

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 039141

(13) В1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.12.09

(21) Номер заявки

201691426

(22) Дата подачи заявки

2014.12.09

(51) Int. Cl. C12P 21/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

**(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ
ВЫСОКОМАННОЗНЫХ ГЛИКОФОРМ, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И
ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 61/926,481

(32) 2014.01.13

(33) US

(43) 2016.11.30

(86) PCT/US2014/069378

(87) WO 2015/105609 2015.07.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Канг Сохие, Хуанг Чунг-Мл,
Бархордарьян Хедье, Бондаренко
Павел, Чжан Чжуинци (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) HENDRICK V. ET AL.: "Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis", CYTOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 36, no. 1-3, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 71-83, XP019236697, ISSN: 1573-0778, DOI: 10.1023/A:1014088919546, abstract, last sentence; page 82, column 1, paragraph 6 -& MATSUI I. ET AL.: "Effect of sodium butyrate on induction of ornithine decarboxylase activity in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes", CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS, ELSEVIER SCIENCE IRLAND, IR, vol. 51, no. 2, 15 September 1984 (1984-09-15), pages 141-149, XP025554752, ISSN: 0009-2797, DOI: 10.1015/0009-2797(84)90026-7 [retrieved on 1984-09-15], page 144, paragraph 1
WO-A2-2008154014

GOETZE ANDREW M. ET AL.: "High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans", GLYCOBIOLOGY JUL 2011, vol. 21, no. 7, July 2011 (2011-07), pages 949-959, XP002736310, ISSN: 1460-2423, figure 3; table 1

(57) Изобретение обеспечивает способ получения рекомбинантного белка с пониженным содержанием высокоманнозных гликоформ путем регулирования метаболизма орнитина в процессе культивирования клеток в сторону снижения накопления в них орнитина за счет добавления в культуральную среду ингибитора аргиназы. Обеспечиваются также рекомбинантный белок с пониженным содержанием высокоманнозных гликоформ и фармацевтическая композиция, содержащая его.

B1

039141

039141
B1

Заявка на данное изобретение заявляет приоритет по предварительно заявке США № 61/926481, поданной 13 января 2014 г., включенной в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки.

Уровень техники изобретения

Различные посттрансляционные модификации, включающие метилирование, сульфатирование, фосфорилирование, присоединение липидов и гликозилирование, осуществляются высшими эукариотами. Известно, что многие секретируемые белки, мембранные белки и белки, ориентированные на везикулы или некоторые внутриклеточные органеллы, гликозилируются. Гликозилирование - ковалентное прикрепление остатков сахаров к специфичным аминокислотам, является одной из самых распространенных посттрансляционных модификаций рекомбинантных белков. Гликозилирование белков имеет несколько функций в клетке, включая его важную роль в фолдинге и контроле качества белков, молекулярной миграции и сортировке и взаимодействии поверхностных клеточных рецепторов.

N-Связанное гликозилирование, включающее добавление олигосахаридов к остатку аспарагина, обнаружено в некоторых последовательностях распознавания у белков (например, Asn-X-Ser/Thr), N-связанные гликопroteины содержат стандартные разветвленные структуры, состоящие из маннозы (Man), галактозы, N-ацетилглюкозамина и нейраминовых кислот. Высокоманнозные олигосахариды обычно включают два N-ацетилглюкозамина с несколькими остатками маннозы (5 или более). Гликопротеиды, продуцируемые в культуре клеток млекопитающих, могут содержать различные уровни этих высокоманнозных (HM или HMN) гликоформ, такие как манноза 5 (Man5), манноза 6 (Man 6), манноза 7 (Man7), манноза 8 (Man8) и манноза 9 (Man9).

В то время как гликоформы рекомбинантного гликопroteина, экспрессируемого клеткой-хозяином яичника китайского хомячка (CHO), во многом определяются внутренними генетическими факторами, содержание высокоманнозных гликоформ также подвержено влиянию условиям клеточной культуры (Pacis, et al., (2011), Biotechnol Bioeng. 108, 2348-2358).

Гликозилирование может влиять на терапевтическую эффективность рекомбинантных белковых препаратов. Влияние гликозилирования на активность, фармакокинетику, иммуногенность, растворимость и in vivo клиренс терапевтических гликопротеинов сделали мониторинг и контроль гликозилирования критическим параметром для биофармацевтического производства. Содержание высокоманнозных гликоформ терапевтических белков является важнейшим качественным показателем, который, как оказалось, влияет на фармакокинетические свойства некоторых терапевтических антител (Goetze, et al., (2011), Glycobiology, 21, 949-59; Yu, et al., (2012), MAbs, 4, 475-87). Поэтому способы контролирования содержания высокоманнозных гликоформ терапевтических белков будет иметь практическую значимость.

Существует потребность в фармацевтической промышленности, в управлении и контролировании содержания высокоманнозных гликоформ терапевтических гликопротеинов, и способы для выполнения этого были бы востребованы. Настоящее изобретение обеспечивает способ для управления содержанием высокоманнозных гликоформ рекомбинантных гликопротеинов путем регулирования метаболизма орнитина в клетках-хозяевах.

Сущность изобретения

Изобретение обеспечивает способ получения рекомбинантного белка, в котором снижено содержание высокоманнозных гликоформ, включающий культивирование клетки-хозяина, которая экспрессирует рекомбинантный белок в культуре клеток, при этом метаболизм орнитина регулируется путем снижения накопления орнитина в клетке-хозяине. В близком варианте реализации накопление орнитина в клетке-хозяине снижается путем культивирования клетки-хозяина в клеточной культуральной среде, содержащей ингибитор аргиназы или спермин.

В близком варианте реализации накопление орнитина в клетке-хозяине снижается путем добавления ингибитора аргиназы в клеточную культуральную среду. В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы представляет собой BEC (S-(2-борэтил)-L-цистеин) или DL- α -дифторметилорнитин. В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы представляет собой BEC (S-(2-борэтил)-L-цистеин). В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы представляет собой DL- α -дифторметилорнитин. В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы составляет по меньшей мере 10 мкМ. В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы составляет от 10 мкМ до 2 мМ. В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы составляет от 10 до 20 мкМ. В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы составляет 10 мкМ. В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы составляет 0,5 мМ. В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы составляет 1 мМ. В другом близком варианте реализации ингибитор аргиназы составляет 2 мМ.

В варианте реализации накопление орнитина в клетке-хозяине снижается путем культивирования клетки-хозяина в клеточной культуральной среде, содержащей 35 мкМ или менее спермина клеточной культуральной среде. В другом близком варианте реализации концентрация спермина составляет от 7 до 35 мкМ. В другом близком варианте реализации концентрация спермина составляет от 17 до 35 мкМ. В другом близком варианте реализации концентрация спермина составляет от

0,07 до 0,17 мл/л. В другом близком варианте реализации концентрация спермина составляет 35 мкМ. В другом близком варианте реализации концентрация спермина составляет 17 мкМ. В другом близком варианте реализации концентрация спермина составляет 7 мкМ.

В другом варианте реализации клетка-хозяин, экспрессирующая рекомбинантный белок, культивируется в периодической культуре, периодической культуре с подпиткой, проточной культуре или их комбинации. В еще одном близком варианте реализации культуры представляет собой проточную культуру. В еще одном близком варианте реализации перфузия включает непрерывную перфузию. В еще одном близком варианте реализации скорости перфузии является постоянной. В еще одном близком варианте реализации перфузия осуществляется со скоростью, меньшей или равной 1,0 рабочему объему в сутки. В еще одном близком варианте реализации перфузия достигается путем чередования тангенциальных потоков.

В другом варианте реализации клетка-хозяин, экспрессирующая рекомбинантный белок, культивируется в биореакторе. В еще одном близком варианте реализации биореактор имеет объем по меньшей мере 500 л. В еще одном близком варианте реализации биореактор имеет объем по меньшей мере от 500 до 2000 л. В еще одном близком варианте реализации биореактор имеет объем по меньшей мере от 1000 до 2000 л. В еще одном близком варианте реализации биореактор инокулирован по меньшей мере $0,5 \times 10^6$ клетками/мл.

В другом варианте реализации клетка-хозяин, экспрессирующая рекомбинантный белок, культивируется в бессыворточной клеточной культуральной среде. В другом близком варианте реализации бессыворточная клеточная культуральная среда представляет собой проточную клеточную культуральную среду. В еще одном близком варианте реализации клетки-хозяева являются клетками млекопитающего. В еще одном близком варианте реализации клетки-хозяева являются клетками яичника китайского хомячка (CHO).

В другом варианте реализации рекомбинантный белок представляет собой гликопротеин. В другом варианте реализации рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного слитого белка или цитокина.

В другом варианте реализации вышеупомянутые методы дополнительно включают этап сбора рекомбинантного белка, продуцированный клеткой-хозяином.

В другом варианте реализации рекомбинантный белок, продуцированный клеткой-хозяином, является очищенным и предоставлен в составе фармацевтически приемлемой лекарственной формы.

В другом варианте реализации предоставляется рекомбинантный белок, продуцированный по любому из вышеупомянутых способов. В связанном варианте реализации рекомбинантный белок является очищенным. В другом варианте реализации рекомбинантный белок предоставлен в составе фармацевтически приемлемой лекарственной формы.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Общее представление о метаболизме орнитина. ARG -аргиназа; AZ - антизим; AZIN - ингибитор антизима; P5C пирролин-5-карбоксилат; ASP - аспартат; ORNT - орнитин транспортер; GATM - глицинаминогликантрансфераза; NOS - синтаза оксида азота; OAT - орнитинаминогликантрансфераза; ODC орнитиндекарбоксилаза; OTC - орнитинтранскарбамилаза; SMS сперминсинтаза; SRS - спермидинсинтаза.

Фиг. 2. Идентификация орнитина в качестве метаболического маркера, ассоциированного с уровнями высокоманнозных гликанов. Уровни высокоманнозных гликанов (% HM) секретируемых рекомбинантных моноклональных антител из восьми разных клеточных линий (клеточные линии от А до Н), обнаруженных на 8 день (D8, белые полосы), день 9 (D9, серые полосы) и 10 (D10, черные полосы) периодического процесса с подпиткой, измеренных на среде № 1 (А) или среде № 2 (В). Корреляция между уровнями высокоманнозных гликанов и уровнями внеклеточного орнитина, измеренными в отработанной культуре (С). В среднем на 9 день сравнивали уровень орнитина и уровень высокоманнозных гликанов из восьми клеточных линий. Коэффициент корреляции Пирсона, R=0,83.

Фиг. 3. Корреляция между высокоманнозными уровнями и уровнями внеклеточного орнитина: А) содержание высокоманнозных гликоформ, измеренных, когда клеточная линия Н подвергалась восьми различным условиям культивирования (№ 1-8); В) соответствующие относительные внеклеточные уровни орнитина; С) корреляция между % содержания высокоманнозных гликоформ и относительными уровнями внеклеточного орнитина. Коэффициент корреляции Пирсона, R=0,78.

Фиг. 4. Относительные уровни экспрессии мРНК аргиназы-1 в осадках клеток, собранных из 8 различных клеточных линий на 3, 6, 8, 9 и 10 сутки. Также показано соответствующее содержание высокоманнозных гликоформ.

Фиг. 5. Содержание высокоманнозных гликоформ в рекомбинантных белках, экспрессируемых клетками, растущими на среде культивирования клеток, содержащей спермин тетрагидрохлорид в концентрациях 0, 7, 17, 35 и 100 мкМ. Образцы были отобраны на 5 сутки контрольного перфузационного анализа. Образцы 35 мкМ служили в качестве контроля.

Фиг. 6. Концентрация внеклеточного орнитина (мг/л), эндогенно продуцируемого клетками культур подверженных воздействию спермина тетрагидрохлорида в концентрациях 0, 7, 17, 35 и 100 мкМ. Образцы были отобраны на 5 сутки контрольного перфузационного анализа. Образцы 35 мкМ служили в ка-

честве контроля.

Фиг. 7. Содержание высокоманнозных гликоформ в рекомбинантных белках, экспрессируемых клетками, растущими на среде культивирования клеток, содержащей L-орнитин моногидрохлорид в концентрациях 0, 0,6, 6 и 14,8 мМ. Образцы были отобраны на 5 сутки контрольного перфузационного анализа. Образцы 0 мМ служили в качестве контроля.

Фиг. 8. Содержание высокоманнозных гликоформ в рекомбинантных белках, экспрессируемых клеточной линией "I", растущей на среде культивирования клеток, содержащей 0,1 г/л L-орнитин моногидрохлорид (черные столбцы), или контрольной клеточной культурой, не содержащей экзогенно внесенного оргитина (белые столбцы). Образцы были отобраны на 6, 8 и 12 сутки.

Фиг. 9. Содержание высокоманнозных гликоформ в рекомбинантных белках, экспрессируемых клетками, растущими на среде культивирования клеток, содержащей аргинин моногидрохлорид в концентрациях 2,2, 4,4, 6,5 8,7 и 17,5 мМ. Образец 8,7 мМ выступал в качестве контроля. Образцы были отобраны на 4 сутки контрольного перфузационного анализа.

