

(19)



(10) **LT 5354 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **5354** (51) Int. Cl. (2006): **C12N 5/00**
C12P 21/08
- (21) Paraiškos numeris: **2005 053**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2005 05 19**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2006 04 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2006 07 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: **—**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/CU2003/000012**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2003 10 22**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2005 05 19**
- (30) Prioritetas: **239/2002, 2002 10 23, CU**
- (72) Išradėjas:
Rolando PEREZ RODRIGUEZ, CU
Adolfo CASTILLO VITLLOCH, CU
Svieta VITORES SARAZOLA, CU
Tammy BOGGIANO AYO, CU
Luis ROJAS DEL CALVO, CU
- (73) Patento savininkas:
CENTRO DE IMMUNOLOGIA MOLECULAR, Calle 216 Esq., 15, Atabey, Playa.,
12100 Ciudad de la Habana, CU
- (74) Patentinis patikėtinis:
Marius JAKULIS - JASON, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B,
Biurų centras Victoria, LT-01112 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Ląstelių linijų išskyrimo baltymų neturinčioje terpėje būdas ir šiuo būdu
išskirtos ląstelių linijos

- (57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su žinduolių ląstelių linijų, kurios yra prisitaikę augti serumo ir baltymų neturinčioje terpėje, gavimo būdu. Išradimo būdas apima procesą, susidedantį iš dviejų prisitaikymo pakopų, apimančių kritinės baltymų koncentracijos intervalą, kuriame ląstelės privalo išsiugdyti sugebėjimą išgyventi baltymų neturinčioje terpėje. Kiekvienai ląstelių linijai yra specifinis kritinės baltymų koncentracijos intervalas. Išradimas taip pat susijęs su žinduolių ląstelių linijomis, kurios stabiliai auga serumo ir baltymų neturinčioje terpėje mažiausiai iki

Išradimo sritis

Šis išradimas susijęs su biotechnologija, konkrečiai su būdu, siekiančiu stabilius ląstelių klonus pritaikyti terpei, neturinčiai serumo arba baltymų pagal dviejų stadijų prisitaikymo procesą.

Išradimo prielaida:

Žinduolių ląstelių auginimo *in vitro* vystymosi reikalavimas dideliu mastu priklauso nuo šių ląstelių daugumos gaminamų produktų diagnostinio ir terapinio potencialo. Šie naudingi agentai apima monokloninius antikūnus, žmogaus augimo hormonus, limfokinus, eritropoetina, kraujo krešėjimo faktorius ir audinių plazminogeno aktyvatorius.

Rekombinantinių monokloninių antikūnų (rMab) panaudojimas įvairių ligų gydymui ir diagnozei *in vivo* daugumoje atvejų reiškia didelių dozių gydymą. Šis faktas daro būtiną didelių kiekių labai aukšto švarumo norimų rMab gamybą.

Kai kurie rekombinantiniai monokloniniai antikūnai, kurie potencialiai gali būti naudojami vėžio ir autoimuninių ligų gydymui bei diagnostikai buvo ekspresuojami Molekulinės imunologijos centre. US 5,891,996 aprašo išskyrimą chimerinių ir humanizuotų antikūnų prieš epidermio augimo faktoriaus receptorių (EGF-R), naudojamų diagnozei ir gydymui navikų, ekspresuojamų minėto receptoriaus. WO 97/19111 aprašo anti-CD6 monokloninius antikūnus, naudojamus diagnozavimui ir gydymui pacientų, kenčiančių nuo psoriazės. Gavilondo ir kt. Hibridoma 9, Nr.5, 1999 pristato anti-CD3 monoklononį antikūną pavadintą IOR-T3a.

Buvo sukurtos įvairios metodikos auginimui baltymų neturinčioje terpėje. Tokiu būdu, ypatingai išsiskiria pilnai neturinti baltymų terpė, kuri buvo sukurta kaip sudaranti sąlygas ląstelių augimui, nesant baltymų.

WO 91/05240 aprašo rekombinantinių baltymų ekspresiją tokiomis sąlygomis, kai nėra baltymų.

JP 2696001 aprašo baltymų neturinčios terpės panaudojimą VIII faktoriaus gavimui CHO ląstelėse, pridėdant nejoninio paviršinio aktyvaus agento ciklodekstrino, kad būtų sumažintas ląstelių-šeimininkų produktyvumas. Kad būtų sumažintas šių priedų efektyvumas, rekomenduojama pridėti, pavyzdžiui, butirato ir ličio.

WO 96/26266 aprašo ląstelių auginimą terpėje, kuri turi baltymų hidrolizatą su gliutaminu, kurio laisvų aminorūgščių kiekis yra mažiau negu 15 % bendro baltymų svorio ir kurių peptidų molekulinis svoris yra mažesnis negu 44 kD. Pavyzdžiui, augimo terpė ląstelių kultūroms naudojama sintetinė minimali terpė kaip bazinė terpė, į kurią prie baltymų hidrolizato papildomai, be kita ko, pridedama fetalinio veršelių serumo, gentamicino ir merkaptoetanolio. Šios serumo turinčios terpės panaudojimas kraujo faktorių rekombinantiniam gavimui neminimas.

