

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036992**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.25

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(21) Номер заявки
201692057

(22) Дата подачи заявки
2015.04.20

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА**

(31) **14165334.5**

(56) WO-A1-2012136852
JP-A-2009292801

(32) **2014.04.18**

(33) **EP**

(43) **2017.02.28**

(86) **PCT/EP2015/058533**

(87) **WO 2015/158927 2015.10.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕКИРУС ЮКЕЙ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Хо Сэмьюэл, Паркер Дэвид, Феккес
Петер, Дэ Суза Ивна, Мэйсон Питер,
Суфафифат Пирада (US)**

(74) Представитель:
Белков В.М., Пыльнев Ю.А. (RU)

(57) Изобретение относится к способам повышения выхода белка и клеточной продуктивности. Химические соединения способствуют продуцированию клетками-хозяевами биологических молекул для повышения выхода продукта.

B1

036992

036992
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к способам и композициям для получения биологических молекул (например, биологических препаратов) в клетках-хозяевах, таких как терапевтические, профилактические и диагностические белки. Изобретение относится также к повышению выхода биологических молекул из культивируемых клеток.

Предпосылки создания изобретения

Многие биологические препараты, такие как терапевтические, профилактические и диагностические белки, продуцируются в клетках-хозяевах. Антигены, используемые для приготовления вакцины, например для вакцин против гриппа, зачастую производятся в клетках млекопитающих или в куриных яйцах (Govorkova, et al., Dev. Biol. Stand. 98:39-51, (1998)). Аналогично, многие рекомбинантные белки, в том числе моноклональные антитела и терапевтические средства на основе пептидов, продуцируются в подходящих клетках-хозяевах. Тем не менее, выход в этих системах продуцирования зачастую остается субоптимальным.

Было проведено несколько исследований для повышения выхода антигенных белков или вирусов, продуцируемых в клеточной культуре или яйцах. Производители противогриппозных средств вводили 25 мкг/мл гидрокортизона в качестве добавки в свежий инокулят, используемый для инфицирования яиц с развивающимися эмбрионами (международная патентная публикация WO 02/074336). Для повышения производительной способности клеточных культур тестировали обработку соединениями с малыми молекулами, лекарственными средствами или белками. В международной патентной публикации WO 2012/134130 описано взаимодействие белка CHD6 и полимеразы вируса гриппа в качестве отрицательного модулятора репликации вируса. Гены CHD6 подавлялись инфицированными трансфектирующими, зараженными гриппом клеточными линиями HEK293T или A549 с РНК с короткой "шпилькой". Этот метод дает примерно 5-10-кратное увеличение титра вируса по сравнению с контрольными клетками.

В другом исследовании, описанном в патенте США № 7132271, описывается, что подавление интерферон-опосредуемых противовирусных ответов, в частности двухпочечных РНК-зависимых киназ, может вызывать способность клеточных культур стимулировать повышенную репродукцию вируса. Перед заражением вирусом стабильные или транзиторные клетки были модифицированы с получением мутаций с дефицитом PKR или 2-5A синтетазы. Установлено, что EMCV (вирус энцефаломиокардита) может воспроизводиться в PKR-дефицитных клетках при 0,001 TCID₅₀/клетка с тысячекратным и более увеличением вирусной репликации по сравнению с контролем.

В публикации патента США 2013-0315954 раскрывается способ улучшения продуцирования вируса гриппа, при котором продуцирование осуществляется в присутствии ингибитора, имеющего малую молекулу, взаимодействия между белком Mdm2 и белком p53. Соединения, имеющие небольшие молекулы, включают производные имидазолина, производные имидазола, производные оксиндола, производные спироиндолинона, производные хинолина, производные бисарилсульфонамида, производные бензодиазепина, производные пиперидина, производные феноксиуксусной кислоты, производные феноксиметилтетразола, производные халкона, производные тетразола, дисульфидные производные, диаминоарильные производные и пептидные ингибиторы Mdm2 белков. В одном конкретном эксперименте клеточную линию MDCK, зараженную вирусом гриппа H3N2, обрабатывали 0,1, 1,0 и 10 мкМ производного дигидроимидазола (Nutlin-3).