Фиг. 10. Содержание высокоманнозных гликоформ в рекомбинантных белках, экспрессируемых клетками, растущими на среде культивирования клеток, дополненной различными ингибиторами аргиназы. ВЕС гидрохлорид (ВЕС), DL- α -дифторметилорнитин гидрохлорид (DL- α), соль N^G-гидрокси-L-аргинин моноацетата (NG) и соль Nco-гидрокси-нор-аргинин диацетата (Nw) в концентрациях 1, 10 и 20 мкМ. Контроль не содержал ингибитор. Образцы были отобраны на 4 сутки контрольного перфузационного анализа.

Фиг. 11. Содержание высокоманнозных гликоформ в рекомбинантных белках, экспрессируемых клетками, растущими на среде культивирования клеток, содержащей ингибитор аргиназы ВЕС гидрохлорид (ВЕС) в концентрациях 0,0, 0,01 и 0,5 мМ и DL- α -дифторметилорнитин гидрохлорид (DL- α) в концентрациях 0,0, 0,01, 1,0 и 2,0 мМ. Образцы были отобраны на 4 сутки контрольного перфузационного анализа.

Подробное описание сущности изобретения

Было установлено, что содержание высокоманнозных гликоформ экспрессируемого рекомбинантного гликопroteина находилось под влиянием аккумуляции орнитина в клетке-хозяине и в результате может управляться путем регулирования метаболизма орнитина в клетке-хозяине.

Орнитин представляет собой некодирующую белок аминокислоту, которая участвует в цикле образования мочевины, синтезе полиаминов и метаболизме аргинина. Орнитин также является прекурсором глутамата и пролина через активность орнитин-5-аминотрансферазы (OAT), см. фиг. 1. У человека дефицит OAT приводит к гиантской атрофии сосудистой оболочки и сетчатки (GA), расстройству, характеризующемуся дегенерацией сетчатки, и накоплению в плазме орнитина (Takki K. et al., Br. J. Ophthalmol. 1974; 58(11):907-16). В мышной модели OAT-дефицита аргинин-ограничивающая диета продемонстрировала уменьшение уровней орнитина в плазме и предотвращала дегенерацию сетчатки (Wang T. et al., PNAS, 2000; 97(3):1224-1229). Орнитиндекарбоксилаза (ODC), которая катализирует превращение орнитина в путресцин, является скорость-лимитирующим ферментом пути биосинтеза полиаминов (Pegg A., JBC. 2006; 281(21):14529-14532). Синтез и стабильность ODC, а также активность транспортера полиаминов зависят от осмотических условий окружающей среды (Munro G. et al., BBA, 1975; 411(2):263-281; Tohyama et al., Eur. J. Biochem. 1991; 202(3):1327-1331; Michell J. et al., 1998; 329:453-459). Усиленный биосинтез полиаминов связан с повышенной устойчивостью к осмотическому стрессу у растений (Alcazar R. et al., Biotechnol Lett. 2006; 28:1867-1876). Превращение орнитина в цитруллин катализируется орнитинтранскарбамилазой (OTC) как часть цикла образования мочевины. Дефицит OTC у людей приводит к накоплению аммиака в крови (Hopkins et al., Arch Dis Childh., 1969, 44:143-148). Метabolизм орнитина происходит в цитозоле, и митохондриях с катализируемыми посредством OTC и OAT метаболическими этапами, происходящими в митохондриях. Митохондриальный транспортер орнитина ORNT1 требуется для импорта орнитина в митохондрии. У человека мутации в ORNT1 отвечают за синдром гиперорнитинемии, гипераммониемии, гомоциртуллинурии (ННН), который характеризуется повышенным уровнем орнитина и аммиака в плазме (Camacho et al., Nat. Genet. (1999); 22:151-158); (Valle D. et al, 2001, 1857-1896).

Как описано в настоящем документе, степень накопления орнитина в клетке-хозяине, измеренная посредством внеклеточных уровней орнитина в клеточной культуральной среде, коррелировала с содержанием высокоманнозных гликоформ экспрессируемых рекомбинантных гликопротеинов. Управление высоким содержанием маннозы может быть достигнуто путем регулирования метаболизма орнитина в клетке-хозяине. Изобретение обеспечивает способ для управления содержанием высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка, включающий культивирование клетки-хозяина экспрессирующей рекомбинантный белок в культуре клеток в условиях, которые регулируют метаболизм орнитина в клетке-хозяине. Метabolизм орнитина можно регулировать путем уменьшения или увеличения накопления орнитина в клетке-хозяине. Настоящее изобретение обеспечивает способы получения рекомбинантных белков, в которых снижено или повышено содержание высокоманнозных гликоформ, включающие культивирование клетки-хозяина, которая экспрессирует рекомбинантный белок в культуре клеток, при этом

регулируется накопление орнитина в клетке-хозяине.

Метаболизм орнитина относится к химическим или ферментативным реакциям и путям, вовлеченным в биосинтез, транспорт, катаболические процессы и метаболические преобразования орнитина. Цикл образования мочевины, синтез полiamинов, синтез креатина и митохондриальный путь катаболизма орнитина являются примерами метаболизма орнитина. Общее представление продемонстрированно на фиг. 1.

Накопление орнитина в клетке-хозяине является следствием измененного метаболизма орнитина. Степень накопления орнитина в клетке-хозяине может управляться путем регулирования метаболизма орнитина. Уровни внутриклеточного метаболита могут быть отражены во внеклеточных уровнях (т.е. измеренных в клеточной культуральной среде). Индикатор накопления орнитина в клетке-хозяине может быть получен путем измерения количества орнитина, секретированного в клеточную культуральную среду. Описанные в настоящем документе динамические повышения уровня орнитина были зафиксированы в клеточной культуре без добавления экзогенного орнитина.

"Содержание высокоманнозных гликоформ", "уровень высокоманнозных гликанов" и "уровни высокоманнозных видов" используются взаимозаменяющими обозначениями "HM", "% HM", "HMN" или "% HMN" и относятся к относительному процентному содержанию комбинированных видов гликанов маннозы 5 (Man5), маннозы 6 (Man6), маннозы 7 (Man7), маннозы 8 (Man8) и маннозы 9 (Man9).

Было установлено, что уровень орнитина, секретируемый в клеточную культуральную среду, коррелируют с содержанием высокоманнозных гликоформ рекомбинантных гликопротеинов, экспрессируемых клетками-хозяевами в культуре клеток. В тех случаях, когда накопление орнитина в клетке-хозяине было снижено путем культивирования клетки-хозяина на среде культивирования клеток, содержащей ингибитор аргиназы или спермин, содержание высокоманнозных гликоформ рекомбинантных экспрессируемых гликопротеинов было снижено. В тех случаях, когда накопление орнитина в клетке-хозяине было повышено путем культивирования клетки-хозяина на среде культивирования клеток, содержащей орнитин или аргинин, содержание высокоманнозных гликоформ рекомбинантных экспрессируемых гликопротеинов было повышенено.

Настоящее изобретение обеспечивает способ регулирования накопления орнитина в клетке-хозяине путем культивирования клетки-хозяина на среде культивирования клеток, содержащей ингибитор аргиназы.

Аргинин является метаболическим предшественником орнитина, а аргиназа представляет собой фермент, который катализирует превращение аргинина в орнитин. Было отмечено, что уровни экспрессии мРНК аргиназы соотносятся с объемом накопления орнитина при сравнении метаболических профилей и профилей экспрессии различных клеточных линий. Блокируя активность аргиназы ингибитором аргиназы, можно потенциально снизить уровни продуцирования орнитина. Однако эффективность ингибиторов аргиназы может быть нарушена из-за высокого уровня аргинина в клеточной культуральной среде. Кроме того, существуют и другие метаболические предшественники орнитина (например, глутамат и пролин, см. фиг. 1), которые могут способствовать накоплению орнитина.

Как описано в настоящем документе, было установлено, что содержание высокоманнозных гликоформ рекомбинантных гликопротеинов, экспрессируемых культивируемой клеткой-хозяином, может управляться путем добавления ингибитора аргиназы в клеточной культуральной среде. Блокирование активности аргиназы сократило объем продуцирования орнитина в клетках-хозяевах, снизило уровень высокоманнозных гликанов экспрессируемых рекомбинантных гликопротеинов.

Аргиназа также ингибирует орнитинкарбамилазу (OTC) (Visser et al., (1982), J. Gen. Microbiol. 128:1235-1247). Блокирование активности аргиназы не только уменьшает продуцирование орнитина из аргинина, но потенциально может ослабить подавление активности OTC, обеспечивая преобразование орнитина в цитруллин, приводящее к дополнительному снижению накопления орнитина (см. фиг. 1).

У пациентов с недостаточностью OTC наблюдаются повышенные уровни аммиака. При повышенной экспрессии или активности аргиназы в линиях клетках-хозяев, экспрессирующих рекомбинантный белок с высокими уровнями высокоманнозных гликанов, который индуцирует ингибирование OTC, это также приводит к увеличению уровня аммиака. Увеличение внутриклеточного уровня аммиака может изменить градиент pH в аппарате Гольджи и вызвать неоптимальное перераспределение гликозилтрансфераз, что приводит к повышению уровня высокоманнозных гликанов, из-за неполного ветвления гликана в комплексе Гольджи (Campbell et al., (1973), NJM, 288(1):1-6; Hopkins et al., (1969), Archive of Disease in Childhood, 44(234):143-148; Mühling et al., (2001), Amino Acids, 21(3):303-318; Park et al., (2000), J. Biotechnol. 81(2):129-140; Rivinoja et al., (2009), J. Cell Physiol. 220(1):144-154; и Axelsson et al., (2001), Glycobiology, 11(8):633-644).

Пригодные ингибиторы аргиназы известны в данной области техники и доступны из коммерческих источников. Такие ингибиторы аргиназы включают BES гидрохлорид, DL- α -дифторметилорнитин гидрохлорид; N^G-гидрокси-L-аргинин и N ω -гидрокси-нор-аргинин. В одном варианте реализации ингибитор аргиназы представляет собой BES (S-(2-борэтил)-L-цистеин) или DL- α -дифторметилорнитин. В одном

варианте реализации ингибитор аргиназы представляет собой ВЕС (S-(2-борэтил)-l-цистеин). В одном варианте реализации ингибитор аргиназы представляет собой DL- α -дифторметилорнитин.

Ингибиторы аргиназы могут быть добавлены в клеточную культуральную среду в концентрации, равной по меньшей мере 10 мкМ, для снижения уровней высокоманнозных гликанов экспрессируемых рекомбинантных белков без существенного влияния на продуктивность. В одном варианте реализации концентрация ингибитора аргиназы составляет от 10 мкМ до 2 мМ. В другом варианте реализации концентрация ингибитора аргиназы составляет 10 мкМ. В другом варианте реализации концентрация ингибитора аргиназы составляет 0,5 мМ. В другом варианте реализации концентрация ингибитора аргиназы составляет 1 мМ. В другом варианте реализации концентрация ингибитора аргиназы составляет 2 мМ.

Накопление орнитина в клетке-хозяине может также регулироваться путем культивирования клетки-хозяина на среде культивирования клеток, содержащей спермин, как описано в примерах ниже. Орнитин, под действием орнитиндекарбоксилазы (ODC), представляет собой отправную точку для пути метаболизма полiamинов и синтеза полiamинов путресцина, спермилина и спермина. Экзогенно внесенный спермин может быть использован для инактивации ODC напрямую или через антагонист, см. фиг. 1. Инактивация ODC может привести к накоплению орнитина, как описано ниже. Путем ограничения количества экзогенно внесенного спермина подавление активности ODC может быть снято и орнитин может быть метаболизирован по пути полiamинов, что приводит к сокращению объема накопления орнитина в клетке-хозяине.

Спермин может быть добавлен в клеточную культуральную среду в концентрации меньше или равной 35 мкМ для снижения уровней высокоманнозных гликанов экспрессируемых рекомбинантных белков без существенного влияния на продуктивность. В одном варианте реализации концентрация спермина составляет от 7 до 35 мкМ. В одном варианте реализации концентрация спермина составляет от 17 до 35 мкМ. В одном варианте реализации концентрация спермина составляет от 7 до 17 мкМ. В другом варианте реализации концентрация спермина составляет 35 мкМ. В другом варианте реализации концентрация спермина составляет 17 мкМ. В другом варианте реализации концентрация спермина составляет 7 мкМ.

Другим способом регулирования метаболизма орнитина является увеличение накопления орнитина. В одном варианте реализации изобретение обеспечивает регулирование накопления орнитина в клетке-хозяине путем культивирования клетки-хозяина на среде для культивирования клеток, содержащей орнитин, аргинин, ингибитор орнитиндекарбоксилазы, ингибитор орнитинаминотрансферазы, ингибитор синтазы оксида азота или ингибитор аргининдекарбоксилазы.

Как описано в настоящем документе, уровни внеклеточного орнитина в клеточной культуральной среде коррелировали с уровнями высокоманнозных гликанов рекомбинантных гликопротеинов. Было установлено, что культивирование клеток-хозяев, экспрессирующих рекомбинантные белки в клеточной культуральной среде, содержащей орнитин, приводило к образованию рекомбинантных гликопротеинов, имеющих повышенный уровень высокоманнозных гликанов.

Как описано выше, накопление орнитина в клеточной культуральной среде, вероятно, отражает изменения в метаболизме орнитина, которые могут привести к накоплению аммиака, похожие на такие у пациентов, имеющих дефектные гены метаболизма орнитина (например, недостаточность OTC или мутация ORNT1). В то время как клеточный механизм, обуславливающий увеличение количества высокоманнозных гликоформ, индуцированное аммиаком, не известен, было высказано предположение, что изменения в градиенте pH в аппарате Гольджи может привести к неоптимальному перераспределению гликозилтрансфераз. Эти изменения могут привести к снижению доступности ферментов гликозилирования, для завершения ветвления гликанов, и, следовательно, привести к повышенным уровням высокоманнозных гликанов.