U.S. patentas No. 5,393,668 A aprašo specialų sintetinį paviršių, kuris leidžia augti adherentinėms ląstelėms, nesant baltymų.

Kad būtų stimuliuojama ląstelių proliferacija, CHO ląstelės, kurios superekspresuoja žmogaus insuliną, buvo išdaugintos dirbtiniame substrate, su kuriuo insulinas yra surištas kovalentiškai (Ito ir kt. 1996 PNAS U.S.A. 93:3598-3601).

Reiter ir kt. (1992. Cytotechnology 9:247-253) aprašo r-CHO ląstelių imobilizaciją, pirma užaugintų terpėje su serumu iki aukšto tankio ant nešėjo, ir vėlesnę imobilizuotų ląstelių perfuziją į baltymų neturinčią terpę, produkcijos fazės metu, kurioje buvo rastas nenutrūksamas baltymo atpalaidavimas į ląstelių kultūros supernatantą. Taip ląstelės buvo palaikomos mažiau negu 10 generacijų baltymų neturinčioje terpėje.

Ląstelių kultūrų sėkmingo paruošimo dideliu mastu ankstesni metodai baltymų neturinčioje terpėje buvo aprašyti nenutrūkstamoms ląstelių linijoms; dalinai VERO ląstelėms (WO 96/15231). Taigi, ląstelės augo nuo pradinės ampulės iki didelio techninio masto 1200 litrų.

Pritaikyti ląstelės augti nuo sąlygų, kai yra serumo, prie baltymų neturinčios terpės, yra nepaprastai varginantis procesas, kuris paprastai reikalauja ilgo laiko; be to pakartotinai buvo randama, kad ekspresuojamo baltymo išeiga ir rekombinantinių CHO ląstelių produktyvumas žymiai krenta po prisitaikymo baltymų neturinčioje terpėje, palyginus su sąlygomis, kai terpėje yra serumo (Peterson ir kt. 1994. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:691-658). Tai yra rekombinantinių klonų nestabilumo arba sumažėjusio augimo dėl pasikeitusių augimo sąlygų padarinys. Nepaisant stabilių pradinių klonų naudojimo, dėl pasikeitusių fermentacijos sąlygų, pakartotinai didelė porcija ląstelių tapo ląstelėmis su sumažėjusia ekspresija arba netgi neprodukoriais, kurie perauga produkto gamintojus produkcijos metu, kada fermentatoriaus kultūra galiausiai žymia dalimi susideda iš neprodukoriaus arba iš ląstelių, turinčių žemą ekspresiją.

Šiame išradime mes sudarėme prielaidą sukurti stabilias ląstelių linijas, pritaikytas serumo ir baltymų neturinčiai terpei. Šiuo būdu baltymų neturinčioje terpėje buvo išskirta keletas klonų.

Detalus išradimo aprašymas

Ląstelių linijų dviejų pakopų prisitaikymas prie baltymų neturinčios terpės.

Ši procedūra apima žinduolių ląstelių linijas, su kuriomis neįmanoma atlikti tiesioginės prisitaikymo procedūros iš terpės papildytos serumu arba neturinčios serumo terpės į baltymų neturinčią terpę.

Šio išradimo metodas susideda iš dviejų pakopų proceso, kurio metu ląstelių linijos prisitaiko prie baltymų neturinčios terpės (PFM).

Pirmoji pakopa, kuri manoma yra ne lemiamą pakopa: baltymo kiekio mažėjimas vykstantis neprarandant ląstelės gyvybingumo ir tai yra nežymus sumažėjimas per populiacijos padvigubėjimo laiką kiekvienoje baltymų koncentracijos pakopoje. Nekritinė stadija stebima dažniausiai tarp 5 ir 0,5 mg/ml nuo bendros baltymų koncentracijos augimo terpėje ir kultūra dažniausiai rodo tą patį augimo greitį, kaip ir pradinėje augimo terpėje.

Ši pirmoji pakopa startuoja esant ląstelių gyvybingumui tarp 80 ir 100 % ir ląstelės auginamos augimo terpėje su nuosekliu baltymų koncentracijos mažėjimu iki kritinės baltymų koncentracijos, kuriai esant ląstelių gyvybingumas krenta iki 0 %. Ši baltymų koncentracija yra starto taškas sekančiai pakopai.

