

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035444**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.17

(51) Int. Cl. **C12N 9/64 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201790360

(22) Дата подачи заявки
2015.08.12

**(54) ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОСТЬЮ ПРОЦЕССИРОВАННОГО И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО
ФАКТОРА X В ФУРИН-СЕКРЕТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ
МЛЕКОПИТАЮЩЕГО**

(31) 62/036,438

(32) 2014.08.12

(33) US

(43) 2017.06.30

(86) PCT/US2015/044883

(87) WO 2016/025615 2016.02.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТЕД
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (СН)**

(72) Изобретатель:
**Бём Эрнст, Хорлинг Франциска, Кён
Ядранка, Доккаль Михель (АТ)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) ALEXANDRA PREININGER ET AL.:
"Strategies for recombinant Furin employment
in a biotechnological process: complete target
protein precursor cleavage", CYTOTECNOLOGY,
KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol.
30, no. 1-3, 1 May 1999 (1999-05-01), pages 1-15,
XP019236610, ISSN: 1573-0778, DOI: 10.1023/
A:1008030407679 Abstract and Discussion
HIMMELSPACH M. ET AL.:
"RECOMBINANT HUMAN FACTOR X: HIGH
YIELD EXPRESSION AND THE ROLE OF FURIN
IN PROTEOLYTIC MATURATION IN VIVO
AND IN VITRO", THROMBOSIS RESEARCH,
TARRYTOWN, NY, US, vol. 97, 1 January 2000
(2000-01-01), pages 51-67, XP000914912, ISSN:
0049-3848, DOI: 10.1016/S0049-3848(99)00145-0
Pages 6 and 7 and Discussion
WO-A1-2008143977
WO-A2-0194383
WO-A1-2012167271

(57) Настоящее изобретение относится к способам получения полностью процессированного зрелого фактора X в системе экспрессии, продуцирующей контролируемое количество фурина от 50 до 300 Ед/мл супернатанта культуры. Кроме того, настоящее изобретение относится к трансформированным клеткам, системам экспрессии и экспрессирующим векторам для экспрессии фурина и фактора X.

B1

035444

035444 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к системам экспрессии, трансформированным клеткам и способам, относящимся к ним, для экспрессии полностью процессированного и активного рекомбинантного фактора X в присутствии фурина.

Уровень техники

Фактор свертывания X человека (FX), активированный FX (FXa) и их варианты используют в качестве терапевтических средств при нарушениях свертывания крови, включая в качестве неограничивающих примеров гемофилию и болезнь Виллебранда. FX, витамин K-зависимая сериновая протеаза, синтезируется в виде одноцепочечного белка-предшественника в эндоплазматическом ретикулуме с последующим внутриклеточным протеолитическим расщеплением фурином в аппарате Гольджи перед секретацией продуцирующей клеткой в кровотоки или в среду для культивирования в случае рекомбинантной экспрессии. Три участка расщепления фурином в FX отвечают за правильный протеолитический процессинг FX. Зрелая форма FX является двухцепочечной молекулой, соединенной дисульфидной связью, состоящей из тяжелой и легкой цепи, образующейся после расщепления белка-предшественника. Дальнейшие модификации молекулы включают γ -карбоксылирование легкой цепи и N- и O-связанное гликозилирование активационного пептида, соединенного с тяжелой цепью.

Помимо FX, дополнительные витамин K-зависимые факторы свертывания, несущие консенсусный участок распознавания Arg-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 4), являются субстратами повсеместно экспрессирующейся эндопротеазы фурина, также известной как фермент, расщепляющий спаренные аминокислотные остатки (PASE). Необходимый протеолитический процессинг рекомбинантных белков каскада свертывания нарушен в системах экспрессии на основе культур клеток по причине ограничений внутриклеточного процессинга при высокопроизводительной экспрессии. Аналогично фактору Виллебранда и фактору свертывания IX (FIX), проявляющим недостаточный протеолитический процессинг при высоких степенях экспрессии в рекомбинантных клетках млекопитающих, секреция FX в низкопродуцирующих клонах клеток CHO отличается полностью процессированным FX, в то время как высокопродуцирующие клоны содержат непроцессированный одноцепочечный FX и множество непроцессированных форм легкой цепи FX в дополнение к правильно процессированным тяжелым и легким цепям FX. Типы и степени непроцессированной легкой цепи FX варьируются среди отдельных клонов клеток и в разных условиях культивирования клеток, таких как плотность клеток. Дополнительная коэкспрессия фурина *in vivo* или инкубация фурина *in vitro* после культивирования клеток необходима для поддержания эндогенного протеолитического аппарата фурина, облегчающего расщепление интактного белка.

Коэкспрессия фурина необходима для экспрессии полностью процессированного FX с высоким выходом. Однако в настоящее время не известен пороговый уровень фурина, который обеспечивал бы высокую процентную долю интактного процессированного FX в системах культур клеток. Высокие уровни фурина являются токсичными, таким образом, для уровней экспрессии фурина FX-продуцирующими системами экспрессии млекопитающих необходимо найти баланс между уровнями, являющимися токсичными, но потенциально приводящими к 100% процессинга белка-предшественника FX, и слишком низкими уровнями, приводящими к здоровым культурам клеток, в которых продуцируется субоптимальный процессированный FX.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к системе экспрессии фурина и фактора X человека (FX) в одной линии клеток и, таким образом, получению критической концентрации фурина в супернатанте культуры для получения полностью процессированного и полностью активного FX с одновременным поддержанием жизнеспособности культуры.

Таким образом, настоящее изобретение относится к трансформированной клетке, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую фурин человека, таким образом, что трансформированная клетка экспрессирует и секретирует функциональный фурин в супернатант культуры, где функциональный фурин секретируется в супернатант культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч. В одном из вариантов осуществления трансформированные клетки дополнительно содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, расщепляемый фурином и содержащий мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в разных экспрессирующих векторах. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в одном экспрессирующем векторе.

Настоящее изобретение также относится к эукариотической системе экспрессии белка, содержащей линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего; первому экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и второму экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии белка линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, расщепляемый фурином и содержащий мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg, где линия клеток способна секретировать функциональ-

ный фурин в супернатант культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч.

Настоящее изобретение также относится к эукариотической системе экспрессии белка, содержащей линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего; первому экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии фурина человека и белка, расщепляемого фурином и содержащего мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg, линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, расщепляемый фурином, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в разных экспрессирующих векторах. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в одном экспрессирующем векторе.

Настоящее изобретение также относится к трансформированной клетке, содержащей первую нуклеотидную последовательность, кодирующую фурин человека, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую FX человека таким образом, что трансформированная клетка экспрессирует и секретирует функциональный фурин и FX в супернатант культуры, где фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч, и по меньшей мере 85% FX является полностью процессированным. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая FX, находятся в разных экспрессирующих векторах. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая FX, находятся в одном экспрессирующем векторе.

Настоящее изобретение также относится к эукариотической системе экспрессии белка, содержащей линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего; первому экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и второму экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии FX линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую FX, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч.

Настоящее изобретение дополнительно относится к эукариотической системе экспрессии белка, содержащей линию клеток, подходящую для экспрессии белков млекопитающего; первому экспрессирующему вектору, адаптированному для экспрессии фурина человека и FX, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую FX, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч.

Настоящее изобретение также относится к способу получения рекомбинантного белка, включающему трансфекцию линии клеток, подходящей для экспрессии белков млекопитающего, с использованием первого экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и трансфекцию линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии белка линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, содержащий мотив Arg-(Lys/Arg)-Arg; где линия клеток, трансфицированная с использованием первого и второго экспрессирующих векторов, экспрессирует и секретирует функциональный фурин человека в супернатанте культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 40 до приблизительно 80 ч или приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч. В одном из вариантов осуществления линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора, по существу, одновременно. В другом варианте осуществления линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни фурина, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора. Еще в одном варианте осуществления линию клеток трансфицируют с использованием второго экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни белка, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием первого экспрессирующего вектора.

В одном из вариантов осуществления белок является фактором Виллебранда, фактором II, фактором IX, фактором X, протейном С, протейном S или протейном Z. В другом варианте осуществления белок является фактором X.

Настоящее изобретение также относится к способу получения рекомбинантного белка, включающему трансфекцию линии клеток, подходящей для экспрессии белков млекопитающего, с использованием первого экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии фурина человека линией клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и трансфекцию линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора, адаптированного для экспрессии FX линией клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид FX; где линия клеток, трансфицированная с использованием первого и второго экспрессирующих векторов, экспрессирует и секретирует функциональный фурин человека в супернатанте культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч. В одном из вариантов осуществления линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора, по существу, одновременно. В другом варианте осуществления линию клеток трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни фурина, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием второго экспрессирующего вектора. Еще в одном варианте осуществления линию клеток трансфицируют с использованием второго экспрессирующего вектора и клетки, секретирующие стабильные уровни белка, получают перед трансфекцией линии клеток с использованием первого экспрессирующего вектора.

В другом варианте осуществления клетки способны секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере приблизительно от 50 до приблизительно 60 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч, и где по меньшей мере 90% FX является полностью процессированным. В другом варианте осуществления клетки способны секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере приблизительно от 90 до приблизительно 100 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч, и где по меньшей мере 95% FX является полностью процессированным.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному FX, продуцируемому трансформированной клеткой, представленной в настоящем описании.

Настоящее изобретение дополнительно относится к рекомбинантному FX, продуцируемому системой экспрессии, представленной в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному FX, получаемому способом, представленным в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к системе экспрессии рекомбинантного FX, адаптированной для секреции фурина в супернатант культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч.

Настоящее изобретение также относится к способу получения зрелого, полностью процессированного FX, включающему систему экспрессии, секретирующую фурин в супернатант культуры в концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А изображен экспрессирующий вектор RCL.012-74.pD3H-фурин, и на фиг. 1В изображена нуклеотидная последовательность вектора (SEQ ID NO: 1). Последовательность фурина человека подчеркнута и инициаторный кодон и стоп-кодон подчеркнуты двойной линией.

На фиг. 2 изображена нуклеотидная последовательность фурина человека (SEQ ID NO: 2). Инициаторный кодон и стоп-кодон подчеркнуты двойной линией.

На фиг. 3 изображена аминокислотная последовательность фурина человека (SEQ ID NO: 3).