Другой вероятный сценарий состоит в том, что накопление орнитина потенциально вызывает нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза (Zanatta et al., (2013), Life Sciences, 93(4):161-168). Орнитин коррелирует положительно с высокоманнозными гликанами, свидетельствуя о возможности того, что содержание высокоманнозных гликоформ регулируется окислительно-восстановительным состоянием клетки. Орнитин может увеличить уровни окисления липидов. Поскольку многие регулирующие гликозилирование ферменты связаны с липидной мембраной, изменения липидного окисления, вызванного накоплением орнитина, может потенциально повлиять на целостность и активность ферментов регулирования гликозилирования в аппарате Гольджи и ЭПР и впоследствии повлиять на содержание высокоманнозных гликоформ.

Орнитин может быть добавлен в клеточную культуральную среду в концентрации, равной по меньшей мере 0,6 мМ, для повышения уровней высокоманнозных гликанов экспрессируемых рекомбинантных белков без существенного влияния на продуктивность. В одном варианте реализации концентрация орнитина составляет 0,6-14,8 мМ. В одном варианте реализации концентрация орнитина составляет 6-14,8 мМ. В другом варианте реализации концентрация орнитина составляет 0,6 мМ. В другом варианте реализации концентрация орнитина составляет 6 мМ. В другом варианте реализации концентрация орнитина составляет 14,8 мМ.

Аргинин является метаболическим предшественником орнитина. Было обнаружено, что уровни вы-

сокоманнозных гликанов увеличиваются в рекомбинантных белках, экспрессируемых клетками, растущими на среде культивирования клеток, содержащей экзогенный аргинин. Увеличение количества экзогенного аргинина увеличивает количество метаболического предшественника, доступного для синтеза орнитина, тем самым увеличивая уровень орнитина в клетках-хозяевах.

Настоящее изобретение обеспечивает регулирование накопления орнитина в клетках-хозяевах путем добавления в клеточную культуральную среду аргинина в концентрации по меньшей мере 8,7 мМ для повышения уровней высокоманнозных гликанов экспрессируемых рекомбинантных белков без существенного влияния на продуктивность. В одном варианте реализации концентрация аргинина составляет от 8,7 до 17,5 мМ. В другом варианте реализации концентрация аргинина составляет 8,7 мМ. В другом варианте реализации концентрация аргинина составляет 17,5 мМ.

Накопление орнитина может регулироваться путем добавления в клеточную культуральную среду ингибиторов орнитиндекарбоксилазы (ODC), орнитинаминотрансферазы (OAT), синтазы оксида азота (NOS) или аргининдекарбоксилазы (ADC), тем самым предоставляя возможность регулирования метabolизма орнитина и накопления орнитина в клетке-хозяине, для управления содержанием высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка.

Накопление орнитина может быть увеличено путем блокирования активности метаболизирующих орнитин ферментов, таких как ODC и OAT (см. фиг. 1). Низкомолекулярные ингибиторы, специфичные к ODC, такие как альфа-дифторметилорнитин (DFMO) и пиперонилбутоксид (ПБО), являются коммерчески доступными. OAT блокируется 5-фторметилорнитином (5-FMOmT) (Daune et al., 1988, Biochem J. 253:481-488). Настоящее изобретение обеспечивает дополнение культуры клеток этими ингибиторами для усиления накопления орнитина в клетках-хозяевах для управления содержанием высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка.

Накопления орнитина может регулироваться путем блокирования активности ферментов, регулирующих накопление аргинина (фиг. 1). Ингибирование активности синтазы оксида азота низкомолекулярными ингибиторами, такими как 2-этил-2-тиопсевдомочевина, и N-нитро-L-аргинин, и N^G-монометил-L-аргинин, и/или активности аргининдекарбоксилазы посредством асимметричного диметиларгинина (ADMA) может усилить поток преобразования аргинина в орнитин. Настоящее изобретение обеспечивает дополнение культуры клеток этими ингибиторами для усиления накопления орнитина в клетке-хозяине для управления содержанием высокоманнозных гликоформ рекомбинантного белка.

В одном варианте реализации изобретения предусмотрено, что клеточная культуральная среда представляет собой бессыроточную клеточную культуральную среду. В одном варианте реализации клеточная культуральная среда представляет собой проточную клеточную культуральную среду.

Используемые в настоящем изобретении термины "питательная среда для культивирования клеток" (также называемая "культуральная среда" "клеточная культуральная среда", "питательная среда для культуры тканей") относятся к любому питательному раствору, используемому для выращивания клеток, например клеток животных или млекопитающих, и который обычно обеспечивает по меньшей мере один или более компонентов из следующих: источник энергии (обычно в форме углеводов, таких как глюкоза); одна или более из всех незаменимых аминокислот и, как правило, 20 основных аминокислот, плюс цистеин; витамины и/или другие органические вещества, как правило, необходимые в низких концентрациях; жиры или свободные жирные кислоты и микроэлементы, например неорганические соединения или природные элементы, которые обычно требуются в очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне.

Питательный раствор может необязательно быть дополнен дополнительными компонентами для оптимизации роста клеток, такими как гормоны и другие факторы роста, например, инсулином, трансферрином, эпидермальным фактором роста, сывороткой и т.п.; солями, например, кальция, магния, и фосфатами и буферами, например HEPES; нуклеозидами и основаниями, например аденоzinом, тимидином, гипоксантином; и белковым и тканевым гидролизатом, например гидролизованным животным или растительным белком (пептон или смеси пептона, которые могут быть получены из животных субпродуктов, очищенного желатина или растительного сырья); антибиотиками, например гентамицином; средствами для защиты клеток или поверхностно-активными веществами, например Pluronic® F68; полиаминами, например путресцином, спермидином или спермином (см., например, публикацию ВОИС № WO 2008/154014) и пируватом (см., например, патент США № 8053238) в зависимости от требований клеток в культуре и/или необходимых параметров клеточной культуры.

Среды для культивирования клеток включают те, которые обычно используются в и/или известны для использования в любом процессе культивирования клеток, таком как, без ограничений, полунепрерывное, расширенное полунепрерывное, периодическое с подпиткой и/или проточное или непрерывное культивирование клеток.

Компоненты культуральной клеточной среды могут быть полностью измельчены в порошковую среду; частично измельчены с жидкими добавками, внесенными в культуральную клеточную среду по мере необходимости; или питательные вещества могут быть добавлены в совершенно жидким виде в клеточную культуру.

"Базовая" (или периодическая) клеточная культуральная среда относится к среде культивирования

клеток, которая обычно используется для инициации культуры клеток и является достаточно полной для поддержки клеточной культуры.

"Ростовая" клеточная культуральная среда относится к среде культивирования клеток, которая обычно используется в культурах клеток в период экспоненциального роста - "фазы роста" и является достаточно полной для поддержания культуры клеток во время этой фазы. Ростовая клеточная культуральная среда может также содержать агенты, которые обеспечивают выживание или устойчивость к селектируемым маркерам, включенным в линию клетки-хозяина. Такие селекционные агенты включают, без ограничения, генетицин (G4118), неомицин, гигромицин Б, пуромицин, зеоцин, метионин сульфоксимин, метотрексат, безглутаминовую клеточную культурную среду, безглициновую клеточную культурную среду, гипоксантин и тимидин или только тимидин.

"Производственная" клеточная культуральная среда относится к среде культивирования клеток, которая обычно используется в культурах клеток во время переходной и производственных фаз, после завершения экспоненциального роста, когда начинается продуцирование белка, и является достаточно полной для поддержания желаемой плотности, жизнеспособности и/или продуктивности клеток во время этих фаз.

"Перфузационная" клеточная культуральная среда относится к среде культивирования клеток, которая обычно используется в культурах клеток для поддержания перфузионного или непрерывного способов культивирования и является достаточно полной для поддержания культуры клеток во время этих процессов. Составы перфузионной клеточной культуральной среды могут быть обогащенными и более концентрированными по сравнению с составами базовой клеточной культуральной среды для приспособления к способу, используемому для удаления отработанной среды. Перфузационная клеточная культуральная среда может быть использована как во время фазы роста, так и во время фазы продуцирования.

Концентрированная клеточная культуральная среда может содержать некоторые или все питательные вещества, необходимые для поддержания культуры клеток; в частности концентрированная среда может содержать питательные вещества, определенные или, как известно, потребляемые в течение фазы продуцирования клеточной культуры. Концентрированная среда может быть основана на любом составе клеточной культуральной среды. Такая концентрированная питательная среда может содержать некоторые или все составляющие среды для культивирования клеток, например, в концентрации около 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X или даже около 1000X от их нормального количества.

Клеточные культуры также могут быть дополнены независимыми концентрированными порциями определенных питательных веществ, которые может быть трудно приготовить или которые являются быстро потребляемыми в клеточных культурах. Такими питательными веществами могут быть аминокислоты, например тирозин, цистеин и/или цистин (см., например, публикацию ВОИС № 2012/145682). В одном варианте реализации концентрированный раствор тирозина независимо поступает в культуру клеток, выращиваемую в среде культивирования клеток, содержащих тирозин, так, что концентрация тирозина в культуре клеток не превышает 8 мМ. В другом варианте реализации концентрированный раствор тирозина и цистина независимо поступает в культуру клеток, выращиваемую в среде культивирования клеток, лишенной тирозина, цистина или цистеина. Независимая подпитка может начинаться до или в начале этапа продуцирования. Независимые подпитки могут быть выполнены путем подпитывания клеточной культуральной среды в тот же или разные дни, что и выполняемые для концентрированной питательной среды. Независимые подпитки также могут быть влиты в тот же или разные дни, что и перфузионная среда.

Клеточная культуральная среда в определенных вариантах реализации является бессывороточной и/или не содержащей продукты или ингредиенты животного происхождения. Клеточная культуральная среда в определенных вариантах реализации является химически определенной, такой, в которой известны все химические компоненты.

Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что клетки животных или млекопитающих культивируются в среде, подходящей для культивирования конкретной клетки и которые может определить специалист в данной области техники без излишнего экспериментирования. Возможно применение коммерчески доступных питательных сред, включающих, без ограничения, модифицированную Iscove среду Дульбекко, RPMI 1640, минимальную питательную среду альфа (MEM-alpha), модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), DME/F12, альфа MEM, базовую среду Игла с BSS Эрле, высокоглюкозную DMEM с глутамином, высокоглюкозную DMEM без глутамина, низкоглюкозную DMEM без глутамина, DMEM:F12 1:1 с глутамином, GMEM (Глазго MEM), GMEM с глутамином, полную среду Грэйся для клеток насекомых, среду Грэйся для клеток насекомых без FBS, Хама F-10 с глутамином, Хама F-12 с глутамином, IMDM с HEPES и глутамином, IMDM с HEPES и без глутамина, IP41 среду для клеток насекомых, 15 (Лейбовица) (2X) без глутамина или фенолового красного, 15 (Лейбовица) без глутамина, модифицированная среда МакКоя 5A, среда 199, MEM Игла без глутамина или фенольного красного (2X), MEM Игла-Эрле BSS с глутамином, MEM Игла-Эрле BSS без глутамина, MEM Игла-Ханкса BSS без глутамина, NCTC-109 с глутамином, среда Ритчерса CM с глутамином, RPMI 1640 с HEPES, глутамином и/или пеницилином-стрептомицином, RPMI 1640 с глутамином, RPMI 1640 без глутамина.

тамина, среду Шейдера для клеток насекомых или любую другую среду, известную специалисту в данной области техники, разработанную для определенных типов клеток. К вышесказанным образцовым средам могут быть добавлены дополнительные компоненты или ингредиенты, включая дополнительные компоненты, в соответствующих концентрациях или количествах, как необходимо или желательно и как известно специалисту в данной области техники, с применением стандартных умений.

В одном варианте реализации клетки-хозяева являются клетками млекопитающего. В одном варианте реализации клетки-хозяева являются клетками яичника китайского хомячка (CHO).

Клеточные линии (также называемые как "клетки-хозяева"), используемые в настоящем изобретении, являются генно-модифицированными для экспрессирования коммерчески или научно востребованного полипептида. Клеточные линии, как правило, получают из поколения клеток, полученных от основной культуры, они могут поддерживаться в культуре в течение неограниченного времени. Клетки могут содержать введенные, например, путем трансформации, трансфекции, инфекции или инъекции экспрессионные векторы (конструкты), такие как плазмида и подобные, которые содержат кодирующие последовательности или их части, кодирующие экспрессируемые и продуцируемые белки в процессе культивирования. Такие экспрессионные векторы содержат необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности. Способы, которые хорошо известны и практикуются специалистами в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие продуцируемые белки и полипептиды, а также соответствующие управляющие элементы транскрипции и трансляции. Эти способы включают методики рекомбинантных ДНК *in vitro*, синтетические методики и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Такие методики описаны в J. Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4-е изд., Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. или любое предыдущее издание; F.M. Ausubel et al., 2013, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y. или любое предыдущее издание; Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, все из которых включены в настоящий документ для любых целей.