Antroji pakopa, kuri manoma yra kritinė: šioje pakopoje įvyksta ląstelių gyvybingumo ir ląstelių populiacijos dvigubėjimo laiko mažėjimas ir reikia daugiau laiko prisitaikyti nuo vienos baltymų koncentracijos prie kitos. Egzistuoja kritinės baltymų koncentracijos auginimo terpėje, kurių negalima išvengti prisitaikymo proceso metu. Šios kritinės baltymų koncentracijos yra specifinės kiekvienai rekombinantinei ląstelių linijai, bet dažniausiai yra žemiau 0,6 mg/ml. Kai tik ląstelės atgauna pradinį gyvybingumą ir augimo greitį šiose kritinėse baltymų koncentracijose, galimas persėjimas išplaukiančiomis sąlygomis su mažesne baltymų koncentracija.

Kai kritinė baltymų koncentracija nustatyta, tai yra beveik aukščiausia baltymų koncentracija, kuri palaiko ląstelių augimą ir laikoma ikikritine baltymų koncentracija. Pradedant nuo ikikritinės baltymų koncentracijos, ji lėtai mažinama iki ląstelės atgaus pradinį gyvybingumą ir augimo greitį.

Pasirinktas baltymų koncentracijos mažinimo iki kritinės stadijos pakopų derinys turėtų apspręsti bendrą prisitaikymo laiką šiame etape ir prisitaikymo koeficientą, kuris apskaičiuojamas kaip santykis:

$$V_{\text{adapt.}} = \frac{\Delta \text{baltymo koncentracija}}{\Delta T_{\text{adapt.}}}$$

Tačiau šios pakopos derinys neturi turėti įtakos laikui, kuris reikalingas prisitaikymui prie kiekvienos baltymų koncentracijos, įskaitant kritines koncentracijas.

Tam, kad būtų nustatyta nekritinės pakopos pabaiga ir kritinė baltymų koncentracija, yra būtina atlikti laipsnišką prisitaikymą, esant įprastiniam ląstelių kultūros praskiedimui terpėje be norimo baltymo, kiekvieną kartą mažinant baltymo koncentraciją du kartus (1 lentelė). Šis mažinimas gali būti atliekamas mažinant serumo koncentraciją arba papildant pagrindinę terpę skirtingu lygiu kokių nors baltymais turtingu serumo pakaitalu.

1 lentelė: Baltymo koncentracijos laipsniškas mažinimas, siekiant nustatyti kritinę koncentraciją, pradedant nuo auginimo terpės, praturtintos 5mg/ml baltymo (10 % fetalinio veršelių serumo ekvivalentas).

Pakopos numeris	Bendra baltymo koncentracija mg/ml	Ekvivalentiška FBS koncentracija* mg/ml
1	5.000	10.00
2	2.500	5.00
3	1.250	2.50
4	0.625	1.25
5	0.312	0.60
6	0.156	0.30
7	0.000	0.00

Legenda: FBS – fetalinis veršelių serumas

PFM – baltymų neturinti terpė

SCM – terpė su serumu

Bendras baltymo kiekis fetaliniame veršelių serume laikomas apie 50 mg/ml.

Prieš pradedant prisitaikymo procedūrą, ląstelės turi būti palaikomos su daugiau negu 80 % gyvybingumu T formos induose standartinėje terpėje paprastai naudojamoje ląstelių auginimui.

Prisitaikymo procesas vykdomas pakopa po pakopos sekančiais, žemiau aprašytais etapais.

i. Užsėjama 3 šulinėliai šešių šulinėlių auginimo plokštelėje rekombinantine ląstelių linija, naudojant standartinę ląstelių auginimo terpę (esant pradinei baltymo koncentracijai). Ląstelių tankis turi būti diapazone nuo 1 iki 5×10^5 ląstelių/ml. Po 48 valandų pusė supernatanto yra pakeičiama šviežia baltymų neturinčia terpe, tokiu būdu padarant galutinę baltymų koncentraciją, kuri yra 50 % pradinės būklės.

ii. Kas 48 valandas supernatantas yra pilnai pakeičiamas šviežia auginimo terpe, kurios baltymų koncentracija yra 50 % pradinės būklės.

iii. Ląstelės auginamos iki susilieimo, esant šiai baltymų koncentracijai.

iv. Ląstelės iš iii pakopos išsėjamos mažiausiai 3 šulinėliuose iki tankio diapazono nuo 1 iki 5×10^5 ląstelių/ml augimo terpėje su baltymo koncentracija, kuri yra 50 % pradinės būklės. Po 48 valandų pusė superatanto pakeičiama šviežia baltymų neturinčia terpe, padarant galinę baltymų koncentraciją, kuri yra 50 % ankstesnės būklės.

v. Kas 48 valandas supernatantas yra pilnai pakeičiamas šviežia auginimo terpe, kurios baltymų koncentracija yra 50 % ankstesnės būklės.

vi. Ląstelės auginamos iki susilieimo, esant šiai baltymų koncentracijai.

vii. Pakopos nuo (iv) iki (vi) kartojamos, kiekvieno ciklo metu baltymų koncentracija sumažinama iki 50 % praėjusio ciklo koncentracijos. Ši procedūra kartojama iki pasiekiamą baltymų koncentracija, kuri sukelia ląstelių mirtį.