На фиг. 4 изображена степень полностью процессированного фактора X (FX) в культурах. Денситометрический количественный анализ осуществляли с помощью вестерн-блоттинга FX в восстановительных условиях и окрашивали с помощью поликлонального антитела против FX. Клоны (ID клона 42-52) демонстрировали до 4 видов FX с различными пиксельными интенсивностями, включая непроцессированный одноцепочечный FX (рамка 1, 5, 9 и т.д.), тяжелую цепь FX (рамка 2, 6, 10 и т.д.), непроцессированную пропептид-содержащую легкую цепь FX (рамка 3, 7, 11 и т.д.) и процессированную легкую цепь FX (рамка 4, 8, 12 и т.д.). Пиксельную интенсивность рамок 45-48 определяли для вычитания фона.

На фиг. 5 изображена концентрация секретируемого фурина и процентная доля полностью процессированного FX/общего FX в культуре. Существует дозозависимая взаимосвязь между концентрацией секретируемого фурина в супернатанте культуры клеток (определяемой с помощью анализа активности фурина) и % полностью процессированного FX/общего FX (определяемой с помощью денситометрического количественного анализа соответствующих полос вестерн-блоттинга).

На фиг. 6 изображен анализ дозы фурина и полностью процессированного FX. С помощью данных (круги) с клеточно-специфичным средним (темные линии) и средним для выборки (светлые линии) с использованием модели E_{max} прогнозировали процентную долю полностью процессированного FX/общего FX (%) как функцию концентрации фурина.

На фиг. 7А-Д изображена проверка достоверности модели E_{max} . На фиг. 7А изображен остаток от-

вета по сравнению с прогнозируемым ответом, где точки данных расположены симметрично вокруг нуля, что свидетельствует об отсутствии систематического тренда. На фиг. 7B изображен нормальный график Q-Q для остатков, свидетельствующий о том, что предположение нормально распределенных ошибок имеет силу, так как точки данных расположены вокруг линии идентичности. На фиг. 7C изображен остаток ответа по сравнению с линией клеток, где точки данных расположены симметрично вокруг нуля, что свидетельствует об отсутствии систематического тренда. На фиг. 7D изображены наблюдаемые и прогнозируемые значения, построенные относительно друг друга, свидетельствующие о хорошем соответствии данных, так как точки данных расположены симметрично вокруг линии идентичности.

На фиг. 8 изображена нулевая модель для тестирования гипотезы о том, что степень процессинга FX не зависит от концентрации фурина. Данные (круги) и аппроксимированная нулевая модель с интерсептами позволяет лишь предполагать, что процессированный FX не зависит от концентрации фурина (клеточно-специфичное среднее и среднее для выборки обозначены как темные и светлые линии соответственно).

На фиг. 9 изображена кривая "доза-ответ" и вычисленные минимальные концентрации фурина для выхода 90 и 95% процессированного FX. Прогнозируемое среднее для выборки полностью процессированного FX/общего FX (%) как функция концентрации фурина (черная линия) вместе с концентрациями фурина, приводящими к получению 90 и 95% полностью процессированного FX/общего FX, получали посредством числовой оптимизации аппроксимированной модели.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к трансформированным клеткам, эукариотическим системам экспрессии, способам получения рекомбинантных белков и рекомбинантным белкам, получаемым способами, все из которых предназначены для экспрессии фурина и фактора X (FX) в одной линии клеток и, таким образом, получения критической концентрации фурина в супернатанте культуры для получения полностью процессированного и зрелого FX с одновременным поддержанием жизнеспособности культуры.

Общей для трансформированных клеток, эукариотических систем экспрессии и способов получения рекомбинантных белков является способность клетки-хозяина продуцировать устойчивые уровни рекомбинантного фурина. Фурин необходим для расщепления конкретных белков млекопитающего, включая FX, из формы белка-предшественника в зрелую, полностью процессированную форму. Низкие концентрации фурина в супернатанте культуры системы экспрессии приводят к накоплению пропептид-содержащих и других непроцессированных или частично процессированных форм белка. Слишком высокие концентрации фурина приводят к нарушению роста клеток-хозяев и в конечном итоге гибели клеток.

Как применяют в настоящем описании, термин "фурин" включает полноразмерный фурин, а также любой фрагмент фурина, способный расщеплять консенсусный участок распознавания Arg-X-Lys/Arg-Arg. В этой области известны активные укороченные формы фурина, и они пригодны для использования в настоящем изобретении. Неограничивающие примеры подходящих фрагментов фурина можно найти в US 6210926 и Preininger et al. (Cytotechnology 30:1-15, 1999), включенных в настоящее описание в качестве ссылок в части описания, касающейся укороченных форм рекомбинантного фурина.

В объеме настоящего изобретения находятся варианты белков фурина и фактора X, представленные в настоящем описании. Например, можно осуществлять консервативные замены аминокислот, которые, хотя и изменяют первичную последовательность белка или пептида, как правило, не изменяют его функцию. Консервативные аминокислотные замены, как правило, включают замены в следующих группах: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; фенилаланин, тирозин.

В настоящее изобретение также включены слитые белки, или другие модификации, или FX с повышенным временем полужизни после введения индивидууму. Их примерами будут слитые белки с Fc-доменом иммуноглобулина, доменом альбумина, удлиненным (XTEN) рекомбинантным полипептидом (см. US 8673860, включенный в настоящее описание в качестве ссылки в части описания, касающейся полипептидов XTEN), поли-Glu- или поли-Asp-последовательностями, трансферрином или PAS(Pro Ala Ser)-содержащими полипептидами, присоединенными к последовательности FX.

Модификации (как правило, не изменяющие первичную последовательность) включают химическую дериватизацию полипептидов *in vivo* или *in vitro*, например ацетилирование или карбоксилирование. В настоящее изобретение также включены модификации гликозилирования, например, осуществляемые посредством модификации профилей гликозилирования полипептида в течение его синтеза и процессинга или на последующих этапах процессинга; например, посредством подвергания полипептида воздействию ферментов, влияющих на гликозилирование, например ферментов гликозилирования или дегликозилирования млекопитающего. В настоящее изобретение также включены последовательности, содержащие фосфорилированные аминокислотные остатки, например фосфотиозин, фосфосерин или фосфотреонин. Белки также можно модифицировать химически после очистки с использованием водорастворимых биосовместимых полимеров, например полиэтиленгликоля, полисиаловой кислоты или гидроксипропилкрахмала.

В настоящее изобретение также включены полипептиды, модифицированные общепринятыми способами молекулярной биологии для улучшения их устойчивости к протеолитической деградации или для

оптимизации свойств растворимости. Аналоги таких полипептидов включают аналоги, содержащие остатки, иные чем природные L-аминокислоты, например D-аминокислоты или неприродные синтетические аминокислоты. Пептиды по изобретению не ограничены продуктами любых конкретных примеров способов, приведенных в настоящем описании.

Настоящее изобретение в целом относится к системам, трансформированным клеткам, экспрессирующим векторам и способам получения по меньшей мере одного рекомбинантного белка млекопитающего, посттрансляционно процессируемого фурином (рекомбинантного белка млекопитающего, для которого необходимо наличие фурина). Белок млекопитающего является одним или несколькими из фактора Виллебранда, фактора II, фактора IX, фактора X, протеина C, протеина S или протеина Z. В другом варианте осуществления белок является FX.

Концентрация фурина в супернатанте культуры находится в оптимальном диапазоне для получения зрелых, полностью процессированных белков с одновременным поддержанием жизнеспособности культуры после определенного периода культивирования. Таким образом, применяемая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего составляет приблизительно от 50 до приблизительно 400 Ед/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 350 Ед/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 250 Ед/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 200 Ед/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 175 Ед/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 150 Ед/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 125 Ед/мл или приблизительно от 50 до приблизительно 100 Ед/мл. В одном из вариантов осуществления концентрация фурина в супернатанте культуры составляет не менее 50 Ед/мл.

В другом варианте осуществления применяемая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего после определенного периода культивирования составляет приблизительно от 50 до приблизительно 60 Ед/мл, приблизительно от 55 до приблизительно 65 Ед/мл, приблизительно от 60 до приблизительно 70 Ед/мл, приблизительно от 65 до приблизительно 75 Ед/мл, приблизительно от 70 до приблизительно 80 Ед/мл, приблизительно от 75 до приблизительно 85 Ед/мл, приблизительно от 80 до приблизительно 90 Ед/мл, приблизительно от 85 до приблизительно 95 Ед/мл, приблизительно от 90 до приблизительно 95 Ед/мл, приблизительно от 95 до приблизительно 105 Ед/мл, приблизительно от 100 до приблизительно 110 Ед/мл, приблизительно от 115 до приблизительно 125 Ед/мл, приблизительно от 120 до приблизительно 130 Ед/мл, приблизительно от 125 до приблизительно 135 Ед/мл, приблизительно от 130 до приблизительно 140 Ед/мл, приблизительно от 135 до приблизительно 145 Ед/мл, приблизительно от 140 до приблизительно 150 Ед/мл, приблизительно от 145 до приблизительно 155 Ед/мл, приблизительно от 150 до приблизительно 160 Ед/мл, приблизительно от 155 до приблизительно 165 Ед/мл, приблизительно от 160 до приблизительно 170 Ед/мл, приблизительно от 165 до приблизительно 175 Ед/мл, приблизительно от 170 до приблизительно 180 Ед/мл, приблизительно от 175 до приблизительно 185 Ед/мл, приблизительно от 180 до приблизительно 190 Ед/мл, приблизительно от 185 до приблизительно 195 Ед/мл или приблизительно от 190 до приблизительно 200 Ед/мл. В другом варианте осуществления применяемая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего после определенного периода культивирования составляет приблизительно от 50 до приблизительно 60, или приблизительно 57 Ед/мл. В другом варианте осуществления применяемая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего составляет приблизительно от 90 до приблизительно 100, или приблизительно 96 Ед/мл.

В других вариантах осуществления применяемая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего после определенного периода культивирования составляет менее приблизительно 400 Ед/мл, менее приблизительно 375, менее приблизительно 350, менее приблизительно 325, менее приблизительно 300, менее приблизительно 275, менее приблизительно 250, менее приблизительно 225, менее приблизительно 200, менее приблизительно 175, менее приблизительно 150, менее приблизительно 125 или менее приблизительно 100 Ед/мл.

В других вариантах осуществления применяемая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего после определенного периода культивирования составляет более приблизительно 50 Ед/мл, более приблизительно 60, более приблизительно 70, более приблизительно 80, более приблизительно 90, более приблизительно 100, более приблизительно 110, более приблизительно 120, более приблизительно 130, более приблизительно 140, более приблизительно 150, более приблизительно 160, более приблизительно 170, более приблизительно 180, более приблизительно 190 или более приблизительно 200 Ед/мл.