Клетки животных, клетки млекопитающих, культивируемых клетки, клетки-хозяева животных или млекопитающих, клетки-хозяева, рекомбинантные клетки, рекомбинантные клетки-хозяева и т.п. соответствуют клеткам, которые можно культивировать в соответствии со способами настоящего изобретения. Такие клетки обычно представляют собой клеточные линии, полученные или произведенны от млекопитающих и способные расти и выживать при размещении в монослой или суспензию культуры на среде, содержащей соответствующие питательные вещества и/или другие факторы, такие, как те, что описаны в настоящем документе. Клетки обычно выбирают так, чтобы они могли экспрессировать и секретировать белки, или которые могут быть молекулярно модифицированными, для экспрессии или секреции большого количества конкретного белка, точнее, необходимого гликопroteина, в питательную среду. Понятно, что белок, продуцированный клеткой-хозяином, может быть эндогенным или гомологичным клетке-хозяину. Кроме того, белок является гетерологичным, т.е. привнесенным, в клетку-хозяина, например человеческий белок, продуцируемый и экспрессируемый клетками-хозяевами яичника китайского хомячка (CHO). Кроме того, белки млекопитающих, т.е. первоначально полученные или произведенные из организма млекопитающих, получаются методами настоящего изобретения и могут быть секretированы клетками в культуральную среду.

Способы настоящего изобретения могут быть использованы в культуре различных клеток. В одном варианте реализации культивируемые клетки представляют собой эукариотические клетки, такие как растительные и/или животные клетки. Клетки могут быть клетками млекопитающих, клетками рыб, клетками насекомых, клетками амфибий или клетками птиц. Различные клеточные линии млекопитающих, подходящие для роста в культуре, доступны из американской коллекции культур (Манассас, штат Вирджиния) и других депозитариев, а также коммерческих поставщиков. Клетки, которые могут быть использованы в процессах изобретения, включают, без ограничения, клетки MK2.7, PER-C6 клетки, клетки яичника китайского хомячка (CHO), такие как CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al., 1986, Som. Cell Molec. Genet., 12:555-556; Kolkek et al., 1997, Biochemistry, 36:10901-10909; и WO 01/92337 A2), дигидрофолатредуктаза негативные клетки CHO (CHO-DHFR, Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216) и клетки dr12.CHO (патент США № 5721121); клетки почки обезьяны (CV1, ATCC CCL-70); клетки почки обезьяны CV1, трансформированные SV40 (клетки COS, COS-7, ATCC CRL-1651); клетки HEK 293 и клетки Sp2/0, клетки гибридомы 5L8, клетки Дауди, клетки EL4, клетки HeLa, клетки HL-60, клетки K562, клетки Jurkat, клетки THP-1, клетки Sp2/0, первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, эпителиальные клетки шейки матки, бронхиальные эпителиальные клетки, эпителиальные клетки трахеи, эпителиальные клетки почек и эпителиальные клетки сетчатки) и установленные клеточные линии и их штаммы (например, эмбриональные клетки почек человека (например, клетки 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36:59); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL-10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod., 23:243-251); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL-2); клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL-34); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL-75); клетки гепатомы человека (HEP-G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши

(MMT 060562, ATCC CCL-51); клетки печени крысы Буффало (BRL 3A, ATCC CRL-1442); клетки TRI (Mather, 1982, Annals NY Acad. Sci., 383:44-68); клетки MCR 5; клетки FS4; клетки сетчатки PER-C6, клетки MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Нер-2, клетки KB, клетки LS 180, клетки LS 174T, клетки NCI-H-548, клетки RPMI 2650, клетки SW-13, клетки T24, WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-I, клетки LLC-MK₂, клетки Clone M-3, клетки 1-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки LLC-PK₁, клетки PK(15), клетки GH₁, клетки GH₃, клетки L2, клетки LLC-RC 256, клетки MH₁C₁, клетки XC, клетки MDOK, клетки VSW, и клетки TH-I, B1 или их производные), клетки фибробластов из любой ткани или органа (включая, без ограничения, сердце, печень, почку, толстый кишечник, кишечник, пищевод, желудок, нервные ткани(мозг, спинной мозг), легкое, ткани сосудов (arterии, вены, капилляра), лимфоидные ткани (лимфатическая железа, аденOID, гланда, костный мозг и кровь), селезенка, и фибробласти, и фибробластоподобные клеточные линии (например, клетки TRG-2, клетки IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки цитруллинемии, клетки Демпси, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, клетки HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки MiCl₁, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T3, клетки F9, клетки SV-T2, клетки M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C₃H=H/IOTI/2, клетки HSDM₁C₃, клетки KLN205, клетки МакКоя, L-клетки мыши, штамм 2071 (L-клетки мыши), L-M штамм (L-клетки мыши), L-MTK (L-клетки мыши), NCTC клонны 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1, клетки Swiss/3T3, клетки индийского мунтжака, клетки SIRC, клетки C_{II}, и клетки Дженсена, или их производные) или другие типы клеток известные специалисту в данной области техники.

Клетки могут быть пригодны для адгезивной, монослойной или суспензионной культуры, трансфекции и экспрессии белков, например антител. Клетки могут быть использованы в полунепрерывном, периодическом с подпиткой и проточном или непрерывном способах культивирования.

В одном варианте реализации клетка-хозяин, экспрессирующая рекомбинантный белок, культивируется в биореакторе. В другом варианте реализации биореактор имеет объем по меньшей мере 500 л. В еще одном близком варианте реализации биореактор имеет объем по меньшей мере от 500 до 2000 л. В еще одном близком варианте реализации биореактор имеет объем по меньшей мере от 1000 до 2000 л. В одном варианте реализации настоящего изобретения, культуру клеток получают путем внесения их в биореактор с использованием по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в бессывороточной культуральной среде. В одном варианте реализации изобретение также включает этап сбора рекомбинантного белка, продуцированного клеткой-хозяином. В одном варианте реализации рекомбинантный белок, продуцированный клеткой-хозяином, является очищенным и предоставлен в составе фармацевтически приемлемой лекарственной формы.

Для целей понимания, но без ограничения, специалисту в данной области техники будет ясно, что культуры клеток и циклы культивирования для продуцирования белка могут включать три основных типа, а именно полунепрерывное, расширенное полунепрерывное, периодическое с подпиткой, проточное или их комбинацию. В полунепрерывной культуре клетки изначально культивируются в среде, и эта среда не удаляется, не заменяется или дополняется, т.е. клетки не "подкармливают" свежей средой, во время или до окончания цикла культивирования. Желаемый продукт собирают в конце цикла культивирования.

В периодических культурах с подпиткой цикл выращивания увеличивается путем дополнения питательной среды один или более раз в сутки (или непрерывно) свежей средой во время цикла, т.е. клетки "подкармливают" новой средой ("среда-подкормка") в течение периода культивирования. Периодические культуры с подпиткой могут включать различные режимы и время подпитки, как описано выше, например ежесуточно, через сутки, каждые двое суток и т.д., более чем один раз в сутки или реже чем один раз в сутки и т.д. Также периодические культуры с подпиткой могут дополняться средой-подкормкой непрерывно. Желаемый продукт затем собирают в конце цикла культивирования/продуцирования.

Проточная культура является такой, в которой культура клеток получает свежую перфузионную среду, а отработанная среда удаляется. Перфузия свежей среды в культуре клеток и удаление отработанной среды могут происходить непрерывно, поэтапно, с перерывами или в сочетании любых или всех этих вариантов. Показатели перфузии могут варьировать от менее одного рабочего объема в сутки до множества рабочих объемов в сутки. Предпочтительно клетки сохраняются в культуре, а отработанная среда, которая удаляется, практически не содержит клеток или содержит значительно меньшее количество клеток, чем культура. Рекомбинантные белки, экспрессируемые в культуре клеток, также могут быть сохранены в культуре или удалены с отработанной средой. Удаление отработанной среды может быть достигнуто с помощью ряда средств, включающих центрифугирование, седиментацию или фильтрацию, См., например, Voisard et al., (2003), Biotechnology and Bioengineering, 82:751-65. Предпочтительным способом фильтрации является фильтрация переменным тангенциальным потоком. Переменный тангенциальный поток обеспечивается перекачиванием среды через модули поливолоконных фильтров с использо-

зованием устройства ATF. См., например, патент США № 6544424; Furey (2002), Gen. Eng. News. 22(7), 62-63. Фильтры отделяют частицы по размеру или молекулярной массе. В зависимости от применения, фильтры могут быть выбраны по размеру пор или значению молекулярной массы отсечения (номинальное отсечение по молекулярной массе (MWCO)). Фильтры включают мембранные фильтры, керамические фильтры и металлические фильтры и могут быть любой формы, включая спиральные, или трубчатые, или в форме листа.

Термин "скорость потока перфузии" означает количество среды, которое проходит через (добавленная и удаленная) биореактор, обычно выражается в виде некоторой части или нескольких рабочих объемов за период времени. "Рабочий объем" относится к объему биореактора, используемого для культивирования клеток. В одном варианте реализации скорость потока перфузии составляет один рабочий объем в сутки или менее.

Культура клеток может быть реализована в условиях для малых и больших масштабов производства рекомбинантных белков с использованием культуральных сосудов и/или культуральных аппаратов, которые традиционно применяются в культуре клеток животных или млекопитающих. Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что чашки Петри, Т-колбы и флаконы с перемешиванием используются, как правило, в лабораторных масштабах. Для выращивания в больших масштабах может использоваться такое оборудование, как, без ограничения, биореакторы-ферментеры, эрлифтные биореакторы, биореакторы с псевдоожженным слоем, половолоконные биореакторы, культуры во вращающихся флаконах, биореакторы с механическим перемешиванием, биореакторы с фильтрующим наполнителем и одноразовые пакеты или любые другие подходящие устройства, известные специалисту в данной области техники. Микроносители могут использоваться или не использоваться в сочетании с вращающимися флаконами или биореакторами с механическим перемешиванием. Системы могут использоваться в полуунпрерывном, периодическом с подпиткой или проточном/непрерывном способах культивирования. Кроме того, культуральный аппарат или система могут быть оснащены дополнительным аппаратом, таким как сепаратор клеток на основе фильтров, гравитации, центробежной силы, и т.п.

Производство рекомбинантных белков можно производить в многоэтапных культурных процессах. В многоэтапных процессах клетки культивируют в течение двух или более различных этапов. Например, клетки могут быть культивированы сначала в одной или более фазах роста в условиях, которые увеличивают клеточную пролиферацию и жизнеспособность, затем, перейдя в фазу производства, в условиях, которые увеличивают продуцирование белка. В коммерческих процессах продуцирования рекомбинантных белков клетками млекопитающих обычно существует несколько, например по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более фаз роста, которые происходят в разных культуральных сосудах (N-x - N-1), предшествующих окончательному производству культуры. Фазам роста и продуцирования может предшествовать (или они могут быть разделены) одна или более переходных фаз. Этап продуцирования может вестись в крупных масштабах.

Термин "фаза роста" культуры клеток относится к периоду экспоненциального роста клеток (например, лог фазе), при котором клетки, как правило, быстро размножаются. Клетки сохраняются в фазе роста в течение около одних суток, или около двух суток, или около трех суток, или около четырех суток, или больше четырех суток. Продолжительность времени, в течение которого клетки сохраняются в фазе роста, будет зависеть от типа клеток, и скорости роста клеток, и условия культивирования, например.

Термин "переходная фаза" относится к периоду времени между фазой роста и фазой продуцирования. Как правило, переходная фаза представляет собой время, в течение которого условия среды могут быть контролированы для поддержания перехода от фазы роста к фазе продуцирования. Различные параметры клеточной культуры, которые могут управляться, включают, без ограничения, одно или более из: температуры, осмолярности, витаминов, аминокислот, сахаров, пептонов, аммония и солей.

Термин "фазы продуцирования" культуры клеток относится к периоду времени, когда рост клеток выходит на плато.

Логарифмический рост клеток, как правило, заканчивается перед или во время этой фазы, и начинается продуцирование белка. Процессы периодической подпитки и проточной культуры клеток дополняют клеточную культуральную среду или обеспечивают свежую среду для достижения и поддержания требуемой плотности, жизнеспособности и титра продукта клеток на данном этапе. Этап продуцирования может вестись в крупных масштабах. Масштабные клеточные культуры могут поддерживаться в объеме по меньшей мере около 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10000, 15000, 20000 л. В предпочтительном варианте реализации стадии производства проводится в биореакторах объемом 500, 1000 и/или 2000 л.

Как правило, клеточные культуры, которые предшествуют окончательной продуцирующей культуре, проходят через два предшествующих этапа - системы посевных и инокуляционных ферментеров. Фаза посевного ферментера (N-X) происходит в малых масштабах, где клетки быстро увеличиваются в количестве. На фазе инокуляционного ферментера (N-1) клетки растут, чтобы создать инокуляты для производственного биореактора, такие как инокуляты по меньшей мере с $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Посевные и N-1 системы могут производиться любым культуральным способом, как правило, полуунпрерывными культура-

ми клеток. Значения плотности N-1 клеток $>15\times10^6$ клеток/мл характерны для посевных биореакторов. Более высокие значения плотности N-1 клеток могут уменьшить или даже устраниć время, необходимое для достижения желаемой плотности клеток в производственном биореакторе. Предпочтительным способом для достижения более высоких значений плотности N-1 клеток является проточная культура с применением фильтрации переменным тангенциальным потоком. N-1 культура клеток, выращиваемая при помощи процесса перфузии с применением фильтрации переменным тангенциальным потоком, может обеспечить клетки с любой желаемой плотностью, такой как плотность $>90\times10^6$ клеток/мл или более. N-1 культура клеток может быть использована для создания единичной болюсной инокуляционной культуры или может быть использована в качестве чередующейся культуры посевного фонда, которая поддерживается для инокуляции множества производственных биореакторов. Плотность инокуляции может иметь положительное влияние на уровень продуцирования рекомбинантного белка. Уровни продукта имеют тенденцию к увеличению с увеличением плотности инокуляции. Улучшение титра связано не только с увеличением плотности инокуляции, но, скорее всего, будет под влиянием обмена веществ и состояния клеточного цикла клеток, которые помечены в производство.