viii. Ląstelės išsėjamos iš 80 % gyvybingumo ląstelių kultūros tolimesniam auginimui ikikritinėje baltymų koncentracijoje, mažiausiai 3 šulinėliuose iki tankio diapazono nuo 2 iki 6×10^5 ląstelių/ml. Ląstelės auginamos ikikritinėje baltymų koncentracijoje ir po 48 valandų 25 % supernatanto pakeičiama šviežia baltymų neturinčia terpe, tokiu būdu padarant galutinę baltymų koncentraciją, kuri yra 75 % ikikritinės baltymų koncentracijos.

ix. Kas 48 valandas supernatantas pilnai pakeičiamas šviežia auginimo terpe su 75 % ikikritinės baltymų koncentracijos.

x. Ląstelės auginamos iki susilieimo esant šiai baltymų koncentracijai.

xi. Ląstelės iš (x) pakopos išsėjamos mažiausiai 3 šulinėlius iki tankio diapazono nuo 2 iki 6×10^5 ląstelių/ml augimo terpėje, su baltymų koncentracija, kuri yra 75 % ikikritinės baltymų koncentracijos. Po 48 valandų 25 % supernatanto pakeičiama šviežia terpe, padarant galinę baltymų koncentraciją, kuri yra 75 % ankstesnės būklės.

xii. Kas 48 valandas supernatantas pilnai pakeičiamas šviežia auginimo terpe su baltymų koncentracija, kuri yra 75 % koncentracijos, esančios (x) pakopoje.

xiv. Pakopos nuo (xi) iki (xiii) kartojamos, kiekvieno ciklo metu baltymų koncentracija yra sumažinama iki 75 % ankstesnio ciklo koncentracijos, paskui ši procedūra kartojama iki pasiekiamą baltymų koncentracija, kuri nesukelia ląstelių gyvybingumo praradimo ir nesumažina populiacijos padvigubėjimo laiko. Jeigu ląstelės yra perkeliama į terpę su maža baltymų koncentracija ir jos sugeba augti, neprarandant ląstelių gyvybingumo ir nesumažėjant populiacijos padvigubėjimo laikui iki pirmojo persėjimo, mes galime manyti, kad ląstelės vėl pasiekę nekritinę stadiją ir išsėti jas tiesiogiai į baltymų neturinčią terpę (0 mg/ml baltymų koncentracija).

Šio išradimo metodikoje pradinė augimo terpė turi diapazone tarp 5 ir 10 % fetalinio veršelių serumo.

Žinduolių ląstelių linija pritaikyta augti baltymų neturinčioje terpėje yra mieloma, dalinai NSO ląstelės.

Šis išradimas gali būti naudingas, kai naudojama NSO ląstelių linija, transfekuota polipeptidu ar rekombinantiniu baltymu, dalinai kai jos transfekuojamos seka, koduojančia rekombinantinį antikūną arba jo fragmentą. Žinduolių ląstelių linijos, modifikuotos šio išradimo metodika, auginant baltymų neturinčioje terpėje yra taip pat parodyta.

Kitame šio išradimo įgyvendinime parodyta bet kokia žinduolių ląstelių linija, ekspresuojanti humanizuotą arba chimerinį antikūną, parinktą iš grupės, susidedančios iš anti-EGF hR3 receptoriaus, anti-CD6 T1hT, anti-CD3 T3Q antikūnų arba jų fragmentų, auginamų baltymų neturinčioje terpėje, taigi antikūnai sekretuoti šios ląstelių linijos.

Ląstelių linijos išskirtos pagal šio išradimo metodiką auginamos baltymų neturinčioje terpėje pastoviai mažiausiai iki 40 generacijų.

Pavyzdžiai:

1 pavyzdys: hR3 rekombinantinės ląstelių linijos pritaikymas prie baltymų neturinčios terpės.

hR3 rekombinantinė ląstelių linija buvo gauta transfekuojant mielomos NSO ląstelių liniją su vektoriaus konstrukcija, tam, kad ši linija ekspresuotų humanizuoto anti-EGF žmogaus hR3 receptoriaus monokloninio antikūno lengvąją ir sunkiąją grandines.

Šios ląstelių linijos pritaikymas prie baltymų neturinčios terpės buvo vykdomas pagal anksčiau aprašytą metodiką, baltymų kiekį terpėje mažinant dviem etapais.

Šios ląstelės buvo auginamos RPMI-1640 terpėje, praturtintoje 10 % FBS. FBS buvo pakeista, pridėdant baltymais praturtintą priedą Nutridoma NS (Boheringer Mannheim) į RPMI-1640 baltymų neturinčią terpę, kad baltymų koncentracija būtų 0,15 mg/ml. Baltymo kiekio sumažinimas pradinėje terpėje buvo atliktas sėkmingai praskiedžiant baltymų neturinčia PFHM-II terpe (Gibco). Fig. 1 ir 2 atitinkamai rodo kritinės koncentracijos ir pritaikymo santykio V_{adapt} skaičiavimo rezultatus.