В целях по настоящему изобретению уровни фурина в супернатантах культур, представленных в настоящем описании, достигают в пределах периода времени приблизительно от 12 до приблизительно 96 ч после начала культивирования (после культивирования в течение приблизительно от 12 до приблизительно 96 ч), и они отражают уровни фурина, накапливающегося в супернатанте культуры в течение этого периода. В других вариантах осуществления желаемых уровней фурина в супернатантах культур достигают в пределах приблизительно от 18 до приблизительно 90 ч, приблизительно от 24 до приблизительно 84 ч, приблизительно от 30 до приблизительно 78 ч, приблизительно от 36 до приблизительно 72 ч,

приблизительно от 40 до приблизительно 80 ч, приблизительно от 42 до приблизительно 68 ч или приблизительно от 48 до приблизительно 72 ч после начала культивирования или после культивирования в течение указанного периода времени.

Альтернативно уровни фурина в супернатантах культур, представленных в настоящем описании, выражают как концентрацию фурина, секретируемого количеством клеток на объем супернатанта культуры в сутки. В неограничивающем примере концентрацию фурина выражают как Ед/10⁶ клеток/день. В другом варианте осуществления применимая концентрация фурина в супернатанте культуры для получения зрелого, полностью процессированного белка млекопитающего составляет приблизительно от 20 до приблизительно 75 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 25 до приблизительно 75 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 30 до приблизительно 75 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 35 до приблизительно 75 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 40 до приблизительно 75 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 45 до приблизительно 75 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 50 до приблизительно 75 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 55 до приблизительно 75 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 60 до приблизительно 75 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 20 до приблизительно 70 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 20 до приблизительно 65 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 20 до приблизительно 60 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 20 до приблизительно 55 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 25 до приблизительно 55 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 25 до приблизительно 50 Ед/10⁶ клеток/день, приблизительно от 25 до приблизительно 45 Ед/10⁶ клеток/день или приблизительно от 25 до приблизительно 40 Ед/10⁶ клеток/день.

Концентрация фурина в супернатанте культуры является достаточной для процессинга по меньшей мере приблизительно 75% белка-предшественника млекопитающего в зрелый, функциональный белок. Белок является любимым белком, транслируемым в виде белка-предшественника и процессируемым в зрелую форму, по меньшей мере частично, под действием фурина. В одном из вариантов осуществления белок является FX. В других вариантах осуществления концентрация фурина является достаточной для процессинга по меньшей мере приблизительно 80% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 82% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 84% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 86% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 88% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 90% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 92% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 93% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 94% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 95% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 96% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 97% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 98% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX, для процессинга по меньшей мере приблизительно 99% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX или для процессинга 100% белка-предшественника FX млекопитающего в зрелый, функциональный белок FX.

Как применяют в настоящем описании, термин "белок-предшественник" относится к белку-предшественнику, являющемуся неактивным и превращающемуся в активную форму посредством расщепления и необязательно других посттрансляционных модификаций в клетке после синтеза.

Таким образом, настоящее изобретение относится к трансформированным клеткам, адаптированным для секреции фурина и белка млекопитающего, такого как FX. Трансформированные клетки могут являться любой эукариотической клеткой, подходящей для секреции белков млекопитающего, независимо от того, продуцируют ли клетки эндогенный фурин. Подходящие линии клеток для получения трансформированных клеток включают в качестве неограничивающих примеров клетки яичника китайского хомяка (CHO), эмбриональные клетки почки человека, клетки почки примата (например, клетки COS, HEK293), фибробласты (например, фибробласты мыши) и миеломные клетки мыши (например, NSO-GS). Подходящие линии клеток способны к экспрессии белков млекопитающего на высоком уровне и способны к посттрансляционным модификациям, например гликозилированию, образованию дисульфидных связей, фосфорилированию и γ -карбоксилированию. Способы селекции и культивирования клеток-хозяев и индукции клеток-хозяев для экспрессии полипептида, как правило, известны специалисту в этой области.

Настоящее изобретение также относится к системам экспрессии, содержащим клетки, подходящие для получения белков млекопитающего, и по меньшей мере одному экспрессирующему вектору, адапти-

рованному для экспрессии по меньшей мере одного белка млекопитающего. Как правило, доступны эукариотические экспрессирующие векторы для экспрессии в клетках млекопитающих. Чтобы сделать возможной экспрессию фурина и белка млекопитающего, такого как FX, способами, представленными в настоящем описании, нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, встраивают в эукариотическую клетку способами трансфекции, трансформации или инфицирования с использованием экспрессирующего вектора, посредством чего экспрессируются полипептиды. Экспрессия фурина и/или белков млекопитающего может являться транзитной или стабильной. Нуклеотидные последовательности фурина и белка млекопитающего присутствуют в виде плазмиды или в виде части вирусного или невирусного экспрессирующего вектора. Особенно подходящие вирусные векторы включают, в качестве неограничивающих примеров, бакуловирусы, вирусы осповакцины, аденовирусы, цитомегаловирусы, аденоассоциированные вирусы, репликационно-компетентные лентивирусы (RCL) и вирусы герпеса. Неограничивающие примеры вирусных эукариотических экспрессирующих векторов включают векторы Rc/CMV, Rc/RSV, RCL и SV40. Неограничивающие примеры невирусных эукариотических экспрессирующих векторов включают виросомы, липосомы, катионные липиды, плазмиды и полилизин-конъюгированную ДНК. Неограничивающие примеры плазмидных экспрессирующих векторов включают pSLX, pcDNA и другие векторы, известные специалистам в этой области.

В другом варианте осуществления в настоящем описании представлен экспрессирующий вектор, содержащий кодирующую фурина нуклеотидную последовательность, кодирующую белок млекопитающего нуклеотидную последовательность, такую как кодирующая FX нуклеотидная последовательность, или их комбинацию. В одном из вариантов осуществления последовательности фурина и белка экспрессируются из одного экспрессирующего вектора. В другом варианте осуществления последовательности фурина и последовательности белка экспрессируются из разных экспрессирующих векторов. В одном из вариантов осуществления, если нуклеотидные последовательности фурина и белка экспрессируются из одного экспрессирующего вектора, их необязательно разделяют внутренним участком связывания рибосомы (IRES). Гены могут экспрессироваться с одного или нескольких промоторов. Кроме того, нуклеотидные последовательности, кодирующие каждый белок, могут быть ориентированы в противоположных направлениях на плазмиде или в одном направлении. Экспрессирующие векторы дополнительно содержат произвольные элементы и другие регуляторные последовательности для эффективной продукции белков млекопитающего, как понятно специалистам в этой области.

Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам, делающим возможной экспрессию фурина и других белков млекопитающего с использованием рекомбиназа-опосредованной замены кассет.

Если фурина и белок млекопитающего экспрессируются из разных экспрессирующих векторов, то экспрессирующие векторы будут иметь разные селективные маркеры таким образом, что клетки, трансформированные с использованием вектора, можно подвергать селекции. Такие подвергнутые селекции клетки затем можно выделять и выращивать в моноклональных культурах.

Промоторы, делающие возможной конститутивную, регулируемую, тканеспецифическую, специфическую в отношении типа клеток, специфическую в отношении клеточного цикла или метаболически-специфическую экспрессию в эукариотических клетках, подходят, например, для экспрессии в клетках млекопитающих. Регулируемыми элементами являются промоторы, последовательности активаторов, энхансеры, сайленсеры и/или репрессорные последовательности. Примерами регулируемых элементов, делающих возможной конститутивную экспрессию в эукариотах, являются промоторы, распознаваемые РНК-полимеразой III, или вирусные промоторы, энхансер цитомегаловируса (CMV), промотор CMV, промотор SV40 или промоторы длинных концевых повторов (LTR), например полученные из MMTV (вируса опухоли молочной железы мыши), и другие вирусные последовательности промоторов и активаторов, полученные, например, из вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса простого герпеса (HSV), вируса папилломы человека (HPV), вируса Эпштейна-Барр (EBV), промоторы белков теплового шока или вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Примерами регулируемых элементов, делающих возможной индуцируемую экспрессию в эукариотах, является тетрациклиновый оператор в комбинации с соответствующим репрессором. Экспрессия нуклеотидных последовательностей фурина и белка млекопитающего также может происходить под контролем тканеспецифических, или белок-специфических, промоторов.

Неограничивающими примерами белок-специфических промоторов являются промоторы гена FX или промоторы гена фурина.

В определенных вариантах осуществления клетки трансформируют с использованием другого белка, помимо фурина и белка млекопитающего. В одном из вариантов осуществления дополнительный белок является витамин К-эпоксидредуктазой (VKOR). В определенных вариантах осуществления дополнительный белок экспрессируется с того же экспрессирующего вектора, что и один или оба из фурина и белка млекопитающего, или дополнительный белок экспрессируется с другого экспрессирующего вектора.

Настоящее изобретение также относится к системам экспрессии, содержащим клетки-хозяева и один или несколько экспрессирующих векторов, адаптированных для экспрессии фурина и по меньшей мере одного дополнительного белка млекопитающего, например FX.

Настоящее изобретение также относится к способам получения полностью процессированных рекомбинантных белков млекопитающего, для которых необходимо наличие фурина, таких как FX. В одном из вариантов осуществления стабильную линию клеток, продуцирующую рекомбинантный фурин, получают, а затем трансфицируют с использованием экспрессирующего вектора, содержащего нуклеотидную последовательность по меньшей мере для одного белка млекопитающего, для которого необходимо наличие фурина. Стабильные линии клеток, продуцирующие рекомбинантный фурин, можно получать и хранить для трансфекции с использованием экспрессирующего вектора, содержащего нуклеотидную последовательность по меньшей мере для одного белка млекопитающего, для которого необходимо наличие фурина, при необходимости. Альтернативно с помощью экспрессирующих векторов для фурина и для белка млекопитающего, для которого необходимо наличие фурина, такого как FX, можно трансфицировать клетки-хозяева в пределах приблизительно 30 мин, приблизительно 60 мин, приблизительно 2 ч, приблизительно 6 ч, приблизительно 12 или приблизительно 24 ч друг от друга. В другом варианте осуществления с помощью двух или более экспрессирующих векторов трансфицируют клетки-хозяева, по существу, одновременно. В целях по настоящему изобретению термин "по существу, одновременно" относится к любому периоду времени, меньшему или равному 1 ч.