Термин "плотность клеток" означает количество клеток в заданном объеме питательной среды. "Плотность жизнеспособных клеток" относится к количеству живых клеток в единице объема питательной среды, как определено стандартными анализами жизнеспособности (например, способом исключения трипанового синего красителя). Термин "объем осажденных клеток" (PCV), также известный как "процентный объем осажденных клеток" (%PCV), представляет собой отношение объема, занимаемого клетками, к общему объему культуры клеток, выраженное в процентах (см. Stettler, et al., (2006), Biotechnol. Bioeng. Dec. 20:95(6):1228-33). Объем осажденных клеток является функцией плотности клетки и диаметра клетки; увеличение в уплотненном объеме клеток могут возникнуть из-за увеличения или плотности клеток, или диаметра клетки, или обоих значений. Объем осажденных клеток является показателем уровня плотности в культуре клеток.

В процессе производства фаза роста может проходить при более высокой температуре, чем фаза продуцирования. Например, фаза роста может проходить при первой заданной температуре от около 35 до около 38°C, а фаза продуцирования может проходить при первой заданной температуре от около 29 до около 37°C, необязательно, от около 30 до около 36°C или от около 30 до около 34°C.

Кроме того, химические индукторы биосинтеза белка, такие как кофеин, бутират/или гексаметиленбисацетамид (HMBA), могут быть добавлены одновременно, до или после смены температуры. Если индукторы добавляются после смены температуры, они могут быть добавлены от 1 ч до 5 суток после смены температуры, необязательно от 1 до 2 суток после смены температуры. Клеточные культуры могут поддерживаться в течение нескольких суток или даже недель, в то время как клетки продуцируют нужный белок(белки).

Другим способом поддержания клеток в нужном физиологическом состоянии является индукция блокирование роста клеток при выращивании культуры клеток в условиях низких концентраций L-аспарагина (см., например, публикацию ВОИС № WO 2013/006479). Блокирование роста клетки может быть достигнуто и поддерживается через культуральную среду, содержащую лимитирующую концентрацию L-аспарагина, и поддержанием низкой концентрации L-аспарагина в культуре клеток. Поддержание концентрации L-аспарагина на уровне 5 mM или менее может быть использовано для поддержания клеток в состоянии заблокированного роста, тем самым увеличивая производительность.

Ингибиторы клеточного цикла - соединения, которые точно или вероятно регулируют протекание клеточного цикла и связанных с ними процессов транскрипции, репарации ДНК, дифференцировки, старения и апоптоза, также применимы для индукции блокирования роста клетки. Ингибиторы клеточного цикла, взаимодействующие с процессами цикла, такие как циклин-зависимые киназы (CDK), являются востребованными, как и молекулы, которые взаимодействуют с белками из других регуляторных путей, такими как AKT, mTOR, и другими путями, которые влияют прямо или опосредованно на клеточный цикл.

Условия культуры клеток, подходящие для способов настоящего изобретения, являются такими, которые обычно используют и известны в периодической культуре, периодической культуре с подпиткой или проточной (непрерывной) культуре клеток или любое сочетание этих способов, с привлечением внимания к pH, растворенному кислороду (O_2) и двуокиси углерода (CO_2), перемешиванию, влажности и температуре.

Способы изобретения могут быть использованы для культивирования клеток, которые экспрессируют необходимые рекомбинантные белки. Экспрессируемые рекомбинантные белки могут быть секретированы в культуральную среду, из которой они могут быть извлечены и/или собраны. Кроме того, белки могут быть очищены или частично очищены от такой культуральной среды или компонента (например, от культуральной среды) с использованием известных процессов и продуктов, известных в данной области техники и/или имеющихся у коммерческих поставщиков. Очищенные белки затем могут быть "сформулированы", что означает замену буфера фармацевтически приемлемым составом, стерилизацию, массовое упаковывание и/или упаковывание для конечного пользователя. Фармацевтически приемлемые

составы могут включать разбавители, носители, солюбилизаторы, эмульгаторы, консерванты и/или адьюванты. Подготовка фармацевтически приемлемых составов находится в рамках квалификации специалиста в данной области техники и включает описанное в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

В одном варианте реализации изобретение предусматривает, что рекомбинантный белок представляет собой гликопротеин. В одном варианте реализации изобретение предусматривает, что рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного слитого белка или цитокина. Также предусматривается, что рекомбинантный белок создан способом согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации рекомбинантный белок предоставлен в составе фармацевтически приемлемой лекарственной формы.

Используемые в настоящем документе термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются как взаимозаменяемые и относятся к молекуле, состоящей из двух или более остатков аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Пептиды, полипептиды и белки также включают модификации, включающие, без ограничения, гликозилирование, приводящее к образованию гликопротеинов, присоединение липидов, сульфатацию, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксилирование и АДФ-рибозилирование.

Используемый в настоящем документе термин "гликопротеин" относится к пептидам и белкам, включающим антитела, имеющим по меньшей мере одну боковую цепь олигосахарида, содержащую остатки маннозы. Гликопротеины могут быть гомологичными клетке-хозяину или могут быть гетерологичными, т.е. привнесенными в используемую клетку-хозяина, такие как, например, человеческий гликопротеин, продуцируемый клеткой-хозяином яичника китайского хомячка (СНО). Такие гликопротеины, как правило, называют "рекомбинантные гликопротеины". В некоторых вариантах реализации гликопротеины, экспрессируемые клеткой-хозяином, секретируются непосредственно в среду.

Белки могут иметь научный или коммерческий интерес, включая, лекарства, основанные на белках. Белки включают, среди прочего, антитела, химерные белки и цитокины. Пептиды, полипептиды и белки могут быть получены из рекомбинантной линии клеток животных с использованием методов культуры клеток и могут упоминаться как "рекомбинантный пептид", "рекомбинантный полипептид" и "рекомбинантный белок". Экспрессируемый белок(и) может продуцироваться внутриклеточно или секретироваться в питательную среду, из которой он может быть извлечен и/или собран.

Неограничивающие примеры белков млекопитающих, которые могут быть с успехом продуцированы способами настоящего изобретения, включают белки, содержащие аминокислотные последовательности, идентичные или по существу аналогичные полностью или частично одному из следующих белков: фактор некроза опухоли (ФНО), лиганд flt3 (WO 94/28391), эритропоэтин, тромбопоэтин, кальцитонин, ИЛ-2, англопоэтин-2 (Maisonneuve et al. (1997), Science, 277(5322):55-60), лиганд для активатора рецептора фактора NF-кappa B (RANKL, WO 01/36637), связанный с фактором некроза опухоли (ФНО) апоптоз-индуцирующий лиганд (TRAIL, WO 97/01633), стромы тимуса-производный лимфопоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-макрофаговый колониестимулирующий фактор (GM-CSF, патент Австралии № 588819), фактор роста тучных клеток, фактор роста стволовых клеток (патент США № 6204363), эпидермальный фактор роста, фактор роста кератиноцитов, мегакариотический фактор роста и развития, хемокин, выделяемый Т-клетками при активации (RANTES), человеческий фибриноген-подобный белок 2 (FGL2; учетный номер NCBI NM_00682; Rüegg and Pytela (1995), Gene 160:257-62), гормон роста, инсулин, инсулиноподобные факторы роста, паратиреоидный гормон, интерфероны, включающие, α -интерфероны, γ -интерферон и консенсусные интерфероны (патенты США № 4695623 и 4897471), фактор роста нервов, нейротрофический фактор головного мозга, синаптотагмин-подобные белки (SLP 1-5), нейротропин-3, глюкагон, интерлейкины, колониестимулирующие факторы, лимфотоксин-Р, фактор, ингибирующий лейкемию, и онкостатин-М. Описания белков, которые могут быть продуцированы согласно способам изобретения, можно найти, например, в Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, all volumes (Aggarwal and Gutierrez, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993) и The Cytokine Handbook, Vols. 1 and 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

Кроме того, способы изобретения будут полезны для того, чтобы продуцировать белки, содержащие всю или часть аминокислотной последовательности рецептора для любого из вышеупомянутых белков, антагониста такого рецептора или любого из вышеупомянутых белков и/или белков, в значительной степени аналогичных таким рецепторам или антагонистам. Эти рецепторы и антагонисты включают обе формы рецептора фактора некроза опухоли (TNFR, также известный как p55 и p75, патенты США № 5395760 и 5610279), рецепторы интерлейкина-1 (ИЛ-1) (типы I и II; патент ЕП № 0460846, патенты США № 4968607 и 5767064), антагонист рецептора ИЛ-1 (патент США № 6337072), антагонисты или ингибиторы ИЛ-1 (патенты США № 5981713, 6096728 и 5075222), рецепторы ИЛ-2, рецепторы ИЛ-4 (патент ЕП № 0367566 и патент США № 5856296), рецепторы ИЛ-15, рецепторы ИЛ-17, рецепторы ИЛ-18, рецепторы Fc, рецептор гранулоцитарно-макрофагового колониестимулирующего фактора, рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, рецептор для онкостатина-М и фактора ингиби-

вания лейкемии, активатор рецептора NF-каппа В (RANK, WO 01/36637 и патент США № 6271349), остеопротегерин (патент США № 6015938), рецепторы TRAIL (ФНО-зависимого лиганда, индуцирующего апоптоз) (включая рецепторы TRAIL 1, 2, 3 и 4) и рецепторы, которые содержат домены смерти, такие как Fas или апоптоз-индуцирующий рецептор (AIR).

Другие белки, которые могут быть получены с использованием настоящего изобретения, включают белки, содержащие всю или часть аминокислотной последовательности дифференцировочных антигенов (именуемые CD белками) или их лиганды и белки, существенно похожие на любой из этих. Такие антигены раскрыты в Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VI International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996). Похожие CD белки раскрыты в последующих семинарах. Примеры таких антигенов включают CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 и лиганды к ним (лиганд CD27, лиганд CD30 и др.). Некоторые антигены CD являются членами семейства рецепторов ФНО, которое также включает 41BB и OX40. Лицаны часто являются членами семейства ФНО, как, например, лиганды 41BB и лиганды OX40.

Ферментативно активные белки или их лиганды также могут быть получены с использованием настоящего изобретения. Примеры включают белки, содержащие весь или часть из следующих белков или их лигандов или белка, существенно похожего на один из этих: представители семейства доменов дизентегрина и металлопротеиназы, включая ФНО-альфа конвертирующий фермент, различные киназы, глюкоксферозидаза, супероксиддисмутаза, тканевой плазминогенный активатор, фактор VIII, фактор IX, аполипопротеин Е, аполипопротеин А-I, глобины, антагонист ИЛ-2, альфа-1 антитрипсин, лиганды для любого из упомянутых выше ферментов, а также множество других ферментов и их лиганды.

Термин "антитело" включает ссылки как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса или на их антигенсвязывающую область, которая конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное, включающие человеческие, гуманизированные, химерные, мульти-специфические, моноклональные, поликлональные и олигомеры или их антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, включены белки, имеющие антигенсвязывающий фрагмент или участок, такой как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, диатела, Fd, dAb, макситела, молекулы одноцепочечных антител, фрагменты участка, определяющего комплементарность (CDR), scFv, диатела, триатела, тетратела и полипептиды, содержащие по меньшей мере часть иммуноглобулина, которая является достаточной для выработки специфического антигена, связывающего целевой полипептид. Термин "антитело" включает, без ограничения, таковые, которые получены, экспрессированы, созданы или изолированы рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела.