2 pavyzdys: Rekombinantinės ląstelių linijos T1hT pritaikymas prie baltymų neturinčios terpės.

Rekombinantinė ląstelių linija T1hT buvo gauta transfekuojant mielomos NSO ląstelių liniją vektoriaus konstrukcija, tam, kad ši linija ekspresuotų anti-žmonių CD6 monokloninių antikūnų, humanizuotų supresuojant epitopą T, lengvąją ir sunkiąją grandines.

Šios ląstelių linijos prisitaikymas prie terpės su/be baltymų buvo atliktas pagal metodiką, aprašytą 2 punkte, dviem etapais mažinant baltymų kiekį terpėje.

Pradžioje ląstelės buvo auginamos RPMI-1640 terpėje, praturtintoje 10 % FBS. Baltymų kiekio mažinimas buvo atliekamas sėkmingai praskiedžiant pradinę terpę baltymų neturinčia PFHM-II Gibco terpe.

Kritinės koncentracijos ir prisitaikymo santykio V_{adapt} apskaičiavimo rezultatai parodyti atitinkamai 3 ir 4 figūrose.

3 pavyzdys: Rekombinantinės ląstelių linijos T3Q prisitaikymas prie baltymų neturinčios terpės.

Rekombinantinė ląstelių linija T3Q buvo gauta transfekuoiant mielomos NSO ląstelių liniją vektoriaus konstrukcija, tam, kad ši linija ekspresuotų humanizuoto monokloninio antikūno T3Q, kuris atpažįsta žmogaus limfocitų CD3 receptorių, lengvąją ir sunkiąją grandines.

Šios ląstelių linijos prisitaikymas prie terpės su/be baltymų buvo atliktas pagal metodiką, aprašytą 2 punkte, dviem etapais mažinant baltymo kiekį terpėje.

Pradžioje ląstelės buvo auginamos RPMI-1640 terpėje, praturtintoje 10 % FBS. Baltymų kiekio mažinimas buvo atliekamas sėkmingai praskiedžiant pradinę terpę PFHM-II Gibco terpe be baltymų.

Kritinės koncentracijos ir prisitaikymo santykio V_{adapt} apskaičiavimo rezultatai parodyti atitinkamai 5 ir 6 figūrose.

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Fig.1: Koreliacija laiko, reikalingo prisitaikyti hR3 ląstelėms prie kiekvienos baltymų koncentracijos (iki gyvybingumo ir padvigubėjimo laiko atstatymo) su natūriniu logaritmu atvirkštinės baltymų koncentracijos. Kritinės koncentracijos reikšmės h-R3 ląstelių linijai: - 0,32 ir 0,11 mg/ml nuo bendros baltymų koncentracijos.

Fig. 2: Koreliacija bendro laiko nuo adaptacijos procedūros pradžios su h-R3 ląstelių linijos atvirkštinės baltymų koncentracijos natūriniu logaritmu. Prisitaikymo greičio reikšmės h-R3 ląstelių linijai kritinio etapo metu – 0,0053 mg/d.

Fig. 3: Koreliacija laiko, reikalingo prisitaikyti T1hT ląstelėms prie kiekvienos baltymų koncentracijos (iki gyvybingumo ir padvigubėjimo laiko atstatymo) su natūriniu logaritmu atvirkštinės baltymų koncentracijos. Kritinės koncentracijos reikšmės T1hT ląstelių linijai: - 0,12 ir 0,01 mg/ml nuo bendros baltymų koncentracijos.

Fig. 4: Koreliacija bendro laiko nuo adaptacijos procedūros pradžios su T1hT ląstelių linijos atvirkštinės baltymo koncentracijos natūriniu logaritmu. Prisitaikymo greičio reikšmės Th1T ląstelių linijai – 0,0014 mg/d.

Fig. 5: Koreliacija laiko, reikalingo prisitaikyti T3Q ląstelėms prie kiekvienos baltymų koncentracijos (iki gyvybingumo ir padvigubėjimo laiko atstatymo) su natūriniu logaritmu atvirkštinės baltymų koncentracijos. Kritinės koncentracijos reikšmės T3Q ląstelių linijai: - 0,63 mg/ml bendros baltymų koncentracijos.

Fig. 6: Koreliacija bendro laiko nuo adaptacijos procedūros pradžios su T3Q ląstelių linijos atvirkštinės baltymų koncentracijos natūriniu logaritmu. Prisitaikymo greičio reikšmės T3Q ląstelių linijai – 0,0172 mg/d.