Трансформированные клетки подвергаются селекции в соответствии с селективными маркерами, присутствующими в экспрессирующих векторах, для получения стабильных совокупностей трансформированных клеток, а затем совокупности необязательно клонируют для получения стабильных клонов. Стабильные клоны продуцируют приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл, приблизительно от 50 до приблизительно 400, приблизительно от 50 до приблизительно 350, приблизительно от 50 до приблизительно 300, приблизительно от 50 до приблизительно 250, приблизительно от 50 до приблизительно 200, приблизительно от 50 до приблизительно 175, приблизительно от 50 до приблизительно 150, приблизительно от 50 до приблизительно 125 или приблизительно от 50 до приблизительно 100 Ед/мл фурина в супернатанте культуры через приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч, приблизительно от 36 до приблизительно 72 ч, приблизительно от 40 до приблизительно 78 ч, приблизительно от 42 до приблизительно 68 ч или приблизительно от 48 до приблизительно 72 ч после начала культивирования или после культивирования в течение указанного периода времени. Кроме того, с помощью стабильных клонов получают более 80% полностью процессированного и активного рекомбинантного белка млекопитающего, такого как FX, от всего рекомбинантного белка, такого как FX, продуцируемого трансформированными клетками.

Настоящее изобретение также относится к системе экспрессии рекомбинантного фурина и рекомбинантного FX, секретирующей фурин в супернатант культуры в накопленной концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч.

Настоящее изобретение также относится к способу получения зрелого, полностью процессированного FX, включающему применение системы экспрессии, секретирующей фурин в супернатант культуры в накопленной концентрации приблизительно от 50 до приблизительно 300 Ед/мл после культивирования в течение приблизительно от 36 до приблизительно 78 ч.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным белкам млекопитающего, получаемым способами по настоящему изобретению, и любому полностью процессированному рекомбинантному FX млекопитающего.

Пример

Получение полностью процессированного и полностью активного рекомбинантного фактора X посредством определенных уровней фурина.

Для экспрессии FX использовали экспрессирующую плазмиду млекопитающего pSLX, содержащую кодон-оптимизированный FX человека или и кодон-оптимизированный FX человека и кодон-оптимизированную витамин К-эпоксидредуктазу человека (FX/VKOR), разделенные внутренним участком связывания рибосомы (IRES). Конструкции для систем экспрессии на основе клеток яичника китайского хомяка (CHO)-S и CHO-DG44 включали средства для селекции генетицином и селекцию дигидрофолатредуктазой (dhfr) соответственно. Для экспрессии фурина использовали экспрессирующую плазмиду млекопитающего pcDNA3.1, содержащую полноразмерный фурин человека в комбинации с гигромицином в качестве селективного маркера (фиг. 1A).

Сначала полученные из CHO линии клеток (CHO-S и CHO DG44) трансфицировали с использованием конструкций FX или FX/VKOR для получения стабильных совокупностей, а затем совокупности подвергали субклонированию для получения стабильных клонов. Во втором раунде трансфекции и субклонирования выбранное количество FX- или FX/VKOR-экспрессирующих клонов сверхтрансфицировали с использованием фурина, получая стабильные совокупности и стабильные клоны, экспрессирующие FX/фурин или FX/VKOR/фурин.

Стабильные, продуцирующие рекомбинантный FX линии клеток CHO-S и CHO-DG44 выращивали в средах без компонентов животного происхождения во встряхиваемых колбах в течение приблизительно от 42 до приблизительно 72 ч и с исходными количествами клеток $0,3 \times 10^6$ или $0,5 \times 10^6$ клеток/мл.

Клетки CHO-S поддерживали в средах PowerCHO®-CD (Lonza BioWhittaker), дополненных 4 мМ глутамином, 500 мкг/мл генетицина, 500 мкг/мл гигромицина и 5 мкг/мл витамина K1. Клетки CHO-DG44 поддерживали в средах OptiCHO™-CD (Life Technologies), дополненных 6 мМ глутамином, 500 нМ метотрексатом (MTX) и 5 мкг/мл витамина K1.

Собранный супернатант культуры клеток анализировали посредством вестерн-блоттинга в восстановительных условиях для определения качества рекомбинантного FX человека с использованием поликлональных антител козы против FX человека или поликлональных антител овцы против FX человека (Affinity Biologicals). Денситометрический анализ вестерн-блоттингов делает возможным количественный анализ различных видов правильно процессированного FX, обозначенных как тяжелая цепь FX (HC) и легкая цепь FX (LC), и неправильно расщепленных видов FX, обозначенных как одноцепочечный FX (SC) и пропептид-содержащая легкая цепь FX (PP-LC).

В случае количественного анализа FX супернатант культуры клеток анализировали посредством ELISA для определения концентрации FX и посредством хромогенного анализа FXа с использованием яда гадюки Рассела (RVV) в качестве активатора для определения концентрации активного FX. Эти анализы калибровали с использованием полученного из плазмы FX (Hyphen Biomed). Специфическую активность приводят в %, разделяя концентрацию активного FX на концентрацию общего FX, умножая на 100. В случае количественного анализа фурина активный фурин определяли посредством флуорогенного анализа фурина, калибруемого относительно референсного материала фурина (New England Biolabs).

Для статистического анализа полностью процессированный FX/общий FX (%) моделировали как функцию концентрации фурина с использованием модели E_{max} на трансфицированных совокупностях CHO-DG44 (A), трансфицированных совокупностях CHO-S (B) и отдельных полученных из клеток клонов CHO-S (C). Эту модель используют для статистической оценки в исследованиях дозозависимого эффекта. В модели E_{max} используют четыре параметра (E_0 , E_{max} , ED_{50} и n) для модели FX как функции фурина следующим образом:

$$y = E_0 + (x^n \cdot E_{max}) / (ED_{50}^n + x^n)$$

где y относится к полностью процессированному FX/общему FX и x относится к концентрации фурина. Параметр E_0 относится к основному эффекту, соответствующему ответу, когда концентрация фурина равна нулю, E_{max} - максимальному эффекту, приписываемому концентрации фурина, ED_{50} - концентрации фурина, приводящей к половине E_{max} , и параметр n представляет собой угол наклона (фактор Хилла), определяющий крутизну кривой.

Для учета того, что полностью процессированный FX/общий FX приближается к 100%, если фурин приближается к бесконечно большой концентрации, модель E_{max} модифицировали в функцию с тремя параметрами, оцениваемыми следующим образом:

$$y = E_0 + (x^n \cdot (100 - E_0)) / (ED_{50}^n + x^n)$$

Эту модель аппроксимировали для данных, учитывая вариабельность среди трех разных линий клеток с использованием нелинейной модели смешанных эффектов, позволяя параметрам E_0 и n варьироваться между разными линиями клеток, также моделируя эти два параметра в качестве случайных эффектов.

Для валидации используемой модели осуществляли диагностику модели. Сравнение аппроксимированной модели E_{max} с нулевой моделью с использованием теста отношения правдоподобия осуществляли для определения статистических данных для модели E_{max} , с помощью которой оценивают процентную долю полностью процессированного FX от общего FX в зависимости от концентрации фурина.

Результаты

Гетерологичную систему экспрессии на основе CHO для FX человека, содержащую трансфицированные совокупности CHO-DG44 (A), трансфицированные совокупности CHO-S (B) и отдельные полученные из клеток клоны CHO-S (C) использовали в качестве основы для исследования эффекта экспрессии фурина в отношении процессинга FX человека после использования разных стратегий трансфекции. Трансфицированные совокупности, а также клоны, дополнительно экспрессирующие VKOR, не оказывали влияния на исследование.

После периода инкубации в течение от двух до трех дней культивирования супернатант культуры клеток подвергали серии анализов, включая анализ вестерн-блоттинга в восстановительных условиях, анализ активности фурина, анализ ELISA и RVV (табл. 1). В среднем FX-продуцирующие совокупности и клоны CHO демонстрировали специфическую активность FX более 50%, частично достигая 100% (табл. 1). При анализах вестерн-блоттинга наблюдали, что рекомбинантный FX неправильно процессировался до различных степеней, о чем свидетельствуют две не полностью процессированные формы FX (т.е. пропептид-содержащая легкая цепь FX и одноцепочечный FX), помимо полностью процессированной, не содержащей пропептид легкой цепи FX и тяжелой цепи FX (фиг. 4). При денситометрическом анализе этих четырех видов FX процентная доля полностью процессированного FX, т.е. легкой цепи FX и тяжелой цепи FX относительно общего FX, находилась в диапазоне от 30 до почти 100% в супернатантах культур клеток (табл. 1, фиг. 4). Кроме того, не наблюдали предварительную активацию, которая была бы визуализирована в виде полосы, соответствующей тяжелой цепи, укороченной на размер отсут-

ствующего активационного пептида. Также оценивали то, оказывает ли концентрация секретируемого фурина влияние на степень процессированного FX, строя график этих двух параметров (фиг. 5). Как показано на фиг. 5, при низких концентрациях секретируемого фурина (<20 Ед/мл) осуществим лишь частичный процессинг FX, в то время как более высокие уровни секретируемого фурина коррелируют с лучше процессированным FX.