Количественное определение вирусного генома в супернатанте показало, что при исходной множественности заражения (multiplicity of infection - MOI) 10⁻³ и предварительной обработке нутлином через 24 ч после заражения в супернатанте произведено до 19 раз больше копий вирусного генома по сравнению с контролем.

В международной патентной публикации WO 2012/136852 раскрывается применение фармацевтических лекарственных средств для повышения производительной способности клеток MDCK или A549 продуцирования вируса гриппа А. После инкубирования с лекарственным средством в течение 24-48 ч после заражения определяли титр вируса и активность нейраминидазы. 0,01-10 мкМ симвастатина добавляли перед инокуляцией вирусом гриппа подтипа А и получали примерно 1,5-3-кратное увеличение титра вируса H1N1 при концентрации 1,0 мкМ. Показано, что только один штамм вируса гриппа подтипа А (H1N1, но не H3N2 и H5N1) дает более чем приблизительно 1,5-кратное увеличение титра вируса в клетках, обработанных симвастатином. Повышение выхода вируса для других фармацевтических препаратов с использованием испытанных штаммов вируса гриппа А зависело от штамма, дозы и/или лекарственного средства.

На сегодняшний день в патентной или научной литературе не описано применение соединений, имеющих небольшие молекулы, в очень низких концентрациях, таких как 0,05 мкМ или менее, для повышения выхода биологических молекул в системах клеток-хозяев. Сохраняется потребность в надежном производстве, повышенных эффективностях производства и экономически эффективной технологической переработке биологических продуктов для лечебного, профилактического и диагностического применения.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение в целом представляет способы, которые повышают продуцирование белков, подходящих для фармацевтических областей применения, таких как диагностические, терапевтические или профилактические области применения. Таким образом, изобретение подходит для производства фармацевтических препаратов, например биологических препаратов, включая вакцины.

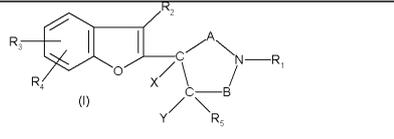
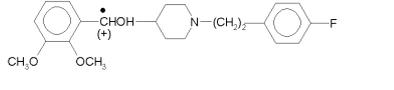
В широком смысле изобретение включает в себя выявление того, что модуляция определенного(ых) пути(ей) клеточного метаболизма в системе клетки-хозяина может привести к повышенному продуцированию биологических молекул в хозяине. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединения, применимые для осуществления настоящего изобретения, могут регулировать липидизацию (пренилирование) белка, биосинтез холестерина и/или сигнальную трансдукцию G-белок-связанного рецептора, такую как внутриклеточная цАМФ-зависимая передача сигнала.

Точнее, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способам повышения выхода биологических молекул, таких как рекомбинантные белки и вирусные частицы, полученные в системах клеток-хозяев, путем модуляции статин-ассоциированного клеточного пути метаболизма. Без теоретического обоснования данные, представленные в настоящем документе, свидетельствуют о том, что эффект повышения выхода может опосредоваться мевалотаным путем метаболизма, включая как холестерин-зависимые, так и холестерин-независимые механизмы действия.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам повышения выхода биологических молекул, таких как рекомбинантные белки и вирусные частицы, полученные в системах клеток-хозяев, посредством модуляции допамин- и/или серотонин-ассоциированного пути клеточного метаболизма. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подходящие соединения, которые влияют на допаминовый путь и/или серотониновый путь метаболизма, являются селективными лигандами одного или нескольких рецепторов, такими как агонисты и антагонисты (например, полные агонисты, частичные агонисты, нейтральные антагонисты, обратные агонисты и т.д.). В некоторых вариантах осуществления изобретения такие соединения действуют по меньшей мере через один серотониновый рецептор, включая, но без ограничения, 5-HT₇, 5-HT₁, и/или 5-HT₅ рецепторную передачу сигнала в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие соединения действуют посредством 5-HT₇ рецепторной передачи сигнала. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие соединения могут снижать уровни внутриклеточного цАМФ.