Išradimo apibrėžtis

1. Žinduolių ląstelių linijos, pritaikytos augti serumo ir baltymų neturinčioje terpėje, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima du etapus:

I. pirmąjį etapą, kuriame ląstelių linijos gyvybingumas yra tarp 80 ir 100 % ir ląstelės yra auginamos auginimo terpėje su nuosekliu baltymų koncentracijos mažinimu iki kritinės baltymų koncentracijos, kurioje ląstelių gyvybingumas krenta iki 0 %;

II. antrąjį etapą, kuriame kai kritinė koncentracija buvo nustatyta iš anksto, tuomet ikikritinė koncentracija fiksuojama tokia baltymų koncentracija, kurioje ląstelių augimas yra galimas ir tai yra pradžios taškas lėtam baltymų koncentracijos mažinimui iki ląstelių kultūra pasieks pradinį ląstelių gyvybingumą ir populiacijos padvigubėjimo laiką.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirmasis etapas sudarytas iš tokių pakopų:

i. šešių šulinėlių auginimo plokštelėje užsėjami 3 šulinėliai rekombinantine ląstelių linija, naudojant standartinę ląstelių auginimo terpę (su pradine baltymų koncentracija); ląstelių tankis turi būti diapazone nuo 1 iki 5×10^5 ląstelių/ml; po 48 valandų pusė supernatanto pakeičiama šviežia baltymų neturinčia terpe, taip padarant galinę baltymų koncentraciją, kuri yra 50 % pradinės būklės;

ii. kas 48 valandas supernatantas pilnai pakeičiamas šviežia auginimo terpe, kurios baltymų koncentracija yra 50 % pradinės būklės;

iii. esant šiai baltymų koncentracijai, ląstelės auginamos iki susiliejo;

iv. ląstelės iš pirmo etapo išsėjamos mažiausiai į 3 šulinėlius tankio diapazone nuo 1 iki 5×10^5 ląstelių/ml auginimo terpėje su baltymų koncentracija, kuri yra 50 % pradinės būklės; po 48 valandų pusė supernatanto pakeičiama šviežia baltymų neturinčia terpe, taip padarant galinę baltymų koncentraciją, kuri yra 50 % buvusios būklės;

v. kas 48 valandas supernatantas pilnai pakeičiamas šviežia auginimo terpe, kurios baltymų koncentracija yra 50 % buvusios būklės;

vi. esant šiai baltymų koncentracijai, ląstelės auginamos iki susiliejo;

vii. pakopos nuo (iv) iki (vi) kartojamos, kiekvieno ciklo metu baltymų koncentracija sumažinama iki 50 % buvusio ciklo koncentracijos, ir ši procedūra kartojama, iki pasiekiamas baltymų koncentracija, kuri iššaukia ląstelių mirtį.

3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad antrasis etapas susideda iš šių pakopų:

viii. ląstelės, išsėtos iš ląstelių kultūros, kurios gyvybingumas apie 80 % arba aukštesnis, auginamos ikikritinėje baltymų koncentracijoje mažiausiai 3 šulinėliuose, esant tankio diapazonui nuo 2 iki 6×10^5 ląstelių/ml; ląstelės auginamos ikikritinėje baltymų koncentracijoje ir po 48 valandų 25 % supernatanto pakeičiama šviežia neturinčia baltymų terpe, tokiu būdu padarant galutinę baltymų koncentraciją, kuri yra 75 % prieškritinės baltymų koncentracijos;

ix. kas 48 valandas supernatantas pilnai pakeičiamas šviežia auginimo terpe su baltymų koncentracija, kuri yra 75 % prieškritinės baltymų koncentracijos;

x. esant šiai baltymų koncentracijai, ląstelės auginamos iki susilieimo;

xi. ląstelės iš (x) etapo išsėjamos mažiausiai į 3 šulinėlius tankio diapazone nuo 2 iki 6×10^5 ląstelių/ml auginimo terpėje su baltymų koncentracija, kuri yra 75 % prieškritinės baltymų koncentracijos, ir po 48 valandų 25 % supernatanto pakeičiama šviežia baltymų neturinčia terpe, tokiu būdu padarant galutinę baltymų koncentraciją, kuri yra 75 % prieš tai buvusios pakopos baltymų koncentracijos;

xii. kas 48 valandas supernatantas pilnai pakeičiamas šviežia auginimo terpe su baltymų koncentracija, kuri yra 75 % (x) pakopos koncentracijos;

xiii. esant šiai baltymų koncentracijai, ląstelės auginamos iki susilieimo;

xiv. pakopos nuo (xi) iki (xiii) kartojamos, kiekvieno ciklo metu baltymų koncentracija sumažinama iki 75 % buvusio ciklo koncentracijos, po to ši procedūra kartojama iki pasiekiamas baltymų koncentracija, kuri neiššaukia ląstelių mirties ir populiacijos padvigubėjimo laiko sumažėjimo; jeigu ląstelės yra perkeliamos į terpę su mažesne baltymų koncentracija ir jos sugeba augti neprarandant ląstelių gyvybingumo ir populiacijos padvigubėjimo laiko sumažėjimo prieš pirmąjį persėjimą, galima laikyti, kad ląstelės pasiekė nekritinį etapą ir sėti jas tiesiog į baltymų neturinčią terpę (baltymų koncentracija 0 mg/ml).