Таблица 1. Совокупность данных о линиях клеток, коэкспрессирующих FX и фурин: представлены эффективность продукции FX, эффективность продукции фурина и титры и процентные доли полностью процессированного FX/общего FX, измеряемые для каждой линии клеток

ID клона/ совокупности	Экспрессируемые рекомбинантные белки	Линия клеток (совокупность или клон)	Концентрация фурина (Ед./мл)	Конечная плотность клеток [10 ⁶ клеток/мл]	Фурин- специфическая эффективность продукции [Ед./10 ⁶ клеток/день]	FX- специфическая активность [%]	Полностью процессированный FX/общий FX (%)
1	FX	Совокупность CHO-DG44	8,03	2,015	2,22	5,64	30,34
2	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	8,05	1,155	3,45	7,58	45,69
3	FX/VKOR	Совокупность CHO-DG44	7,88	1,436	2,86	6,44	31,05
4	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	7,88	1,029	3,68	11,16	40,08
5	FX	Совокупность CHO-DG44	2,74	1,518	0,95	9,04	41,42
6	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	11,59	0,952	5,71	14,12	71,78
7	FX/VKOR	Совокупность CHO-DG44	2,38	1,152	1,02	15,14	36,92
8	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	2,82	0,795	1,58	29,37	57,17
9	FX	Совокупность CHO-DG44	5,36	2,438	1,26	9,23	34,46
10	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	9,94	1,503	3,48	12,23	59,30
11	FX/VKOR	Совокупность CHO-DG44	4,88	2,162	1,27	14,57	33,12
12	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	4,78	1,372	1,80	20,48	46,98
13	FX	Совокупность CHO-DG44	8,07	2,005	2,24	47,68	40,93
14	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	8,83	1,851	2,62	64,80	60,54
15	FX/VKOR	Совокупность CHO-DG44	8,42	1,843	2,50	45,48	33,98
16	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	6,72	2,220	1,71	58,04	47,46
17	FX	Совокупность CHO-DG44	2,59	1,246	1,05	78,72	46,40
18	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	55,91	1,396	20,75	98,49	73,47
19	FX/VKOR	Совокупность CHO-DG44	2,59	1,207	1,07	70,43	47,61
20	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	3,48	1,431	1,27	93,42	60,04
21	FX	Совокупность CHO-DG44	5,96	2,035	1,63	71,19	37,77
22	FX/фурин	Совокупность CHO-DG44	27,57	2,226	7,00	104,40	71,85
23	FX/VKOR	Совокупность	4,40	1,827	1,32	69,50	42,84

		CHO-DG44					
24	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-DG44	5,20	2,283	1,29	75,60	49,19
25	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	2,224	0,00	90,59	63,96
26	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-S	51,34	1,828	25,20	99,57	88,97
27	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	2,851	0,00	49,99	57,75
28	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-S	62,84	2,248	26,13	48,73	87,78
29	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	3,584	0,00	81,39	68,02
30	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-S	66,98	2,362	26,75	66,57	89,64
31	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	2,870	0,00	69,04	67,02
32	FX/VKOR/фурин	Совокупность CHO-S	55,08	2,295	22,52	52,91	89,99
33	FX/VKOR	Совокупность CHO-S	0,00	2,645	0,00	59,62	71,13
34	FX/фурин	Совокупность CHO-S	116,89	2,083	50,52	51,40	86,56
35	FX	Совокупность CHO-S	0,00	2,230	0,00	67,49	62,65
36	FX/фурин	Совокупность CHO-S	46,62	1,846	22,18	19,29	82,99
37	FX	Совокупность CHO-S	0,00	2,049	0,00	11,47	51,69
38	FX/фурин	Совокупность CHO-S	48,41	1,457	27,61	<25,33	77,46
39	FX	Совокупность CHO-S	0,00	2,265	0,00	95,04	45,87
40	FX/фурин	Совокупность CHO-S	60,72	1,566	32,80	27,69	84,27
41	FX	Совокупность CHO-S	0,00	2,018	0,00	35,63	49,28
42	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	113,45	3,704	26,99	90,30	95,91
43	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	63,41	3,133	17,45	92,26	96,23
44	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	92,86	2,893	27,37	98,55	98,12
45	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	173,37	3,430	44,11	79,46	98,42
46	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	23,54	2,816	7,10	86,31	91,69
47	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	105,42	2,918	30,84	78,63	95,14
48	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	33,77	3,542	8,35	80,02	92,21
49	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	135,62	2,777	41,39	94,46	95,18
50	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	82,03	2,193	30,46	48,80	93,75
51	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	8,06	2,280	2,90	67,11	52,38
52	FX/VKOR/фурин	Клон CHO-S	81,02	2,889	23,91	85,37	95,61

Для понимания влияния фурина на процессинг FX и для получения статистического подтверждения данных процентную долю полностью процессированного FX от общего FX (%) моделировали как функцию концентрации фурина с использованием модели E_{max} на линиях клеток А, В и С (фиг. 6). Четыре графика диагностики модели, свидетельствующие о хорошем соответствии модели данным, представлены на фиг. 7А-D. При сравнении аппроксимированной модели E_{max} с нулевой моделью с использованием теста отношения правдоподобия получали значение $p < 0,0001$, получая статистические данные для более высокой процентной доли полностью процессированного FX от общего FX, зависящей от более высокой концентрации фурина (фиг. 8), еще раз подтверждая достоверность данных. С учетом статистического анализа рассчитанные концентрации фурина для продукции продуцирующей линией клеток, определяемые в среде для культивирования клеток вместе с FX, приводящие к 90 или более и 95% или более полностью процессированного FX от общего FX, составляли по меньшей мере 57 и по меньшей мере 96 Ед/мл соответственно (фиг. 9).

В совокупности с помощью данных получали определенный минимальный уровень секретируемого фурина (по меньшей мере 57 и по меньшей мере 96 Ед/мл) в супернатанте культуры клеток, необходимый для достаточного процессинга FX (90 или более и 95% или более).

В биотехнологических способах с экспрессией высоких уровней рекомбинантного белка гиперэкспрессию фурина можно использовать для получения полностью процессированных зимогенов. Используя настоящее изобретение, авторы настоящего изобретения впервые получали определенный минимум секретируемого фурина, обеспечивающий высокий процессинг FX (≥ 57 Ед/мл для достижения по меньшей мере 90% полностью процессированного FX и ≥ 96 Ед/мл фурина для по меньшей мере 95% полностью процессированного FX). Эти данные особенно полезны для способов ферментации с экспрессией рекомбинантных FX, FXa и вариантов человека и видов животных, где уровень фурина можно использовать в качестве индикатора правильного процессинга белка-предшественника FX и в качестве цели для линии клеток и разработки способа.

Если не указано иначе, все числа, выражающие количества ингредиентов, свойств, таких как молекулярная масса, условия реакции и т.д., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях посредством термина "приблизительно." Как применяют в настоящем описании, термин "приблизительно" означает в пределах от 10 до 15%, предпочтительно в пределах от 5 до 10%. Таким образом, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которых стремятся достигнуть посредством настоящего изобретения. Как минимум и не в качестве ограничения применения доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр следует, по меньшей мере, истолковывать, учитывая количество приведенных значимых цифр и используя общепринятые способы округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, описывающие широкий объем изобретения, являются приближениями, числовые значения, приведенные в конкретных примерах, указаны настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение, по существу, содержит конкретные ошибки, обязательно являющиеся результатом стандартного отклонения, обнаруживаемого в их соответствующих измерениях при тестировании.

Термины в единственном числе и схожие ссылки, используемые в отношении описания изобретения (особенно в отношении следующей формулы изобретения), следует истолковывать как охватывающие и единственное, и множественное число, если в настоящем описании не указано иначе или это четко не противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в настоящем описании предназначено исключительно для условного обозначения отдельного упоминания каждого отдельного значения, попадающего в диапазон. Если в настоящем описании не указано иначе, каждое отдельное значение включено в описание так, как если бы оно было конкретно упомянуто в настоящем описании. Все способы, представленные в настоящем описании, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в настоящем описании не указано иначе или это не противоречит контексту. Использование любого и всех примеров или иллюстративного языка (например, "такой как"), представленное в настоящем описании, предназначено исключительно для лучшего объяснения изобретения, но не для ограничения объема изобретения, заявленного иначе. Никакие выражения в описании не следует истолковывать как указание на любой незаявленный элемент, важный для практического осуществления изобретения.

Группировки альтернативных элементов или вариантов осуществления представленного в настоящем описании изобретения не следует истолковывать в качестве ограничений. На каждого члена группы можно ссылаться и заявлять его по отдельности или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, обнаруживаемыми в настоящем описании. Предполагают, что одного или нескольких членов группы можно включать или удалять из группы по причинам удобства и/или патентоспособности. Когда происходит любое такое включение или исключение, описание считают содержащим группу как модифицированную, таким образом, выполняя письменное описание всех групп Маркуша, используемых в прилагаемой формуле изобретения.

В настоящем описании представлены конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, включая лучший способ осуществления изобретения, известный авторам настоящего изобретения. Разумеется, варианты этих описываемых вариантов осуществления будут очевидны специалистам в этой области после прочтения изложенного выше описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в этой области будут использовать такие варианты при необходимости, и авторы настоящего изобретения подразумевают, что изобретение будут осуществлять на практике иным образом, чем конкретно представлено в настоящем описании. Таким образом, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, упомянутые в прилагаемой формуле изобретения в соответствии с действующим законодательством. Кроме того, любая комбинация описываемых выше элементов во всех возможных вариантах включена в изобретение, если в настоящем описании не указано иначе или это не противоречит контексту.

Конкретные варианты осуществления, представленные в настоящем описании, могут быть дополнительно ограничены в формуле изобретения с использованием выражений "состоящий из" или "по существу, состоящий из". При использовании в формуле изобретения, при подаче или при дополнении, переходный термин "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент, не указанный в формуле изобретения. Переходный термин "по существу, состоящий из" ограничивает объем формулы

изобретения конкретными материалами или этапами и тем, что материально не влияет на основные и новые характеристики. Заявленные таким образом варианты осуществления изобретения по существу или конкретно описаны и разрешены в настоящем описании.

Кроме того, на всем протяжении настоящего описания сделано множество ссылок на патенты и печатные публикации. Каждая из процитированных выше ссылок и печатных публикаций в отдельности включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В заключение следует понимать, что варианты осуществления представленного в настоящем описании изобретения предназначены для иллюстрирования принципов настоящего изобретения. Другие модификации, которые можно использовать, входят в объем изобретения. Таким образом, в качестве неограничивающего примера можно использовать альтернативные конфигурации настоящего изобретения в соответствии с руководством в настоящем описании. Таким образом, настоящее изобретение не ограничено тем, что конкретно представлено и описано.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Трансформированная клетка млекопитающего для получения полностью процессированного фактора X, где трансформированная клетка млекопитающего содержит

первую нуклеотидную последовательность, кодирующую фурин человека, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор X человека, где трансформированная клетка экспрессирует и секретирует функциональный фурин и фактор X в супернатант культуры, где фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации от 50 до 300 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч и по меньшей мере 85% фактора X является полностью процессированным.

2. Трансформированная клетка млекопитающего по п.1, где нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в разных экспрессирующих векторах.

3. Трансформированная клетка млекопитающего по п.1, где нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, находятся в одном экспрессирующем векторе.

4. Трансформированная клетка млекопитающего по п.1, где функциональный фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации по меньшей мере от 50 до 60 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч.

5. Трансформированная клетка млекопитающего по п.4, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого трансформированной клеткой, является полностью процессированным.

6. Трансформированная клетка млекопитающего по п.1, где функциональный фурин секретируется в супернатанте культуры в концентрации по меньшей мере от 90 до 100 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч.

7. Трансформированная клетка млекопитающего по п.6, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого трансформированной клеткой, является полностью процессированным.