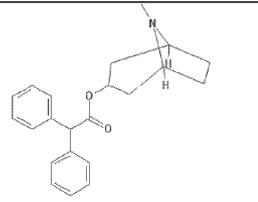
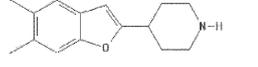
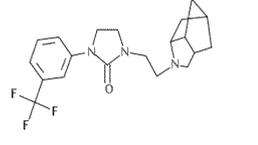
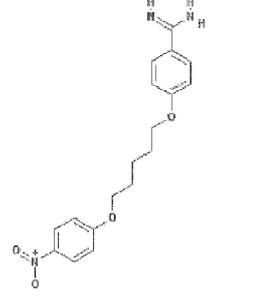
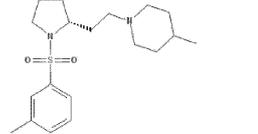
Авторы настоящего изобретения неожиданно установили, что наблюдаемые эффекты повышения не ограничиваются ни продуцированием вируса в клетке-хозяине, ни конкретной клеточной линией. Скорее всего, применение подходящих соединений, описанных в данном изобретении (например, соединений, которые могут модулировать статин- и/или 5HTR-ассоциированную передачу сигнала, включая статины и молекулы, подобные статину, лиганды рецепторов, структурные аналоги или производные, функциональные эквиваленты и их сочетания), может обеспечивать более общие способы повышения продуцирования белка в различных системах клеток-хозяев. Кроме того, авторы настоящего изобретения определили, что некоторые молекулы, представленные в данном изобретении, являются эффективными в повышении продуцирования вируса/белка при применении в удивительно низких концентрациях. Это особенно выгодно для производства фармацевтических продуктов, для которых требуется высокая степень чистоты, подходящая для человека. Таким образом, такие способы подходят для производства биологических препаратов в промышленном масштабе.

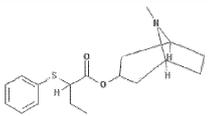
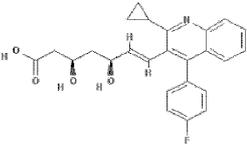
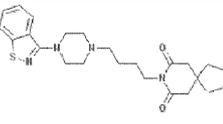
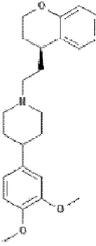
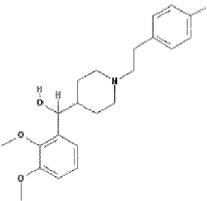
Соответственно, представлены способы получения белков в системах клеток-хозяев, таких как клеточные культуры или яйца с развивающимся эмбрионом, включающие контактирование/обработку клетки-хозяина по меньшей мере одним реагентом, выбранным из табл. 1. Остатки в указанных соединениях подробно определены ниже.

Формула 12 Тетрагидропиридин, пиперидин и их аналоги	
Формула 13 Диметоксифенилпиперидинметанол и его аналоги	

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один реагент (например, один или несколько реагентов) для осуществления настоящего изобретения выбран(ы) из соединений, приведенных в табл. 2.