4. Būdas pagal 1-3 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad serumą ir baltymą turinti terpė, į kurią ląstelės pradžioje sėjamos, apima nuo 5 % iki 10 % fetalinio veršelių serumo.

5. Būdas pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad žinduolių ląstelių linija, prisitaikiusi augti terpėje, neturinčioje serumo ir baltymų, yra mieloma.

6. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mieloma yra NSO ląstelių linija.

7. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta NSO ląstelių linija turi seką, koduojančią rekombinantinį polipeptidą arba rekombinantinį baltymą.

8. Būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, kad seka, koduojanti rekombinantinį polipeptidą arba rekombinantinį baltymą, koduoja rekombinantinį antikūną arba jo fragmentą.

9. Žinduolių ląstelių linija, gauta būdu pagal 1-8 punktus, kur minėta ląstelių linija yra prisitaikiusi augti terpėje, neturinčioje serumo ir baltymų.

10. Žinduolių ląstelių linija pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta ląstelių linija yra mieloma.

11. Žinduolių ląstelių linija pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta ląstelių linija yra NSO ląstelių linija.

12. Žinduolių ląstelių linija pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad NSO ląstelių linija turi seką, koduojančią rekombinantinį polipeptidą arba rekombinantinį baltymą.

13. Žinduolių ląstelių linija pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad seka, koduojanti rekombinantinį polipeptidą arba rekombinantinį baltymą, koduoja rekombinantinį antikūną arba jo fragmentą.

14. Žinduolių ląstelių linija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad seka koduoja humanizuotą rekombinantinį anti-EGF-R hR3 antikūną arba jo fragmentą.

15. Žinduolių ląstelių linija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad seka koduoja humanizuotą rekombinantinį anti-CD6 T1hT antikūną arba jo fragmentą.

16. Žinduolių ląstelių linija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad seka, koduoja chimerinį rekombinantinį anti-CD3 T3Q antikūną arba jo fragmentą.

17. Būdo pagal 1-8 punktus panaudojimas žinduolių ląstelių linijų, prisitaikiusių augti terpėje, neturinčioje serumo ir baltymų, gavimui.

18. Humanizuotas monokloninis antikūnas prieš EGF-R hR3 arba jo fragmentus, išskirtas ląstelių linijos, gautos būdu pagal 1-8 punktus.

19. Humanizuotas monokloninis antikūnas prieš CD6 T1hT antigeną arba jo fragmentą, išskirtas ląstelių linijos, gautos būdu pagal 1-8 punktus.

20. Chimerinis monokloninis antikūnas prieš CD3 T3Q antigeną arba jo fragmentą, išskirtas ląstelių linijos, gautos būdu pagal 1-8 punktus.

Fig 1: Koreliacija laiko, reikalingo hR3 ląstelėms prisitaikyti prie kiekvienos baltymų koncentracijos.

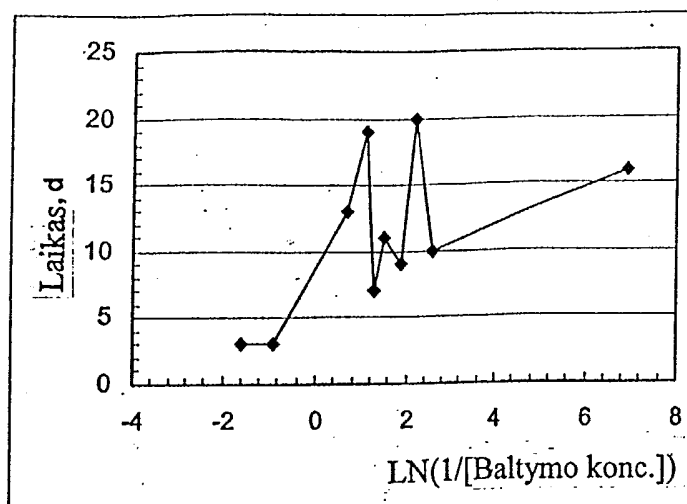


Fig. 2: Koreliacija bendro laiko nuo prisitaikymo proceso pradžios h-R3 ląstelių linijai.