8. Трансформированная клетка млекопитающего по любому из пп.1-7, где клеткой млекопитающего является клетка яичника китайского хомяка (СНО), эмбриональная клетка почки человека, клетка почки примата, фибробласт и миеломная клетка мыши.

9. Эукариотическая система экспрессии белка для получения полностью процессированного фактора X, содержащая

линию клеток млекопитающего, подходящую для экспрессии белков млекопитающего;

первый экспрессирующий вектор, который экспрессирует фурин человека в линии клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека; и

второй экспрессирующий вектор, который экспрессирует фактор X в линии клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор X,

где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от 50 до 300 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч и по меньшей мере 85% фактора X является полностью процессированным.

10. Эукариотическая система экспрессии белка по п.9, где линия клеток млекопитающего способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от 50 до 60 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч.

11. Эукариотическая система экспрессии белка по п.10, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

12. Эукариотическая система экспрессии белка по п.9, где линия клеток млекопитающего способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от 90 до 100 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч.

13. Эукариотическая система экспрессии белка по п.12, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

14. Эукариотическая система экспрессии белка для получения полностью процессированного фактора X, содержащая

линию клеток млекопитающего, подходящую для экспрессии белков млекопитающего;

экспрессирующий вектор, который экспрессирует фурин человека и фактор X, где экспрессирующий вектор включает первую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор X, где линия клеток способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации от 50 до 300 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч и по меньшей мере 85% фактора X является полностью процессированным.

15. Эукариотическая система экспрессии белка по п.14, где линия клеток млекопитающего способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от 50 до 60 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч.

16. Эукариотическая система экспрессии белка по п.15, где по меньшей мере 90% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

17. Эукариотическая система экспрессии белка по п.14, где линия клеток млекопитающего способна секретировать функциональный фурин в супернатант культуры в концентрации по меньшей мере от 90 до 100 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч.

18. Эукариотическая система экспрессии белка по п.17, где по меньшей мере 95% фактора X, продуцируемого системой экспрессии, является полностью процессированным.

19. Эукариотическая система экспрессии белка по любому из пп.9-18, где клеткой млекопитающего является клетка яичника китайского хомяка (СНО), эмбриональная клетка почки человека, клетка почки примата, фибробласт и миеломная клетка мыши.

20. Способ получения трансформированной клетки млекопитающего по п.1, включающий

трансфекцию линии клеток млекопитающего, подходящей для экспрессии белков млекопитающего, с использованием первого экспрессирующего вектора, который экспрессирует фурин человека в линии клеток, где первый экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фурина человека;

трансфекцию линии клеток млекопитающего с использованием второго экспрессирующего вектора, который экспрессирует фактор X в линии клеток, где второй экспрессирующий вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора X;

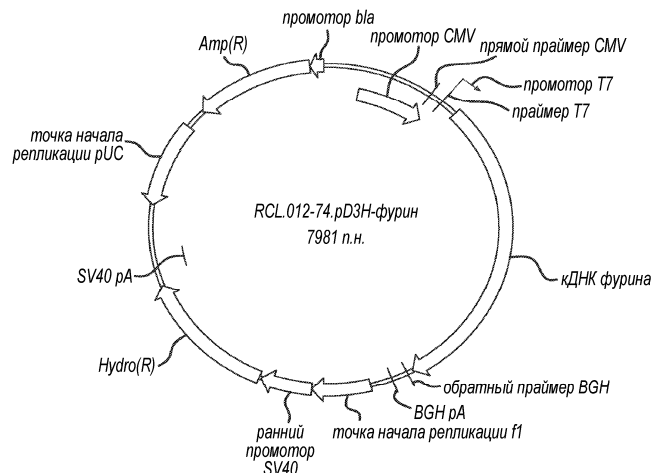
получение клетки млекопитающего, трансфицированной с использованием первого и второго экспрессирующих векторов, экспрессирующих и секретирующих функциональный фурин человека в супернатанте культуры в концентрации от 50 до 300 Ед/мл после культивирования в течение от 42 до 78 ч.

21. Способ по п.20, где линию клеток млекопитающего трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора одновременно.

22. Способ по п.20, где линию клеток млекопитающего трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора до трансфекции клеток с использованием второго экспрессирующего вектора.

23. Способ по п.20, где линию клеток млекопитающего трансфицируют с использованием первого экспрессирующего вектора после трансфекции клеток с использованием второго экспрессирующего вектора.

24. Способ получения зрелого, полностью процессированного FX, включающий культивирование трансформированной клетки млекопитающего по любому из пп.1-8 в культуральной среде и выделение зрелого, полностью процессированного FX из культуральной среды.



Фиг. 1А

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCT
GCTTGTGTGTGGAGGTTCGTGAGTGTGCGGAGCAAAATTTAAGCTCAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTCATGAAGAAFT
GCTTAGGGTTAGGCGTTTTCGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACCGGTTGACATTTGACTAGTTATTAATAGTAAAT
CAATTACGGGTTTCACTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAAC
GACCCCGCCCATTTGACCTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAACGGCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTT
TTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG
TCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAA
GCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCAGGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTCGAGATATCCAGCACAGTGGC
GGCGCATGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACAGGAACTTGGTCCCTGCTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAA
GGTCTTACCACACAGTGGGCTGTGCGCATCCCTGGAGGCCAGCGGTGGCCAACAGTGTGGCACGGAAGCATGGGTTCTCAACCTGG
GACAGATCTTCCGGGACTATTACCACTTCTGGCATCGAGGAGTACGAAAGCGTCCCTGTCCCTTCCAGCCCGCGGCACAGCCGGCTG
CAGAGGGAGCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAAGCGAGCTAAACCGGGACGTGTACCAGGAGCCACAGACCCCAA
GTTTCTCTCAGCAGTGGTACTGTCTGGTGTCACTCAGCCGGACTGAAATGTGAAGCGGCCCTGGGCGCAGGGTACACAGGGCACGGCA
TTGTGGTCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAGAACCACCCGGACTTGGCAGGCAATFATGATCTGGGGCCAGTTTGTATGTCAAT
GACCCAGCCCTGACCCCCAGCTTCCGTACACACAGATGAATGACAACAGGCACGGCACCGGTGTGCGGGGAGTGGCTCGGTGGC
CAACAACGGTCTGTGGTGTAGTGTGGCTACAACGCCCGCATTTGGAGGGTTCGATGTGGATGGCGAGGTGACAGATGACAGTGG
AGGCACGCTCGCTGGGCTGAACCCCAACACATCCACATCTACAGTGCAGCTGGGGCCCGAGGATGACCGCAAGACAGTGGATGGG
CCAGCCCGCTTCGCTGAGGAGGCTTCTTCCGTGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGGCTGGGCTCCATCTTTGTCTGGGCTTCGGGGAA
CGGGGGCCGGAACTGACAGCTGCAACTGCGAGCGCTACACCAACAGTATCTACAGCTGTCCATCAGCAGCGCCACGCAGTTGGCA
ACGTCCCGTGTACAGCGAGGCTGCTCTCCACACTGGCCACGACTACAGCAGTGGCAACCAGAAATGAGAAAGCAGATCGTGACGACT
GACTTGGCGCAGAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCTCTGCCCCCTTAGCAGCCGGCATCATTTGCTCTCACCTGGAGGC
CAATAAGAACCTCACATGGCGGACATGCAACACCTGGTGGTACAGACCTCGAAGCCAGCCACCTCAATGCCAACGACTGGGCCACCA
ATGGTGTGGCCCGAAAGTGAAGCCACTCATATGGCTACGGGCTTTTGGACGCAAGCGCCATGGTGGCCCTGGCCAGAATGGACCA
GTGGCCCCCAGCGGAAGTGCATCATCGACATCTTACCGAGCCCAAGACATCGGGAACCGGCTCGAGGTGCGGAAGACCGTGCACCG
GTGCTGGGCGAGCCCAACACATCACTCGGCTGGAGCAGCTCAGGCGCGGCTCACCTGTCTATAATCGCGTGGCGACTGGCCA
TCCACTGGTTCAGCCCATGGGCACCCGCTCCACCTGCTGGCAGCCAGGCCACATGACTTCCGCAGATGGGTTAATGACTGGGCC
TTCATGACAACCTCAFTCTGGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGTCTTAGAGATTGAAAACACACGCGAAGCCAACTATGGGAC
GCTGACCAAGTTACCCCTCGTACTCTATGGCACCGCCCTGAGGGGCTGCCCGTACCCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACCTCAGT
CCAGTCAGGCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTTCTCCCTGCACAGAAAGCTGTGTCCAGCAGCTGCCCTCCAGGCTTCGCCCCCAA
GTCTCTGATACGCACTATAGCACCGAGAATGACGTGGAGACCATCCGGGCCAGCGTCTGCGCCCCCTGCCAGCCTCATGTGCCACATG
CCAGGGGCCCGCCCTGACAGACTGCCCTCAGCTGCCACGCCAGCCCTCTGGACCTGTGGAGCAGACTTGTCTCCCGCAAAGCCAGA
CGAGCCGAGAGTCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGCTGCCCGCGAGGTGGAGGCGGGCAACGGCTGCGGGCAGGCGTCTGCC
TCACACCTGCTGAGGTGGTGGCCGGCCCTCAGCTGCGCCCTTCTCGTGTGGTCTTCTGCTCACTGTCTTCTGCTGCTGCGCTC
TGGCTTTAGTTTTTGGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTCATCTCTACAAAGGGGCTGCCCCCTGAAGCTTGGCAGGAGG
AGTGGCCGCTCTGACTCAGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGAGAGGACCGCTTTATCAAAGACCAGAGCGCCCTCTGATCTAGAGGGCC
GTTTAAACCCGCTGATCAGCTCCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCTCCCGCTGCTTCTTGCACCTGGA
AGGTGCCACTCCCACTGCTTCTTCTAAFAAAATGAGGAATFGCATCGCATTTGTCTGAGTAGTGTCAATCTATTCTGGGGGGTGGG
TGGGGCAGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCCGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGCCGAAAGA
ACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTGGTACCGCGCAGCTGACCCG
TACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCAGCTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAA
ATCGGGGCATCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAATGATAGGGTATGGTTACGTTAGTGGG
CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAAATGGAACAACACT
CAACCTATCTCGGTCTATTTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCCGGCTATGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
TTAACGCGAATTAATTTCTGTGAAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGGCAGGCAGAAATGCAAAAGCATG
CACTCTCAATTTAGTCAGCAACCCAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGCAGAAATGCAAAAGCATGCTCAATTTAGTCAAG
AACATAGTCCCGCCCTTAACTCCGCTCCATCCCGCCCTAACCTCCAGTCCCGCCATTTCCGCCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGAATTTTTT
TTATTTATGACAGGCGGAGGCCGCTCTGCTCTGAGCTATTTCCAGAAGTAGTGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTTGCAA
AAGCTCCCAGGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGATGAAAAGCTGAACCTCACCGCAGCTCTGTCGAGAAAT
TCTGATCGAAAAGTTCCACAGCGTCTCCGACCTGATGCGACTCTCGAGGGCGAAGAAATCTCGTCTTTTCCGCTTTCAGCTTTCAGGAGG
TGATATGCTCGCGGTAATAAGCTGCGCGGATGGTTTCTACAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGATCGGCGCTCCG
ATTCGGAAGTGTGACATTTGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCT
GCTGAAAACCGAAGTCCCGCTGTCTGTCAGCCGGTCCGGAGGCCATGGATGGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGT
TCGGCCATTCGGACCGCAAGGAATCGTCAATAACACTACATGGCGTATTTCAATATGCGGATGCTGATCCCATGTTGATCACTGG
CAAATGTGATGGACGACACCGTCACTGCGTCCGTGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCG

