, чтобы по меньшей мере часть рассматриваемого полипептида экспрессировалась в виде слитого полипептида, содержащего иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, причем такой слитый полипептид экспонируется на поверхности указанной клетки-хозяина;

в) селекцию по меньшей мере одной эукариотической клетки-хозяина по наличию или количеству слитого полипептида, экспонируемого на клеточной поверхности.

2. Способ рекомбинантного получения интересующего полипептида, который включает:

а) трансфекцию эукариотических клеток с получением эукариотических клеток-хозяев, содержащих гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую по меньшей мере одну кассету, содержащую по меньшей мере первый полинуклеотид, кодирующий интересующий полипептид, по меньшей мере один стоп-кодон, расположенный по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида, а также второй полинуклеотид, расположенный по направлению экспрессии относительно стоп-кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант;

б) культивирование эукариотических клеток-хозяев с целью экспрессии интересующего полипептида таким образом, чтобы по меньшей мере часть интересующего полипептида экспрессировалась в виде слитого полипептида, включающего иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант, причем указанный гибридный полипептид экспонирован на поверхности клетки-хозяина;

в) селекцию по меньшей мере одной эукариотической клетки-хозяина по наличию или количеству слитого полипептида, экспонируемого на клеточной поверхности;

г) культивирование отобранной эукариотической клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию интересующего полипептида.

3. Способ по п.1 или 2, в котором экспрессия кассеты дает транскрипт, содержащий по крайней мере

- первый полинуклеотид, причем трансляция указанного первого полинуклеотида дает интересующий полипептид;

- по меньшей мере один стоп-кодон, расположенный по направлению экспрессии

относительно указанного первого полинуклеотида;

- второй полинуклеотид, расположенный по направлению экспрессии относительно указанного стоп-кодона, причем трансляция указанного второго полинуклеотида дает иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант,

где по меньшей мере часть транскрипта транслируется в слитый полипептид, содержащий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант в результате трансляционного пропуска по меньшей мере одного стоп-кодона.

4. Способ по п.1 или 2, в котором иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен выбран из группы, состоящей из

а) трансмембранного якоря, полученного из IgA, IgE, IgM, IgG и/или IgD,

б) иммуноглобулинового трансмембранного якорного домена, содержащего цитоплазматический домен,

в) иммуноглобулинового трансмембранного якорного домена, содержащего последовательность SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 и/или SEQ ID NO:7, и

г) функциональных вариантов вышеуказанного, которые обеспечивают закрепление слитого полипептида на поверхности эукариотической клетки-хозяина.

5. Способ по п.1 или 2, в котором стадия в) включает приведение в контакт эукариотических клеток-хозяев с соединением для детекции, которое связывается со слитым белком, и селекцию по меньшей мере одной эукариотической клетки-хозяина на основании присутствия или количества связанного соединения для детекции.

6. Способ по п.3, в котором пропуск стоп-кодона приводит к получению $\leq 50\%$, $\leq 25\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2,5\%$, $\leq 1,5\%$, $\leq 1\%$ или менее $0,5\%$ слитого полипептида.

7. Способ по п.1 или 2, в котором осуществляют два или более цикла селекции, причем на каждом цикле осуществляют селекцию по меньшей мере одной эукариотической клетки-хозяина по наличию или количеству слитого полипептида, экспонированного на клеточной поверхности.

8. Способ по п.5, в котором связывание соединения для детекции с поверхностью эукариотической клетки-хозяина определяется с помощью проточной цитометрии.

9. Вектор для рекомбинантной экспрессии по меньшей мере одного интересующего полипептида в эукариотической клетке-хозяине, содержащий

а) по меньшей мере одну кассету, содержащую сайт встраивания для первого полинуклеотида, кодирующего интересующий полипептид, и/или первый полинуклеотид, кодирующий интересующий полипептид,

б) по меньшей мере один стоп-кодон по направлению экспрессии относительно указанного сайта встраивания и/или по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида, и

в) второй полинуклеотид по направлению экспрессии относительно стоп-кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант.

10. Вектор по п.9, содержащий по меньшей мере одну из нижеперечисленных характеристик:

- первый полинуклеотид, кодирующий интересующий полипептид, в кассете (Cas-POI);

- экспрессионную кассету, содержащую селектируемый маркерный ген млекопитающего; и/или

- экспрессионную кассету, содержащую амплифицируемый селективируемый маркерный ген млекопитающего.

11. Вектор по п.9 или 10 для экспрессии по меньшей мере одной молекулы иммуноглобулина или ее функционального варианта, содержащий

5 - экспрессионную кассету, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь молекулы иммуноглобулина или его функциональный фрагмент, по меньшей мере один стоп-кодон по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида, и второй полинуклеотид по направлению экспрессии относительно стоп-кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен
10 или его функциональный вариант; и

- дополнительную экспрессионную кассету, включающую полинуклеотид, кодирующий соответствующую легкую цепь молекулы иммуноглобулина или ее функциональный фрагмент.