Таблица 2

СОЕДИНЕНИЕ	ФОРМУЛА	INCHI_KEY	СТРУКТУРА
Соединение <u>А</u> ВА003098-АА-1	$C_{22}H_{25}NO_2$	IUTYUDEPWXQZWTN- UHFFFAOYSA-N	
Соединение <u>В</u> CGP006085A-АА-1	$C_{15}H_{19}NO$	UFGTZUKOBHLAAC- UHFFFAOYSA-N	
Соединение <u>С</u> CGP033313-NX-1	$C_{20}H_{24}F_3N_3O$	DXIYSVWONCXFHW- UHFFFAOYSA-N	
Соединение <u>Д</u> CGS024212A-AG-1 (пентамидин)	$C_{18}H_{21}N_3O_4$	LDKDXQMFHSGGLKV- UHFFFAOYSA-N	
Соединение <u>Е</u> NVP-AFZ077-NX-1	$C_{19}H_{30}N_2O_2S$	YVGGGMRDLOGA- GOSISDBHSA-N	

Соединение <u>Е</u> NVP-AKS755-AH-1	$C_{16}H_{25}NO_2S$	HOVVTKGSYSJEIG- UHFFFAOYSA-N	
Соединение <u>Г</u> NVP-BYF589-BA-1 (питавастати́н)	$C_{25}H_{24}FNO_4$	VGYFMXBACGZSIL- MCBHFWOYSA-N	
Соединение <u>Д</u> PKF114-213-NX-1 (тиоспирон)	$C_{24}H_{32}N_4O_2S$	ZFZPJDFBJFHYIV- UHFFFAOYSA-N	
Соединение <u>И</u> PKF116-328-AE-1 (терикалант)	$C_{24}H_{31}NO_3$	UIZPEXQHMIZQPQ- IBGZPJMESA-N	
Соединение <u>Л</u> PKF117-462-NX-1 (MDL 100907)	$C_{22}H_{28}NO_3F$	HXTGXRYRHAGCFP- UHFFFAOYSA-N	

Как с коммерческой точки зрения, так и с точки зрения безопасности особенно предпочтительно достижение высокого выхода белка в системе клеток-хозяев (например, в культуре клеток и яйцах) при применении соединений, описанных в данном изобретении, в относительно низких концентрациях.

Соответственно, настоящее изобретение представляет способ получения биологических молекул из систем клеток-хозяев, таких как клеточные культуры или яйца, включающий контактирование клетки-хозяина по меньшей мере с одним химическим реагентом, таким как статин или производное статина, при низких концентрациях. В некоторых вариантах осуществления изобретения статин или производное статина не является симвастатином. Такой реагент может присутствовать в конечной концентрации в интервале от 0,001 до 10 мкМ, предпочтительно 0,05 мкМ или менее, когда клетка-хозяин представляет собой клеточную культуру. Когда клетка-хозяин представляет собой яйцо с развивающимся эмбрионом, химический реагент может присутствовать в концентрации по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 мкМ на яйцо или более.

Подходящие химические реагенты, используемые в настоящем изобретении, представляют собой химические соединения, которые обладают терапевтической эффективностью и нетоксичны при применении в клетках или животных. Особенно желательно, чтобы такие соединения обладали подробно описанными профилями безопасности для регуляторных целей. Таким образом, применимые химические реагенты могут быть выбраны из коммерчески доступных фармацевтических лекарственных средств, которые были одобрены как безопасные для человека и, таким образом, прошли тщательное тестирование на токсичность и выведение. Такие реагенты особенно подходят в качестве усилителей производительной способности биологических систем продуцирования. Соответственно, способы по изобретению включают известные фармацевтические средства, химические реагенты и их аналоги, описанные в настоящем документе. Предпочтительно эти реагенты применяются в количестве, эффективном для повышения выхода биологического продукта по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 3,5 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 4,5 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 5,5 раза, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 6,5 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере, примерно в 7,5 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 8,5 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, по меньшей мере примерно в 9,5 раз или примерно в 10 раз или более по сравнению с контролем.