GCACCTCGTGACCGGGATTCGGGCTCCAACAATGTCCTGACGGCAATGGCCGCATAACAGCGGTCACTTACTGGAGCGAGGCGATGT
TCGGGGATCCCAATACGAGGTCGCCAACAATCTTCTTCTGGGAGCCGTGGTGGCTGTATGGAGCAGCAGACCGCTACTTTCGAGCGG
AGGCATCCGGGATCCAGGATCCGCCCGGCTCCGGGCTATATGCTCCGCATTCGGCTTGGTCTTGACCAACTCTACCGAGCTTGGTGCACGG
CAATTTTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGACTGTGGGGCTACACAAATCGCCC
GCAGAAGCGCGGCTTTCGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGCAGCCCGCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAAG
GAATAGCACGTGCTACGAGATTTTCGATTCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAAATCGTTTTCCGGGACCGCGGCTGGAT
GATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCCTCGCCACCCCAACTTGTTTATGTCAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATA
GCATCACAATAATTCACAATAAAGCATTFTTTTCACTGCATTTAGTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGCTGT
ATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAA
CATAACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGGAGCTAACTCACATTAATTCGCTTGCCTCACTGCCTCGCT
TCCAGTCGGGAACCTGTCTGTCGCTGCATTAATGAAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTAATGGGCGCTCTCCGCT
TCCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGCTCGTTCGGCTCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGTAAATACGGTTATCCACAGA
ATCAGGGGATAACCGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCTTGGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGAGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGGC
TTTCCCTCGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCGACCCCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGAAGCGT
GGCGCTTTCGAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTTTCGTCAGCAACCCCGCTT
AGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATCGTCTTGGAGTCAACCCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT
AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCTAATACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT
TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTTACCTTCGGAAGAGAGTGTGGTAGCTCTTGTATCCGGCAAAACCAACCCGCTGGTAGCGGTG
GTTTTTTTGTTCGAAGCAGCAGATTCAGCGCAGAAAAGAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTCAGCGCTTTCAGCTCAG
TGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTGGTTCATGAGATTAATAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTT
TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTACCAATGCTTAAATCAGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCTAT
TTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCGTCTGTGATGATAACTACGATACCGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATA
CCGCGACACCCACGCTCACCGCTCCGATTTATCAGCAATAAACCAGCCGCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTT
ATCCGCTTCCATCTATTAATTTGTCGGGAAAGCTAGAGTCTAGTTAGTTTCGCTCAGTTAATAGTTTGGCAAGCTTGTGCTTTCATTTG
CTACAGGCATCTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCACCAAGATCAAGGCGAGTACATGATCCCC
ATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTGTGAGAAGTAAAGTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGC
AGCACTCATAAATTTCTTACTGTCTCATCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTATTCTGAGAATAGT
GTATGCGCGACCCAGTGTCTTTCGCGCGCTCAATCCGGATTAATACCGCCACATAGCAGAATTTAAAGTGCTCATCATTTGGA
AAAGCTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTGGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTC
AGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTTCGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAAATAAGGGCGACACGGAAAT
GTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTAATGAAGCAATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTT
TAGAAAAATAAAATAAAGGGTTCCGCGCACATTTCCCGCAAAAGTGCACCTGACGTC

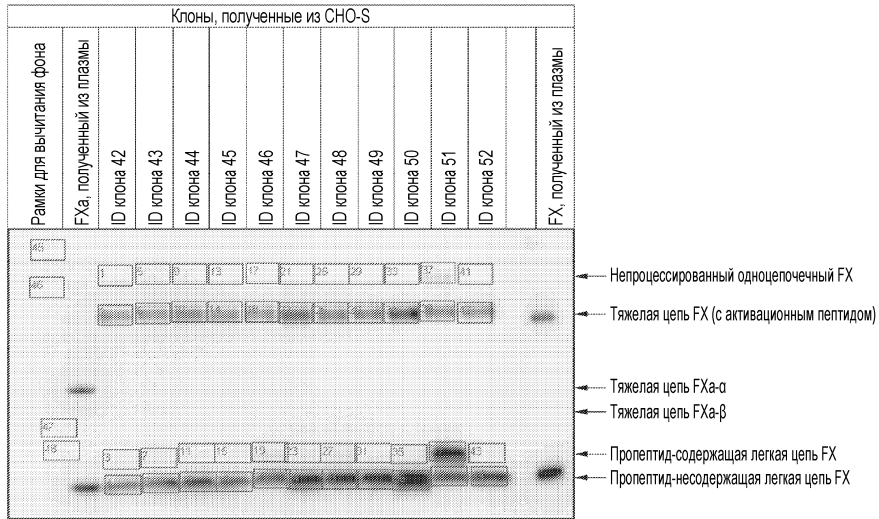
Фиг. 1B

ATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACAGGAACCTTGGTCTGCTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAAGGTCTT
CACCAACAGTGGGCTGTGCGCATCCCTGGAGGCCAGCGGTGGCCACAGTGTGGCACGGAAGCATGGGTCTCTCAACCTGGGCCAG
TCTTCGGGACTATACCCTTCTGGCATCGAGGAGTACGAAAGTCCCTGCTCGCTCACCGCCCGGACAGCCGGCTGACAGAG
GAGCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAGCGAGCTAAACGGGACGTGTACCAGGAGCCACAGACCCCAAGTTTCC
TCAGCAGTGGTACCTGTCTGTGTCATCTCAGCGGACCTGAATGTGAAGGCGGCTGGGCGCAGGGCTACACAGGGCACGGCATTTGTTG
TCTCCATTTGGACGATGGCATCGAGAAGAACCACCCGGACTTGGCAGGCAATATGATCTCCTGGGCGAGTTTGTATGTCAATGACACG
GACCCTGACCCCGAGCTCGGTACACACAGATGAATGACAACAGCAGCGGCACACCGTGTGCGGGGAAAGTGTGCTGCGTGGCCAA
CGGTGCTGTGGTGTAGGTGTGGCTTACAAACCGCCGATTTGGAGGGGTGCGCATGTGCTGGATGGCGAGGTGACAGATGCGATGGAGGC
GCTCGCTGGGCTTGAACCCCAACCATCCACATCTACAGTGCAGCTGGGGCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGGGCGAGCC
CGCTTCGCGAGGAGGCTTCTTCGCTGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGGCTGGGCTCCATTTGTCTGGGCTCGGGAAACGGGG
CCGGCAACATGACAGCTGCAACTGCGACGCTACACCAACAGTATCTACAGCTGTCCATCAGCAGCGCCACGAGTTTGGCACAGTGC
CGTGTACAGCGGCTGCTCGTCCACACTGGCCACGACTACAGCAGTGGCAACAGAAATGAGAAGCAGATCGTGCAGCTGACTTG
CGGCAGAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGACCTCAGCCTCTGCCCTTTCAGCAGCCGGCATCATGCTCTCACCTTGGAGGCCAATAA
GAACCTCATATGGCGGACATGCAACACCTGGTGGTACAGACTCGAAGCCAGCCCACTCAATGCCAACGACTGGGCCCAATGGTG
TGGGCCGAAAGTGAAGCACTCATATGGCTACGCGCTTTTGGACGACAGCGCCATGGTGGCTTGGCCAGAAATGGACACAGTGC
CCCCAGCGAAGTGCATCATCGACATCTCACCGAGCCCAAGACATCGGAAACGGCTCGAGGTGCGGAAGACCGTGCACCGCTGCT
GGGCGAGCCCAACCATCACTCGCTGGAGCAGCTCAGGCGCGGCTCACCTGTCTATAATCGCGTGGCGACTGGCCATCCACC
TGGTTCAGCCCATGGGACCCGCTCCACCTGTGGCAGCCAGGCCACATGACTACTCCGAGATGGGTTTAAATGACTGGGCTTTCATG
ACAACCTCATCTGGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGGCTTGAAGATTTGAAACAACAGCGAAGCCAACTATGGGACCTGAC
CAAGTTCACCTCGTACTCTATGGCACCGCCCTGAGGGGTGCGCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACCTCACGCTCCAGTC
AGGCTCTGTGTGTGCGAGGAAGCTTCTCCTGCAACGAAAGAGCTGTGTCAGCACTGCCCTCCAGGCTTCGCCCCCAAGTCTC
GATACGACTATAGCACCCGAAATGACGTGGAGACCATCCGGGCGAGCTCTGCGCCCTGCAATGTCACATGTCAGGCGG
GCCGGCCCTGACAGACTGCTCAGCTGCCCGCAGCCAGCCCTCTTGGACCTGTGGAGCAGACTTGTCTCCGGCAAGCCAGAGCAGCC
GAGAGTCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGCTGCCCGGAGGTGGAGGCGGGCAACGGCTGCGGGCAGGGCTGCTGCCCTCACAC
CTGCTGAGGTGGTGGCCGCTCAGCTGCGCTTCACTCGTGTGGTCTTCTGTCATGCTTCTCTGGTCTGCTGAGCTGCGCTTGGCTT
TAGTTTTCCGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCTCATCTCCTACAGGGGCTGCCCCCTGAAGCTGGCAGGAGGAGTGC
CGTCTGACTCAGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGAGAGGACCGCTTATCAAAGACAGAGCGCCCTCTGA