12. Способ получения вектора по п.9 или 10, который включает сборку по меньшей
15 мере одной кассеты в векторе таким образом, что упомянутая кассета содержит первый полинуклеотид, кодирующий интересующий полипептид, по меньшей мере один стоп-кодон по направлению экспрессии относительно первого полинуклеотида, и второй полинуклеотид по направлению экспрессии относительно стоп-кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный
20 вариант.

13. Эукариотическая клетка-хозяин для рекомбинантного получения интересующего полипептида, имеющая по меньшей мере одну из следующих характеристик:

а) получена способом по п.1;

б) содержит кассету, содержащую по крайней мере гетерологичный полинуклеотид,
25 кодирующий интересующий полипептид, по меньшей мере один стоп-кодон, расположенный по направлению экспрессии относительно указанного гетерологичного полинуклеотида, и полинуклеотид по направлению экспрессии относительно стоп-кодона, кодирующий иммуноглобулиновый трансмембранный якорный домен или его функциональный вариант; и/или

30 с) содержит вектор по любому из пп.9 или 10.

14. Способ рекомбинантного получения интересующего полипептида, в котором для экспрессии интересующего полипептида культивируют эукариотическую клетку-хозяин по п.13.

15. Способ получения интересующего полипептида по любому из пп.2 или 14, в
35 котором осуществляют по меньшей мере одну из следующих стадий:

- получают полипептид из клеточной культуры;

- полипептид секретируется в культуральную среду, и его получают из культуральной среды;

40 - эукариотические клетки-хозяева разрушают с получением экспрессируемого полипептида;

- экспрессируемый полипептид выделяют;

- экспрессируемый полипептид очищают; и/или

- экспрессируемый полипептид дополнительно обрабатывают и/или модифицируют.

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Новартис АГ
 <120> Экспрессионная система
 <130> 50 858 К
 <150> EP08163161.6
 <151> 2008-08-28
 <160> 7
 <170> PatentIn версия 3.5
 <210> 1
 <211> 219
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> полинуклеотидная последовательность трансмембранного домена человеческого IgG1, включая спейсер
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(7)
 <223> Спейсер, включая терминирующий кодон
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> Терминирующий кодон
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(6)
 <223> Дополнительный кодон, опосредующий «ненадежность» терминирующего кодона, расположенного относительно него против направления экспрессии
 <400> 1
 tgactagagc tgcaactgga ggagagctgt gcggagggcg aggacgggga gctggacggg 60
 ctgtggacga ccataccat cttcatcaca ctcttctgt taagcgtgtg ctacagtgcc 120
 accgtcacct tcttcaagggt gaagtggatc ttctctcgg tggtaggacct gaagcagacc 180
 atcatccccg actacagga catgatcggg cagggggccc 219
 <210> 2
 <211> 25
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептидная последовательность предполагаемой трансмембранной области, производной от трансмембранного домена человеческого IgG1
 <400> 2
 Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Thr Leu Phe Leu Leu Ser Val
 1 5 10 15
 Cys Tyr Ser Ala Thr Val Thr Phe Phe
 20 25
 <210> 3
 <211> 73
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Полипептидная последовательность трансмембранной области Ig, производной от трансмембранного домена области человеческого IgG1, включающая аминокислоты, производные от терминирующего кодона и соседнего кодона, соединительную область и предполагаемую трансмембранную область

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> Аминокислоты, с наибольшей вероятностью задействуемые при прочитывании терминирующего кодона TGA и кодона, расположенного по направлению экспрессии

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(20)

<223> Предполагаемая соединительная область, производная от трансмембранного домена человеческого IgG1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(45)

<223> Предполагаемая трансмембранная область, производная от трансмембранного домена человеческого IgG1, каковая область может также считаться включающей две следующие аминокислоты

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(73)

<223> Предполагаемая цитоплазматическая область, производная от человеческого IgG1, первые две аминокислоты которой могут также считаться относящимися к трансмембранному домену

<400> 3

Trp Leu Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Cys Ala Glu Ala Gln Asp Gly
1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Thr Leu Phe
20 25 30

Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Thr Val Thr Phe Phe Lys Val Lys
35 40 45

Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Asp Leu Lys Gln Thr Ile Ile Pro Asp
50 55 60

Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
65 70

<210> 4

<211> 28

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Цитоплазматическая область, производная от трансмембранного домена человеческого IgG1

<400> 4

Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Asp Leu Lys Gln Thr Ile
1 5 10 15

RU 2 528 858 C2

Ile Pro Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
 20 25

<210> 5
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Соединительная область, производная от трансмембранного домена человеческого IgG1

<400> 5

Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Cys Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu
 1 5 10 15

Asp Gly

<210> 6
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Цитоплазматическая область, производная от трансмембранного домена человеческого IgG1

<400> 6

Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Asp Leu Lys Gln Thr Ile Ile Pro
 1 5 10 15

Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
 20 25

<210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептидная последовательность предполагаемой трансмембранной области, производной от трансмембранного домена человеческого IgG1

<400> 7

Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Thr Leu Phe Leu Leu Ser Val
 1 5 10 15

Cys Tyr Ser Ala Thr Val Thr Phe Phe Lys Val
 20 25