Способ по настоящему изобретению может также повышать выход биологических молекул или биологических продуктов, которые продуцируются в соответствии с данным изобретением, по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 500% или более по сравнению с контролем. Предпочтительно повышение выхода можно количественно определить по количеству полученных биологических молекул, например по общему количеству частиц (вРНК копий/мл), инфекционных частиц (IU/мл) или белка (г/мл) в культуральной надосадочной жидкости по сравнению с контролем. Для производства вируса гриппа предпочтительно повышение выхода HA антигена измеряется по сравнению с контролем. Для целей данного изобретения повышение выхода предпочтительно измеряется с помощью обнаружения целевого продукта методом ELISA, для вакцин гриппа - методом HA-ELISA.

Предпочтительными химическими реагентами являются реагенты, которые не подвергаются значительному метаболизированию клетками-хозяевами. Химические реагенты являются стабильными и не подвергаются разложению в присутствии клеток-хозяев, реагентов и в условиях производства, и их наличие может отслеживаться с помощью применяемых методов анализа на протяжении всего производственного процесса. Также предложены способы клиренса или разложения химических реагентов по настоящему изобретению, используемых в системах клеток-хозяев.

Несмотря на то, что химические реагенты не должны присутствовать в очищенном образце (например, продукте), реагенты могут отслеживаться в ходе производственного процесса. Реагенты являются химически стабильными и могут количественно определяться или обнаруживаться в их неметаболизированной форме в супернатанте клеточной культуры через 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 ч контактирования с клеткой-хозяином. Предпочтительно реагенты не подвергаются разложению, что определяется в конечном продукте с помощью масс-спектрометрии с пределом обнаружения 0,5 нг/мл в чистом растворителе (примерно 50% ацетонитрил). При производстве вакцины против гриппа не подвергшиеся метаболизму химические реагенты отсутствуют или их невозможно обнаружить, т.е. в присутствии в количествах, которые не могут быть обнаружены при пределе обнаружения (limit of detection - LOD) 0,5 нг/мл или менее, в чистом растворителе, в супернатанте клеточной культуры в течение периода до 60 ч после инфицирования (например, при MOI вирусной инфекции 10^{-3} или 10^{-4}).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ производства биологических продуктов, таких как белки и вирусы, представляющие интерес, в системе клетки-хозяина, отличающийся тем, что производство проводится в присутствии по меньшей мере одного химического реагента в конечной концентрации 0,05 мкМ или менее, или в соответствии с которым достигается 2-кратное увеличение выхода продукта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам производства вирусов из клеточной культуры или яиц с развивающимся эмбрионом с применением по меньшей мере одного химического реагента в конечной концентрации в интервале от 0,001 до 1,0 мкМ, посредством чего достигается по меньшей мере двукратное увеличение производства антигена.

Настоящее изобретение особенно применимо и эффективно при производстве вакцин против гриппа за счет улучшения роста вируса, повышения производительной способности клеток, повышения титра вируса, экспрессии и/или выхода HA антигенов. Способ по настоящему изобретению обеспечивает повышенное количество и дозы антигенных продуктов, полученных из расчета на продуцирующую партию. Соответственно, настоящее изобретение представляет способ получения вируса гриппа в клетках-хозяевах, предпочтительно клетках млекопитающих, более предпочтительно культивируемых клетках, отличающийся тем, что производство осуществляется в присутствии по меньшей мере одного реагента с концентрацией 1 мкМ или менее, предпочтительно 0,05 мкМ или менее, посредством которого вирусные частицы или антигены получают с выходом, более чем в 2 раза превышающим контроль.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение представляет способ получения штамма гриппа В в системах клеток-хозяев, таких как культуры клеток или яйца с развивающимся зародышем, отличающийся тем, что производство проводится в присутствии реагента или его производного и приводит к выходу вирусных частиц или антигенов, более чем в 2 раза превышающему контроль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один химический реагент может применяться для обработки клетки-хозяина до, во время или после трансфекции/инфицирования клетки-хозяина с помощью вируса или другого вектора. Клетки-хозяева могут контактировать по меньшей мере с одним химическим реагентом в течение периода продолжительностью от 0 до 1 ч, от 0 до 2 ч, от 0 до 3 ч, от 0 до 4 ч, от 0 до 5 ч, от 0 до 12 ч, от 0 до 20 ч, от 0 до 30 ч, от 0 до 40 ч, от 0 до 50 ч, от 0 до 60 ч до или после трансфекции/инфицирования таким образом, чтобы достичь повышения выхода биологического продукта, представляющего интерес.