Примеры антител включают, без ограничения, те, которые распознают любой один или комбинацию белков, включая, без ограничения, вышеупомянутые белки и/или следующие антигены: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-7, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-10, субъединицы рецептора ИЛ-2, рецептора ИЛ-4, рецептора ИЛ-6, рецептора ИЛ-13, рецептора ИЛ-18, FGL2, PDGF- β и их аналоги (см. патенты США № 5272064 и 5149792), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (TGF), TGF- β 2, TGF- β 1, рецептор эпидермального фактора роста (EGF) (см. патент США № 6235883) рецептор VEGF, фактор роста гепатоцитов, лиганд остеопротегрина, интерферон гамма, стимулятор В лимфоцитов (BlyS, также известный как BAFF, THANK, TALL-1 и ZTNF4; см. Do and Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1):19-25), C5 комплемент, IgE, опухолевый антиген CA125, опухолевый антиген MUC1, PEM антиген, LCG (представляющий собой генетический продукт, экспрессируемый ассоциировано с раком легкого), HER-2, HER-3, опухолеассоциированный гликопротеин TAG-72, SK-1 антиген, опухолеассоциированные эпитопы, которые присутствуют в повышенных количествах в сыворотке крови пациентов с раком толстой кишки и/или раком поджелудочной железы, рак-ассоциированные эпитопы или белки, экспрессируемые в раковых клетках груди, прямой кишки, сквамозных клетках простаты, поджелудочной железы, легкого и/или почки, и/или в клетках меланомы, глиомы или нейробластомы, некротического ядра опухоли, интегрин-альфа4бета7, интегрин VLA-4, интегрины B2, рецепторы TRAIL 1, 2, 3 и 4, рецептор активатора ядерного фактора каппа В (RANK), лиганд RANK, ФНО- α , молекула адгезии VAP-1, молекула адгезии эпителиальной клетки (EpCAM), межклеточная молекула адгезии-3 (ICAM-3), адгезии лейкоинтегрина, тромбоцитарный гликопротеин гр IIb/IIIa, тяжелая цепь сердечного миозина, паратиреоидный гормон, tRNAPc2 (который является ингибитором фактора клеточного фактора-VIIa), главный комплекс гистосовместимости (MHC) I, карциноэмбриональный антиген (CEA), альфа-фетопротеин (AFP), фактор некроза опухоли (ФНО), CTLA-4 (который является цитотоксическим Т лимфоцит-ассоциированным антигеном), рецептор Fc- γ -1, HLA-DR 10 бета, HLA-DR антиген, склеростин, L-селектин, респираторно-синцитиальный вирус, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (HBV), Streptococcus mutans и Staphylococcus aureus. Конкретные примеры известных антител, которые могут быть получены с использованием способов настоящего изобретения, включают, без ограничения, адалимумаб, бевацизумаб, инфликсимаб, абциксимаб, алемтузумаб, бапинейзумаб, базиликсимаб, белимумаб, бриакинумаб, канакинумаб, цертолизумаб пегол, цетук-

симаб, конатумумаб, деносумаб, экулизумаб, гемтузумаб озогамицина, голимумаб, ибритутомаб тиуксентан, лабетузумаб, мапатумумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, муромонаб-CD₃, натализумаб, нимотузумаб, офатумумаб, омализумаб, ореговомаб, паливизумаб, панитумумаб, пемтумомаб, пертузумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, ровелизумаб, тоцилизумаб, тозитумомаб, трастузумаб, устекинумаб, ведолизомаб, залутумумаб и занолимумаб.

Изобретение также может быть использовано для получения рекомбинантных химерных белков, включая, например, любой из вышеперечисленных белков. Например, рекомбинантные химерные белки, содержащие один из вышеупомянутых белков плюс домен мультимеризации, такие как лейциновая "молния", суперспираль, Fc фрагмент иммуноглобулина, или аналогичный белок, могут быть получены с использованием способов настоящего изобретения. См., например, WO 94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science, 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), Science, 262:1401-05; Harbury et al. (1994), Nature, 371:80-83; Håkansson et al. (1999), Structure, 7:255-64. В частности, включены среди других рекомбинантных химерных белков белки, в которых участок рецептора представляет собой слитый с Fc участком антитела, таким как этанерцепт (p75 TNFR:Fc) и белатацепт (CTLA4:Fc). Химерные белки и полипептиды, а также фрагменты, или участки, или мутанты, варианты, аналоги какого-либо из вышеупомянутых белков и полипептидов также входят в подходящие белки, полипептиды и пептиды, которые могут быть получены методами настоящего изобретения.

В то время как терминология, используемая в настоящем документе, является стандартной в данной области техники, определения некоторых терминов приведены в настоящем документе, чтобы обеспечить ясность и определенность значения формулы изобретения. Единицы, приставки и символы могут быть обозначены в их общепринятой форме системы СИ. Числовые диапазоны, указанные в настоящем документе, включают числа, определяющие диапазон, и включают всякое целое число в пределах заданного диапазона. Способы и методики, описанные в настоящем документе, как правило, выполняются в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем документе, если не указано иное. См., например, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Все документы или части документов, процитированные в настоящем документе, включая, без ограничения, патенты, заявки на патенты, статьи, книги и трактаты, тем самым явным образом включены посредством ссылки. То, что описано в варианте реализации настоящего изобретения, может быть объединено с другими вариантами реализации настоящего изобретения.

Настоящее изобретение не ограничено в возможностях конкретными вариантами реализации, описанными в настоящем документе, которые служат в качестве единой иллюстрации отдельных аспектов изобретения, и функционально эквивалентные способы и компоненты находятся в пределах объема настоящего изобретения. Более того, различные модификации изобретения, помимо представленных и описанных в настоящем документе, станут очевидными специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания и сопроводительных графических материалов. Такие модификации предназначены для попадания в сферу прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1.

Было обнаружено, что уровни внеклеточного орнитина коррелируют с содержанием высокоманнозных гликоформ. Восемь линий клеток CHO, экспрессирующих рекомбинантные антитела, с содержанием высокоманнозных гликоформ от <5 до >20%, были выбраны для этого эксперимента (клеточная линия А - клеточная линия Н). Клетки выращивали в 10-дневной периодической культуре с подпиткой в стряхиваемых колбах с применением двух различных специализированных сред для культур клеток, каждая из которых не содержала орнитин (среда № 1 и среда № 2). Пробы отработанной среды отбирали на 8, 9 и 10 сутки культивирования и подвергали масштабным анализам метаболомики. % НМ (уровень высокоманнозных гликанов) был определен с применением способа Endo-H rCE-SDS, позже замененного способом жидкостной хроматографии, основанным на гидрофильном взаимодействии (HILIC), описанным ниже. Относительные уровни орнитина в отработанной среде были определены масштабными анализами метаболомики, в которых компоненты среды были разделены при помощи жидкостной хроматографии и определены при помощи спектрометрии высокого разрешения. Компоненты были определены путем сопоставления их спектров фрагментации с библиотекой спектров известных соединений. Относительное содержание каждого компонента определяли по площади пика его сигналов масс-спектрометрии. Уровни высокоманнозных гликанов (% НМ) секретируемых рекомбинантных моноклональных антител клеточных линий А-Н на 8, 9 и 10 сутки на среде № 1 и среде № 2 представлены на фиг. 2А и В. Фиг. 2С демонстрирует взаимосвязь между % высокоманнозных гликанов и уровнями внеклеточного орнитина. Корреляция определялась путем сравнения всех восьми клеточных линий (представленных в виде квадратов), используя данные 9-суточных образцов. Полученные результаты указывают на сильную корреляцию между содержанием высокоманнозных гликоформ и уровнями внеклеточ-

ного орнитина.

Далее клеточная линия Н выращивалась в периодической культуре с подпиткой в биореакторе объемом 3 л.

Продолжительность выращивания составила 12 суток. Четыре болюсные подпитки 7, 9, 9 и 9% были проведены на 3, 5, 7 и 9 сутки. Кроме того, 50% раствор глюкозы добавляются ежесуточно, начиная на 3 сутки, как требуется для поддержания концентрации глюкозы выше 2 г/л. Производственные биореакторы инокулировали с концентрацией 15×10^5 клеток/мл после 4 суток роста. Клетки поддерживали в среде роста до начала фазы продуцирования. Затем сравнивались восемь различных условий процесса. Условие № 1 выступало в качестве контроля. В производственную подпиточную среду не вносили никаких изменений.

В условии № 2 производственная подпиточная среда была дополнена бетаином в концентрации 24 mM на 0 сутки. Дальнейшее дополнение бетаином не производилось. Четыре болюсные подпитки 7, 9, 9 и 9% были проведены на 3, 5, 7 и 9 сутки. Кроме того, 50% раствор глюкозы добавляется ежесуточно, начиная на 3 сутки, как требуется для поддержания концентрации глюкозы выше 2 г/л.

В условиях № 3 и 4 было испытано удаление сульфата меди. Сульфат меди был удален из порошка производственной среды. Условие № 3 служило в качестве контроля, маточный раствор сульфата меди был добавлен в базовую среду. В условии № 4 сульфат меди не добавлялся ни в одну среду, создавая условия среды с дефицитом меди. В обоих условиях № 3 и 4 производилась обработка одинаковой болюсной "подпиточной" средой содержащей медь.

В условиях № 5-8 была испытана высокая и низкая осмолярность. В условиях № 5 и 6, клетки подпитывали 90% производственной базовой средой, т.е. предоставлялось на 10% меньше питательных веществ, что означает получение клеток, испытывающих сниженную осмолярность. В условии № 6 клеточная культуральная среда была возвращена до уровня контроля ~300 мОsm путем титрования NaCl. В условиях № 7 и 8 клетки подпитывали 85% средой подпитки, при этом среда в состоянии № 8 была возвращена к контрольному уровню путем титрования NaCl.

Пробы отработанной среды отбирали на 3, 6, 8, 9 и 10 сутки культивирования и подвергали масштабным анализам метаболомики.

И в этом случае существовала значительная корреляция между уровнями внеклеточного орнитина и содержанием высокоманнозных гликоформ. Фиг. 3А демонстрирует процентные уровни высокоманнозных гликанов, установленные для клеточной линии Н, подвергшейся восьми различным условиям в биореакторах (№ 1-8). Фиг. 3В демонстрирует соответствующие уровни внеклеточного орнитина. Фиг. 3С демонстрирует взаимосвязь между % высокоманнозных гликанов и уровнями внеклеточного орнитина. Корреляция определялась путем сравнения всех восьми условий (представленных в виде квадратов), используя данные 9-суточных образцов.

Пример 2.

Уровни экспрессии мРНК.

Аргиназы 1 были измерены на выбранные сутки в течение 10-суточного полунепрерывного культивирования с подпиткой на восьми клеточных линиях, описанных в примере 1.

Уровни экспрессии мРНК оценивали с помощью набора QuantiGene Multiplex Assay kit (Affymetrix, Inc., Санта Клара, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя.

Аргиназа 1 - фермент, катализирующий превращение аргинина в орнитин, как было обнаружено, был активирован в клеточных линиях с повышенными уровнями высокоманнозных гликанов, в зависимости от времени, см. фиг. 4. Это говорит о том, что специфическое нацеливание ингибиторов аргиназы для блокировки активности аргиназы и уменьшения объема производства орнитина может быть использовано для снижения уровня высокоманнозных гликанов.

Пример 3.

Данный пример демонстрирует управление содержанием высокоманнозных гликоформ рекомбинантных гликопротеинов путем регулирования накопления орнитина в клетке-хозяине, экспрессирующей рекомбинантный гликопротеин.

Клеточные линии, клеточные культуры и среды.

В данном исследовании были использованы клеточные линии Н. Клетки культивировали в 3 л встряхиваемых колбах Эрленмейера (Corning Life Sciences, Лоуэлл, Массачусетс), с 1 л рабочего объема и культивировали в условиях стандартного увлажнения при температуре 36°C, 5% CO₂, и встряхивании при 70 об/мин в автоматическом инкубаторе CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Клетки были субкультивированы на селективной питательной среде, содержащей 500 нМ концентрацию метотрексата (MTX) каждые 4 суток, а затем последовательно были перенесены, инокулированы и культивированы в питательной среде в течение четырех суток, а затем засеяны в 24-луночные планшеты для опытов, описанных ниже.

Мелкомасштабная контрольная перфузия.

Модифицированная контрольная перфузия в 24-луночный планшет с глубокими лунками (Axygen, Юнион-Сити, Калифорния) использовалась для оценки воздействия концентраций спермина, аргинина, орнитина и аргиназы на модуляцию высокоманнозных гликанов (HMN). Безаргининовый состав перфу-

зионной среды был использован для мелкомасштабного контрольного перфузационного эксперимента № 3 (исследования концентрации аргинина) согласно плану эксперимента. В мелкомасштабном контролльном перфузационном эксперименте № 4 все ингибиторы аргиназы были добавлены в перфузционную среду. Четыре ингибитора аргиназы: BES гидрохлорид, DL- α -дифторметилорнитин гидрохлорид, соль N^G-гидрокси-L-аргинин моноацетата и соль N^ω-гидрокси-нор-аргинин диацетата были приобретены в EMD Millipore Corporation (Биллерики, Массачусетс).

Вкратце, клетки СНО были помещены в планшеты с запланированной плотностью от $10\text{--}20 \times 10^6$ клеток/мл, 3 мл рабочего объема для каждой лунки. Клетки культивировали при температуре 36°C, 5% CO₂, 85% относительной влажности и качали при 225 об/мин на орбитальном инкубаторе Kuhner диаметром 50-мм (Kuhner AG, Базель, Швейцария) 3 или 4 суток. Каждые 24 ч клетки центрифугировали при 200×g в течение 5 мин (Beckman Coulter, Бри, Калифорния) для сбора отработанной среды и каждая лунка была затем заново заполнена 3 мл свежей среды. Собранная отработанная среда была проанализирована на титр, ключевые метаболиты и % высокоманнозных гликанов (% HMN) (при необходимости). Затем клетки собирали и измеряли количество клеток и их жизнеспособность.

Анализы роста клеток, метаболитов и титра антител.

Плотность жизнеспособных клеток и жизнеспособность определяли с использованием Cedex cell counter (Roche Innovative, Билемфельд, Германия). Метаболиты, включая глюкозу, лактат, аммиак, глутамин, глутамат, были получены от NovaBioprofile Flex (Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс). Концентрация антител в отработанной среде определялась с использованием сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ) по аффинности к протеину A (Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс), оснащенной с колонкой POROS A/20 protein A диаметром 50×4,6 мм. (Life Technologies, Карлсbad, Калифорния). После того как образец был введен, колонку промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), pH 7,1, для удаления белков клетки-хозяина СНО. Связанные антитела затем элюировали в кислом PBS буфере (pH 1,9) и выявляли при помощи УФ-поглощения при 280 нм для количественного определения концентрации антител.