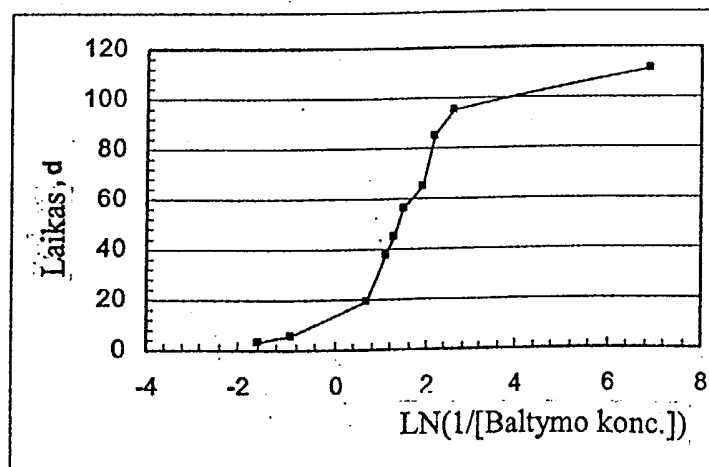


Fig. 3: Koreliacija laiko, reikalingo T1hT ląstelėms prisitaikyti prie kiekvienos baltymo koncentracijos.

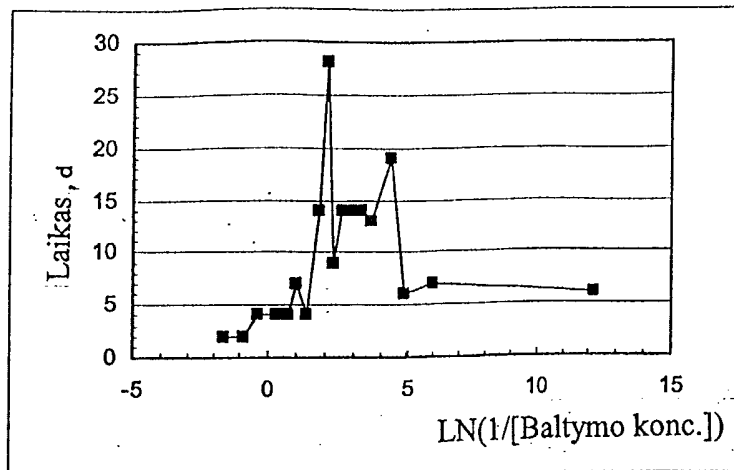


Fig. 4: Koreliacija bendro laiko nuo prisitaikymo proceso pradžios T1hT ląstelių linijai.

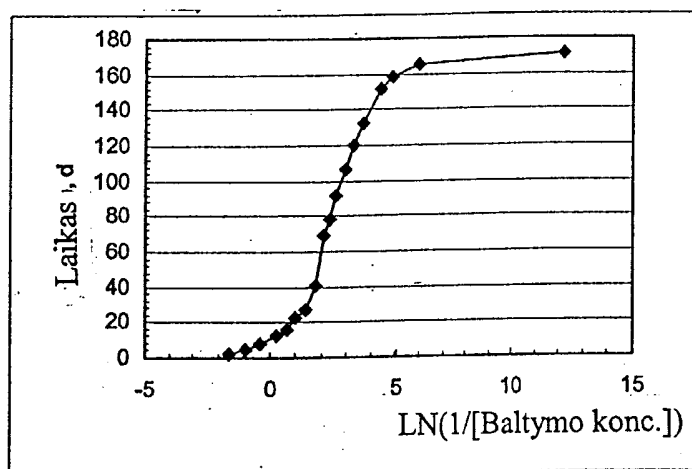


Fig. 5: Koreliacija laiko, reikalingo T3Q ląstelėms prisitaikyti prie kiekvienos baltymo koncentracijos.

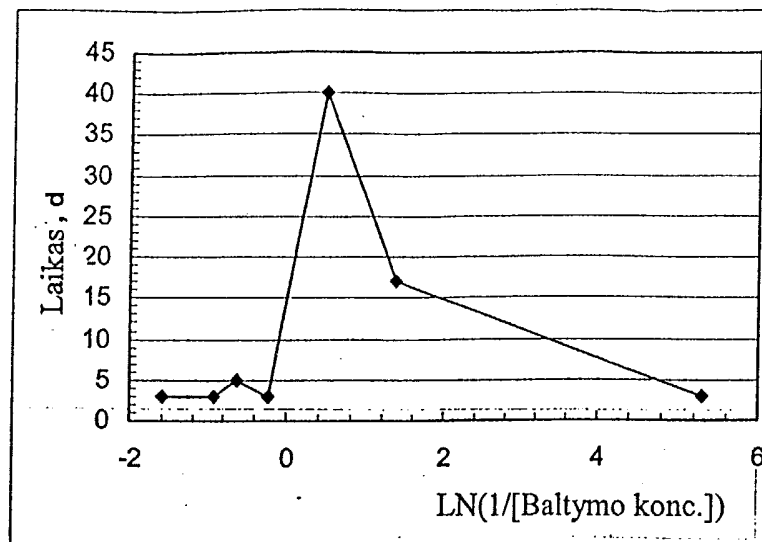


Fig.6: Koreliacija bendro laiko nuo prisitaikymo proceso pradžios T3Q ląstelių linijai.