Кроме того, изобретение представляет способы повышения продуцирования рекомбинантных белков (или их фрагментов), выходы которых считаются неоптимальными (например, "низкие выходы" и "средние выходы") при экспрессии в определенных клетках-хозяевах в типовых условиях роста. Продуцирование белка считается субоптимальным, когда выходы, как правило, находятся в интервале 2-10 мг/л ("от средних до низких выходов"), в частности примерно 5 мг/л или менее ("низкие выходы"). Такие способы включают в себя применение одного или нескольких соединений по настоящему изобретению, например статинов и их структурных аналогов (включая симвастатин), их функциональных экви-

валентов, а также некоторых GPCR-связывающие реагентов, которые описаны в настоящем изобретении. Способы по настоящему изобретению особенно полезны для увеличения продуцирования белков, производимых с низкими выходами.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена блок-схема процесса идентификации химических реагентов, которые улучшают выход НА.

На фиг. 2 представлено повышение выхода НА зависимым от дозы образом, количественное определенное с помощью ELISA, для штамма H3N2 IVR-165 при $MOI=10^{-4}$ через 60 ч после инфицирования (hours post infection - hpi).

На фиг. 3 представлена диаграмма, иллюстрирующая повышение выхода НА, полученное для нескольких штаммов вируса гриппа подтипа А H3N2 с использованием 1 мкМ сульфонамида или 0,05 мкМ питавастатина. В этих исследованиях, как правило, наблюдалось 2-3-кратное повышение выхода НА.

На фиг. 4 представлена гистограмма, показывающая повышенный выход НА, полученный в нескольких штаммах вируса гриппа подтипа В с использованием 1 мкМ сульфонамида и 0,05 мкМ питавастатина. В зависимости от штамма, как правило, наблюдалось по меньшей мере 2-10-кратное повышение выхода НА.

Фиг. 5 показывает повышение выхода НА, которое количественно определено с помощью кПЦР РНКазы-резистентных М транскриптов вируса гриппа: (а) общее количество частиц в сравнении с выходом НА при использовании 1 мкМ сульфонамида или 0,05 мкМ питавастатина; (б) общее количество всех частиц в сравнении с повышением выхода НА при использовании 0,05 мкМ питавастатина.

На фиг. 6 представлен линейный график, показывающий возможность отслеживания соединений с использованием масс-спектрометрии для обнаружения питавастатина и сульфонамида. Предел обнаружения реагентов от чистого растворителя (50% ацетонитрила) составляет приблизительно 0,5 нг/мл.

На фиг. 7 представлено сравнение выхода вируса гриппа подтипа АН3N2 НА (мкг/мл) из клеток, обработанных производными флувастатина и питавастатином в концентрации 0,05 мкМ и контролем.

На фиг. 8 представлено сравнение выхода НА вируса гриппа подтипа А/Техас Х223А (г/мл) из клеток, обработанных коммерчески доступными статинами.

На фиг. 9 представлена вовлеченность биосинтеза холестерина: фиг. 9А иллюстрирует схему мевалонатного пути метаболизма; фиг. 9В показывает, что блокирование всех трех ветвей биосинтеза холестерина специфическими комбинациями ингибиторов ферментов может имитировать влияние правастатина на выход белка в клетках-хозяевах.

На фиг. 10 представлено наглядное сравнение выходов НА в Ambr15 и встряхиваемых колбах; оба соединения повышают выход "низко"-экспрессирующегося В/Mass/2/12 в средах CDM и DM134 в Ambr15.