Картирование гликанов при помощи HILIC.

Различные виды N-гликанов антител анализировали при помощи жидкостной хроматографии, основанной на гидрофильном взаимодействии (HILIC). Очищенные антитела обрабатывались N-глюкозидазой F (New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс) при 37°C в течение 2 ч, для освобождения гликанов. Освобожденные гликаны были помечены 2-амиnobензойной кислотой и очищены с использованием картриджей GlycoClean S (Prozyme, Хейфорд, Калифорния). Затем очищенные гликаны были обессолены и растворены в воде для проведения анализа. HILIC хроматографию проводили на колонке BEH Glycan диаметром 100×2,1 мм с использованием СВЭЖХ (Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс), и элюированные гликаны были обнаружены, идентифицированы и оценены количественно при помощи детектора флуоресценции на основе разного времени элюирования различных гликанов.

Эксперимент мелкомасштабной контрольной перфузии № 1: Исследование концентрации спермина.

В данном исследовании были испытаны пять различных концентраций спермина. Была испытана перфузационная питательная среда, содержащая 0, 7, 17, 35 и 100 мкМ тетрагидрохлорида спермина (спермин 4HCl). Перфузационная среда, содержащая 35 мкМ спермина, выступала в качестве контроля. Результаты от пяти суточных образцов демонстрируют, что при уменьшении концентрации спермина снижается % HMN, см. фиг. 5. Уменьшение/истощение спермина не оказывало влияния на титр. Снижение уровня HM было достигнуто за счет снижения уровня орнитина, при снижении количества спермина в среде. Как показано на фиг. 6, количество орнитина уменьшается с уменьшением концентрации спермина.

Эксперимент мелкомасштабной контрольной перфузии № 2: Исследование концентрации орнитина.

Были испытаны четыре различные концентрации L-орнитина моногидрохлорида. Использовалась перфузационная питательная среда, содержащая 14,8, 6, 0,6 и 0 (контроль) мМ L-орнитина моногидрохлорида (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури). Результаты показали, что, когда концентрация орнитина увеличивалась, % HMN также увеличивался, см. фиг. 7. Второй эксперимент проводили с использованием клеточной линии I в 2-литровых биореакторах. Клеточная линия I экспрессировала антитело IgG2 и выращивалась в условиях периодической культуры с подпиткой в одном биореакторе, среда получала единичную добавку 0,1 г/л L-орнитина моногидрохлорида на нулевые сутки культивирования, второй биореактор выступал в качестве безорнитинового контроля. Культуры сохраняли от 12 суток в клеточной культуральной среде, содержащей соевые гидролизаты. Болюсная среда-подкормка, содержащая соевый гидролизат, вводилась на 4 и 8 сутки.

Профильтрование гликанов проводили при помощи картирования пептидов. Антитела были обработаны трипсином способом, похожим на описанный Рен с соавт. (2009), Annal. Biochem. 392, 12-21). В частности, около 50-70 мкг каждого антитела было денатурировано и восстановлено при помощи 7,0 М гуанидина монохлорида, 6 мМ дитиотреитола (ДТТ) в 0,2 М трис-буфере (pH 7,5) при 37°C в течение 30 мин. Каждый денатурированный/восстановленный образец был алкилирован с 14 мМ йодуксусной кислоты при 25°C в течение 25 мин, затем происходило гашение реакции путем добавления 8 мМ ДТТ.

Восстановленные/алкилированные образцы антител затем были перенесены в 0,1 М трис-буфер при рН 7,5 детергент-удаляющими спин-колонками Пирса (Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс) согласно предлагаемому производителем протоколу. Переведенный в буфер образец инкубировали при 37°C с 3,5 мкг трипсина в течение 60 мин. Ферментативную обработку гасили путем добавления 2,2 мкл 10% уксусной кислоты. Около 12-17 мкг обработанного антитела вводили для анализа.

Обработанные ферментом антитела анализировали с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1260, напрямую связанной с масс-спектрометром Thermo Scientific LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс). Протеолитические пептиды были разделены на колонке Waters BEH 300 C18 (Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс) 2,1×150 мм, 1,7 мкм частиц при 40°C со скоростью потока 0,2 мл/мин. Подвижная фаза А составляла 0,02% ТФК в воде, и подвижная фаза В составляла 0,018% ТФК в ацетонитриле. Пептиды были элюированы с градиентом 0,5-40% В за 90 мин с последующей промывкой и повторным уравновешиванием колонки. Масс-спектрометр был настроен на полное МС сканирование с орбитальной ловушкой с разрешением 120000, а затем следуют пять зависящих от данных ДИС (диссоциацией, индуцированной столкновениями) МС/МС сканирований с линейной ловушкой с динамической изоляцией. Автоматизированный анализ данных для профилирования гликанов проводили с использованием MassAnalyzer (см. Zhang, (2009), Analytical Chemistry, 81:8354-8364).

Результаты снова показали, что, когда концентрация орнитина увеличивалась, % НМ также увеличивался, см. фиг. 8.

Эксперимент мелкомасштабной контрольной перфузии № 3: Исследование концентрации аргинина.

В данном исследовании были испытаны пять различных концентраций аргинина. Была испытана перфузационная питательная среда, содержащая 3,686, 1,38, 0,92 и 0,46 г/л аргинина. Перфузационная культура, содержащая 1,843 г/л аргинина, выступала в качестве контроля. Результаты показали, что, когда концентрация аргинина увеличивалась, % НМ также увеличивался, см. фиг. 9.

Эксперимент мелкомасштабной контрольной перфузии № 4: Исследования ингибитора аргиназы.

Было проведено две серии экспериментов с ингибитором аргиназы. В первой серии экспериментов четыре коммерчески доступных ингибитора аргиназы: ВЕС гидрохлорид, DL- α -дифторметилорнитин гидрохлорид, соль N^G-гидрокси-L-аргинин моноацетата (NG) и соль N ω -гидрокси-нор-аргинин диацетата были добавлены в культуры клеток в трех различных концентрациях: 1, 10 и 20 мкМ. Контроль не содержал ингибитор. Из этого эксперимента был сделан вывод, что ингибиторы ВЕС и DL- α являются наиболее эффективными в снижении % НМ (фиг. 10).

Вторая серия экспериментов проведена с использованием двух ингибиторов: ВЕС и DL- α . Ингибитор ВЕС был испытан в концентрациях 0 (контроль), 10 мкМ и 0,5 мМ в перфузционной питательной среде. Ингибиторы DL- α были испытаны в концентрациях 0 (контроль), 10 мкМ, 1,0 мМ и 2,0 мМ в перфузционной питательной среде. Было показано, что % НМ понижался при повышении концентраций обоих ингибиторов, см. фиг. 11.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения рекомбинантного белка, имеющего пониженное содержание высокоманнозных гликоформ, включающий культивирование клетки-хозяина, экспрессирующую рекомбинантный белок, в культуральной среде, содержащей ингибитор аргиназы для понижения содержания высокоманнозных гликоформ рекомбинантных белков по сравнению с рекомбинантным белком, продуцированным в культуре клеток, не содержащей указанного ингибитора аргиназы.

2. Способ по п.1, где ингибитор аргиназы выбран из группы, состоящей из N^G-гидрокси-L-аргинин моноацетата, N ω -гидрокси-нор-аргинин диацетата, S-(2-борэтил)-L-цистеина (ВЕС) и DL- α -дифторметилорнитина (DFMO).

3. Способ по п.1, где ингибитор аргиназы представляет собой ВЕС.

4. Способ по п.1, где ингибитор аргиназы представляет собой DFMO.

5. Способ по п.1, где ингибитор аргиназы представляет собой:

(a) N^G-гидрокси-L-аргинин моноацетат, имеющий концентрацию от 1 до 20 мкМ;

(b) N ω -гидрокси-нор-аргинин диацетат, имеющий концентрацию выше 1 мкМ;

(c) ВЕС, имеющий концентрацию по меньшей мере 10 мкМ; или

(d) DFMO, имеющий концентрацию по меньшей мере 10 мкМ.

6. Способ по п.5, где ингибитор аргиназы представляет собой:

(a) N ω -гидрокси-нор-аргинин диацетат, имеющий концентрацию до 20 мкМ;

(c) ВЕС (S-(2-борэтил)-L-цистеин), имеющий концентрацию до 0,5 мМ; или

(d) DFMO, имеющий концентрацию до 2 мМ.

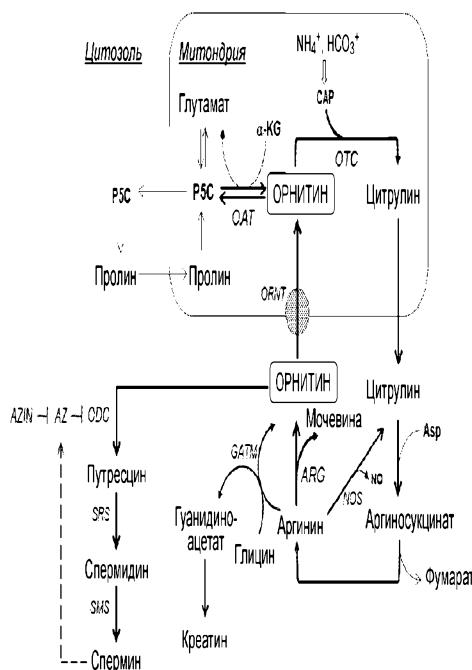
7. Способ по п.6, где ингибитор аргиназы выбран из группы, состоящей из N ω -гидрокси-нор-аргинин диацетата, ВЕС и DFMO, где концентрация ингибитора аргиназы составляет 10 мкМ.

8. Способ по п.6, где ингибитор аргиназы выбран из группы, состоящей из ВЕС и DFMO, где концентрация ингибитора аргиназы составляет от 10 до 20 мкМ.

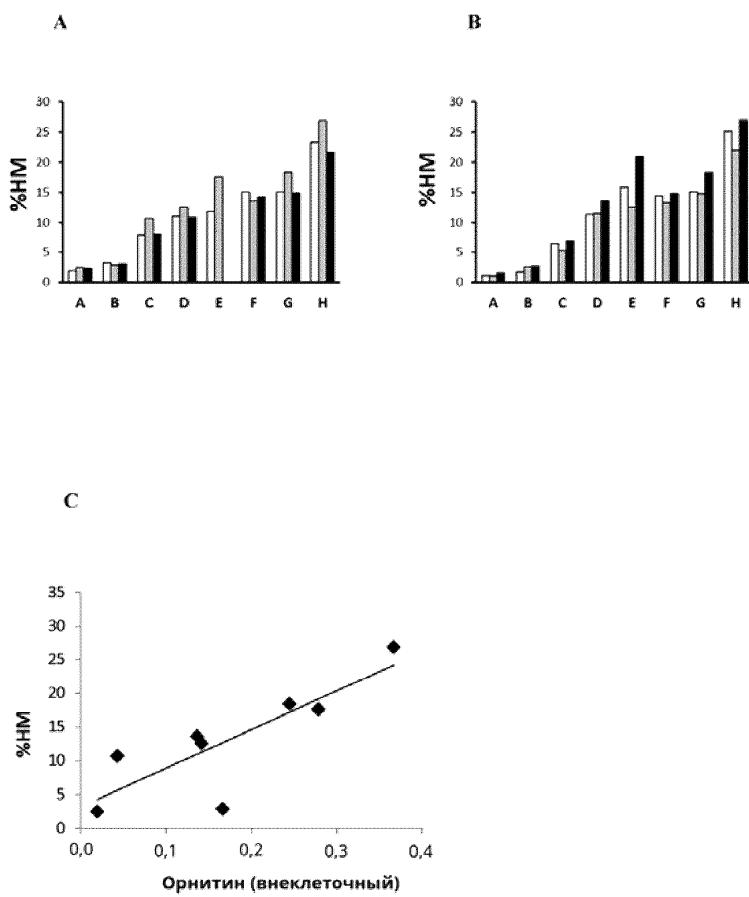
9. Способ по п.6, где ингибитор аргиназы представляет собой ВЕС в концентрации 0,5 мМ или

DFMO в концентрации 1 мМ.