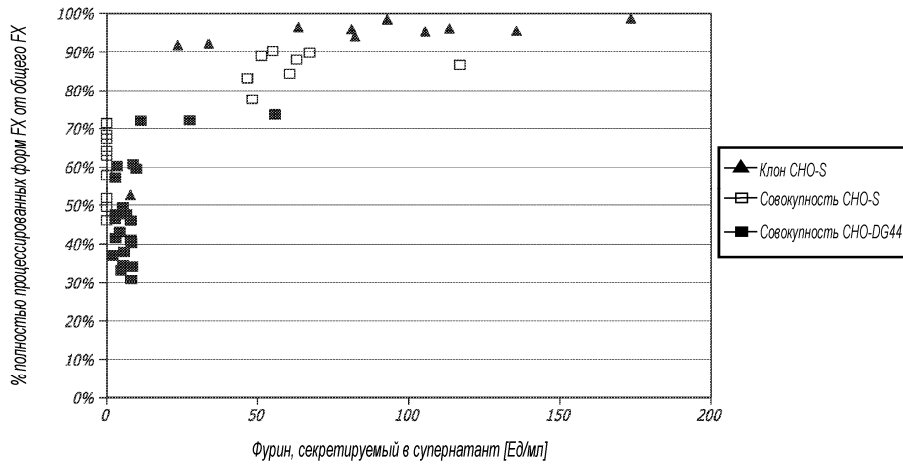
Фиг. 2

MELRPWLLWVAATGTLVLLAADAQCKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFNLGQIFGDYVHFWRHGVTKRSLSPHRPRHSRLQR
EPQVQWLEQQVAKRRTRKRDVYQEPDTPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQYTGHHGIVVSI LDDGI EKNHPDLAGNYDPGASFDVNDQ
DPDPQPRVTQMNDRHGTRCAGEVAAVANNNGVCGVGVAYNARIGGVRLMDGEVTDVAEARSLGLNPNHIHISASWGPEDDGKTVDPGA
RLABEAFPRGVSQGRGGLSIFVWASGNNGREHDSNCNDGYTNSIYTLISSATQFGNVWPYSEACSSLATYSSGNQNEKQIVTFTDL
RQKCTESHTGTSASAPLAAGI IALTLANKLNTWRDMQHNVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYLLDAGAMVALAQNWTVA
PQRKCIIDILTEPKDIGKRELVKRTVTAELGEPNHI TRLEHAQARLTLNRRGLDLAIHLVSPMGRSTRLLAARPHDYSDGFNDWAFM
TTHSWDEBPSGHWLBIENTSEANNYGTLLTKFTLVLYGTAPBGLVPPBSSGCKLTLSSQACVVCBEGFSLHQKSSQVQCPFGFAPQV
DTHYSTENDVETIRASVCAPHASCATCQGPALTDLCSLPSHASLDPEVQTCRSRQSRSRESPPQQPPRLPPEVEAGQRLRAGLLPSH
LPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSPRQVTKYTMDRGLISYKGLPPEAWQEBECPDSEBDEGRGERTAFIKDQSAI

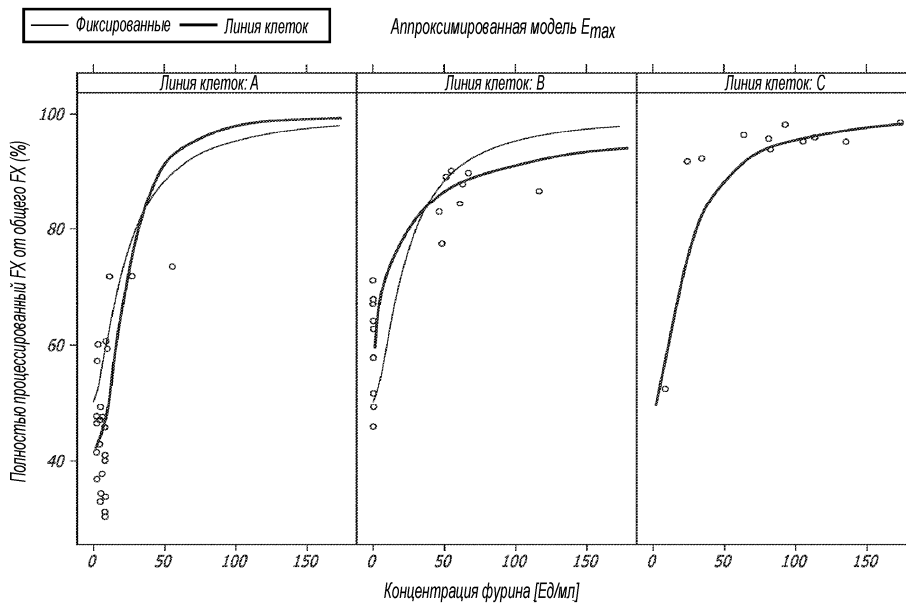
Фиг. 3



Фиг. 4

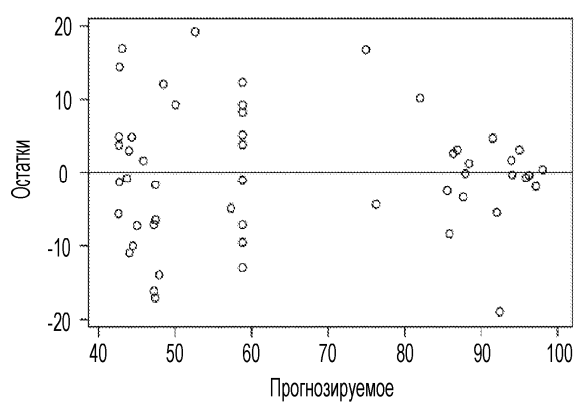


Фиг. 5



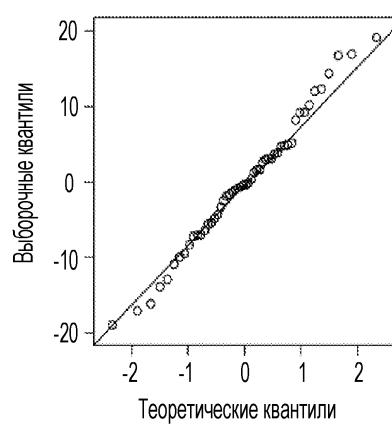
Фиг. 6

Остаток по сравнению с прогнозируемым



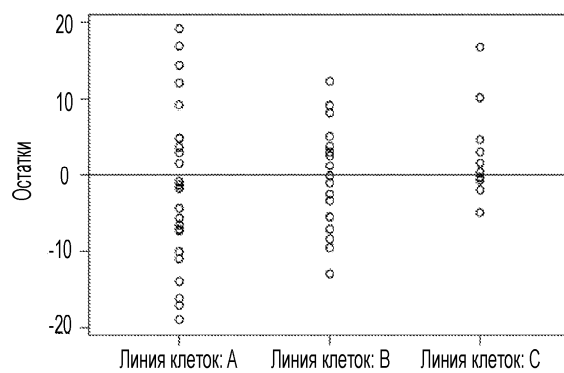
Фиг. 7А

Нормальный график Q-Q для остатков



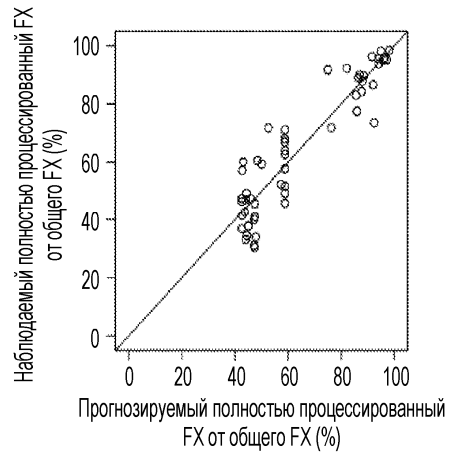
Фиг. 7В

Остаток по сравнению с линией клеток

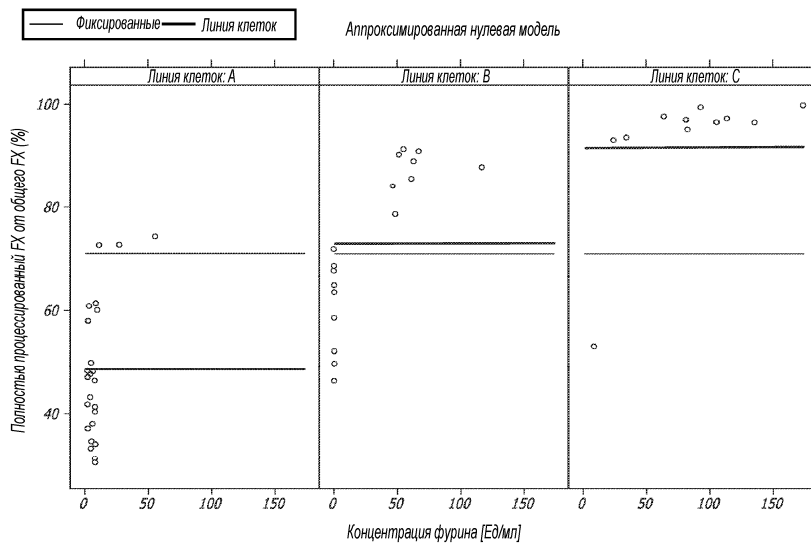


Фиг. 7С

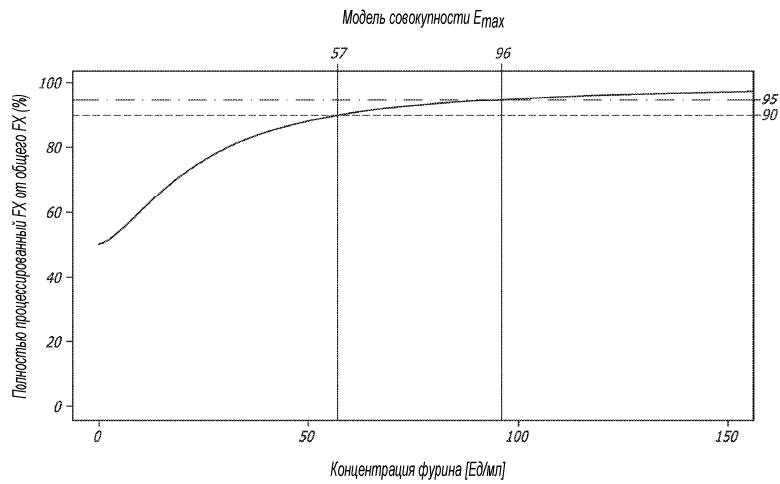
Наблюдаемое по сравнению с прогнозируемым



Фиг. 7D



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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