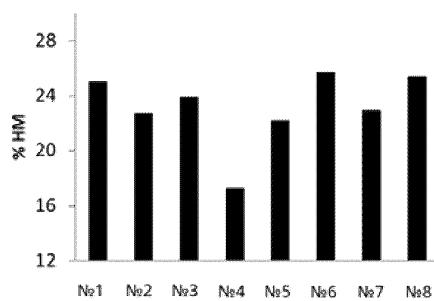
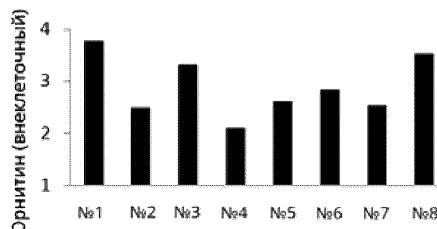
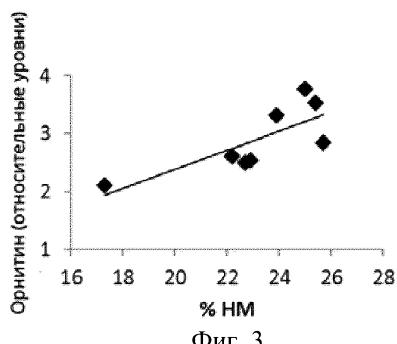
10. Способ по п.6, где ингибитор аргиназы представляет собой DFMO в концентрации 2 мМ.
11. Способ по п.1, где клетку-хозяина, экспрессирующую рекомбинантный белок, культивируют в периодической культуре, периодической культуре с подпиткой, проточной культуре или их комбинации.
12. Способ по п.11, где культура представляет собой перфузионную культуру.
13. Способ по п.12, где перфузия включает непрерывную перфузию.
14. Способ по п.12, где скорость перфузии является постоянной.
15. Способ по п.12, где перфузия осуществляется со скоростью менее чем или равной 1,0 рабочему объему в сутки.
16. Способ по п.12, где перфузия достигается путем чередования тангенциальных потоков.
17. Способ по п.1, где клетка-хозяин, экспрессирующая рекомбинантный белок, культивируется в биореакторе.
18. Способ по п.17, где биореактор имеет объем по меньшей мере 500 л.
19. Способ по п.17, где биореактор имеет объем по меньшей мере от 500 до 2000 л.
20. Способ по п.17, где биореактор имеет объем от 1000 до 2000 л.
21. Способ по п.17, где биореактор инокулирован по меньшей мере $0,5 \times 10^6$ клеток/мл.
22. Способ по п.1, где клетку-хозяина, экспрессирующую рекомбинантный белок, культивируют в бессывороточной среде культивирования клеток.
23. Способ по п.22, где бессывороточная среда культивирования клеток представляет собой проточную среду культивирования клеток.
24. Способ по п.1, где клетки-хозяева являются клетками млекопитающего.
25. Способ по п.1, где клетки-хозяева являются клетками яичника китайского хомячка (CHO).
26. Способ по п.1, где рекомбинантный белок представляет собой гликопротеин, секреируемый непосредственно в культуральную среду.
27. Способ по п.1, где рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного химерного белка или цитокина.
28. Способ по п.1, дополнительно включающий этап сбора рекомбинантного белка, произведенного клеткой-хозяином.
29. Способ по п.1, дополнительно включающий очистку указанного рекомбинантного белка.
30. Рекомбинантный белок с пониженным содержанием высокомолекулярных гликоформ, полученный способом по любому из пп.1-29.
31. Рекомбинантный белок по п.30 в очищенной форме.
32. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный белок по п.31.



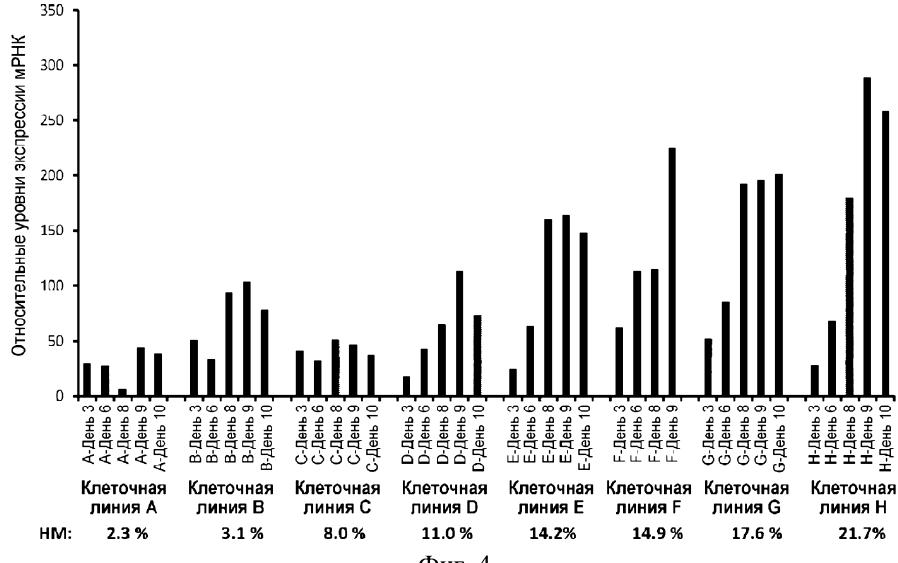
Фиг. 1



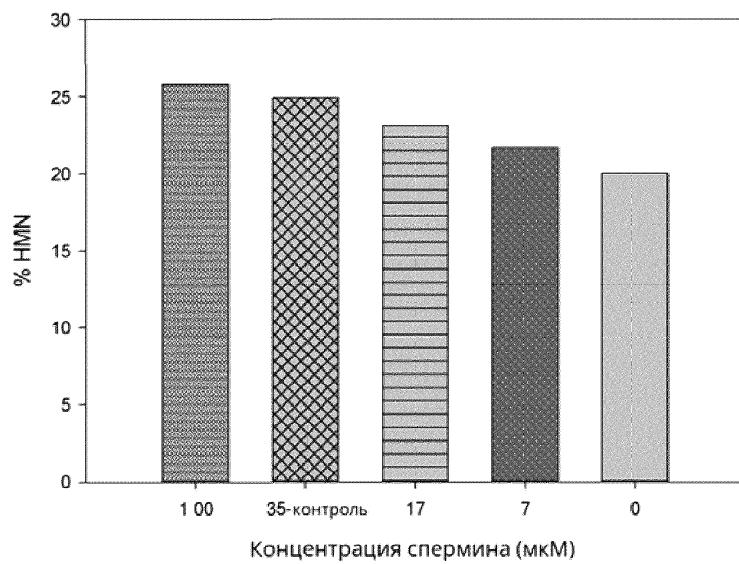
Фиг. 2

A**B****C**

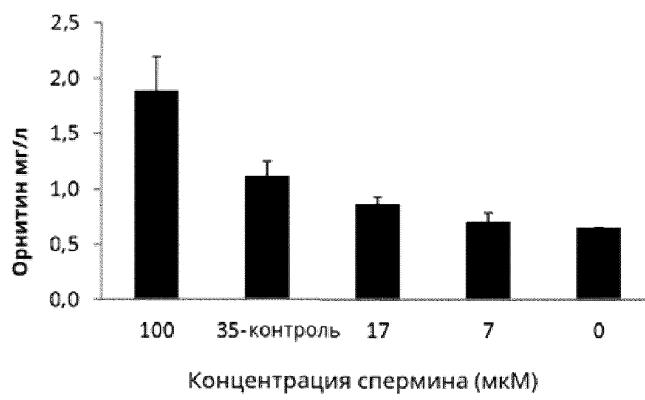
Фиг. 3



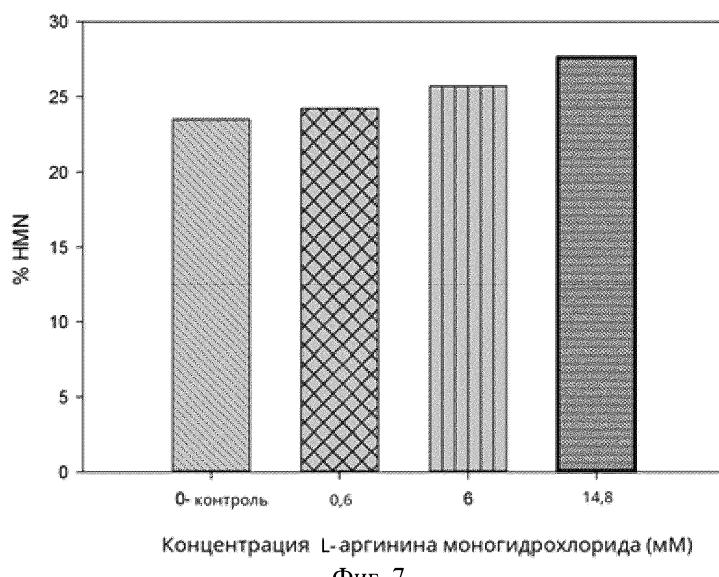
Фиг. 4



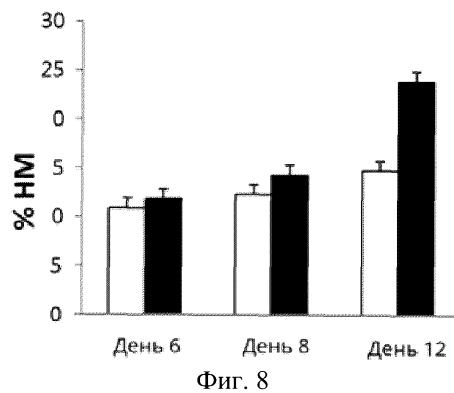
Фиг. 5



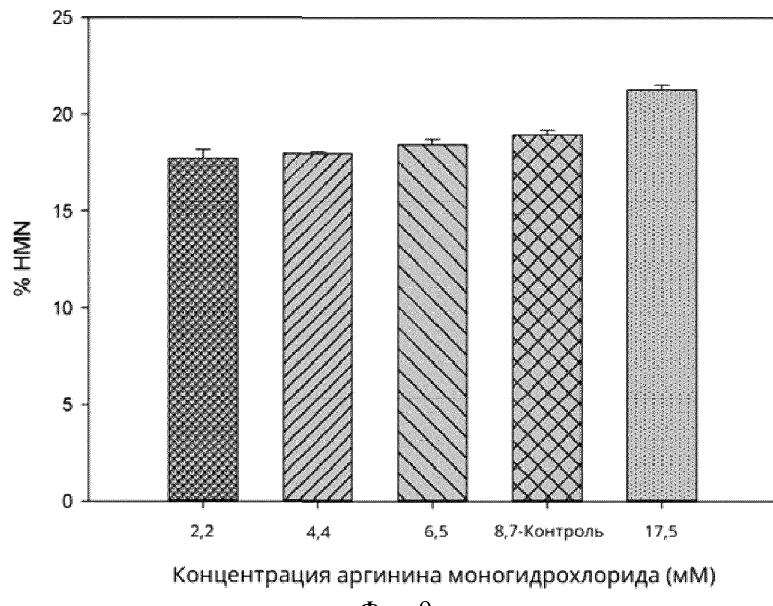
Фиг. 6



Фиг. 7

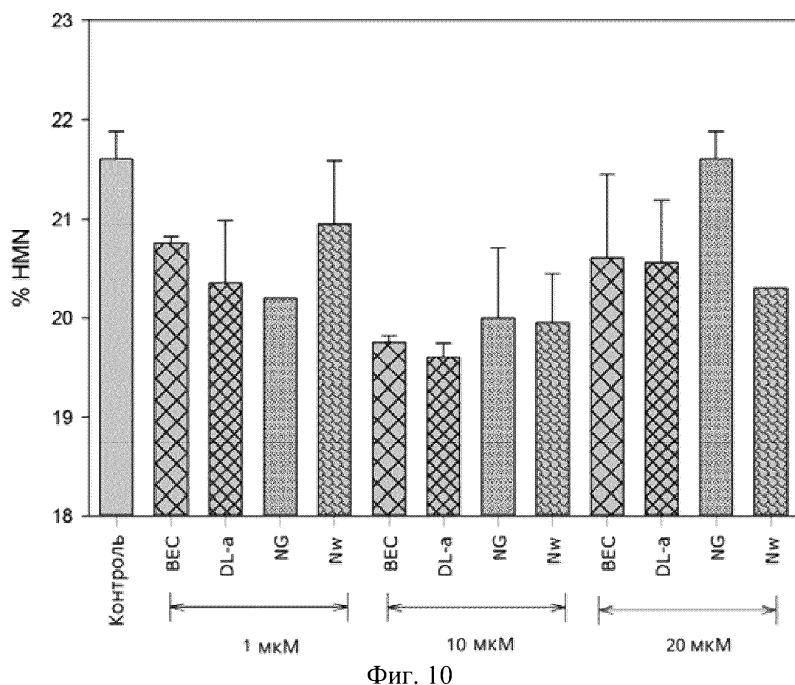


Фиг. 8

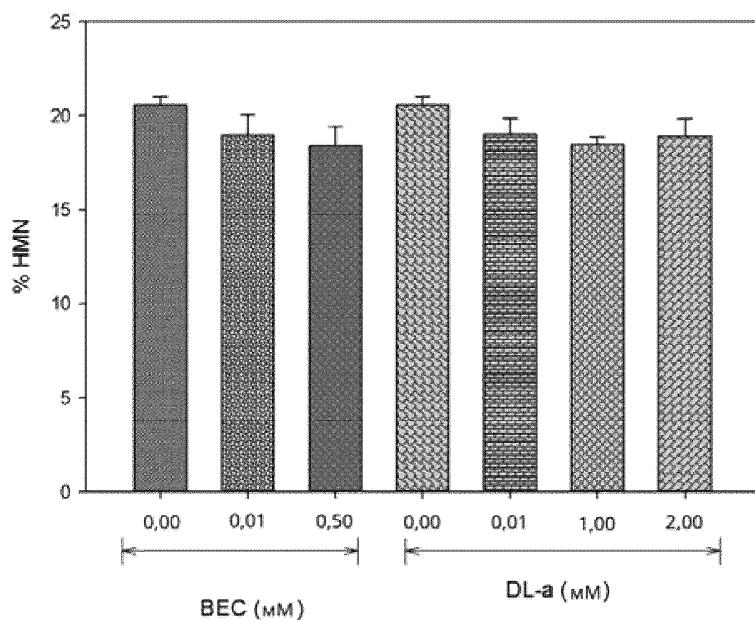


Концентрация аргинина моногидрохлорида (мМ)

Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2