На фиг. 11 представлено наглядное сравнение выхода НА в Ambr15 и встряхиваемых колбах; только AFZ077 повышает выход "высоко"-экспрессирующегося А/VIC/361/1 (IVR165) в средах CDM и DM134 СМИ в Ambr15.

На фиг. 12 представлены выходы НА в штаммах вирусов гриппа А и В при применении двух выявленных соединений-лидеров в двух концентрациях при двух различных плотностях клеток (низкая и высокая ICD), как определено с помощью НА-ELISA.

На фиг. 13 представлена диаграмма, показывающая выход НА в штамме вируса гриппа В, испытанном с ВУF589 в указанных концентрациях.

На фиг. 14 представлена диаграмма, показывающая выход НА в штамме вируса гриппа В, испытанном с AFZ077 в указанных концентрациях.

На фиг. 15 представлена диаграмма, показывающая, что повышение выхода НА вируса гриппа с помощью AFZ077 связано со снижением активности 5HT7 рецептора. Штамм вируса гриппа В (В/Массачусетс) в DM134 среде; выход НА через 65 ч, как измерено с помощью ELISA (г/мл).

На фиг. 16 представлены результаты определения выходов НА вируса гриппа штамма А (IVR165), полученные с помощью ELISA после обработки указанными соединениями в указанных различных концентрациях.

На фиг. 17 представлена диаграмма, показывающая сравнение выходов НА при обработке доступными аналогами, выявленными с помощью SAR, и AFZ077.

На фиг. 18 представлены два графика: (А) выход белка в клетках, обработанных ВУF589, относительно необработанных клеток, где каждая точка данных представляет собой протестированный белок-мишень; (В) кратность повышения экспрессии белка как функция контрольного выхода (необработанного), где каждая точка данных представляет собой протестированный белок-мишень.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения определили способы, которые способствуют повышению продуцирования или экспрессии биологических продуктов системами клеток-хозяев. При прочих равных условиях при добавлении по меньшей мере одного химического реагента по изобретению в низких концентрациях продуцирование значительно улучшается по сравнению с продуцированием биологических молекул соответствующими контрольными клетками, обработанными подходящим носителем, таким как ДМСО, при прочих равных условиях.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения повышение выхода биологических молекул в системах клеток-хозяев является по меньшей мере двукратным по сравнению с соответствующим контролем. Выход биологических молекул, полученных в присутствии химических реагентов, используемых в изобретении, может изменяться в зависимости от индивидуальных особенностей конкретной клетки-хозяина, вируса, белка, химического реагента, определения того, какова желаемая клеточная активность, или других определенных пользователем параметров, обычно используемых в данном экспериментальном анализе. В некоторых вариантах осуществления изобретения выход продуцирования представляющего интерес биологического продукта увеличивается по меньшей мере на 20%, например, по меньшей мере на 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450 и 500% по сравнению с контролем (т.е. по сравнению с выходом, полученным без добавленного соединения, но в остальном в эквивалентных условиях).

Подходящие концентрации химических реагентов, используемых в настоящем изобретении, могут быть выбраны в интервале примерно 0,1 нМ - 10 мкМ. Подходящие концентрации соединения, используемого для осуществления изобретения, относятся к концентрациям, эффективным для увеличения выхода продуцирования по сравнению с контролем. Подходящие концентрации могут изменяться в интервале, например, 0,1-5000 нМ, например, 0,5-1000 нМ, 0,5-500 нМ, 0,5-250 нМ, 0,5-200 нМ, 0,5-150 нМ, 0,5-100 нМ, 0,5-75 нМ, 0,5-50 нМ, 0,5-25 нМ, 0,5-20 нМ, 0,5-15 нМ, 0,5-10 нМ, 0,5-5 нМ, 1-100 нМ, 1-75 нМ, 1-50 нМ, 1-25 нМ, 1-20 нМ, 1-15 нМ, 1-10 нМ, 2-50 нМ, 2-40 нМ, 2-20 нМ, 2-10 нМ, и т.д. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективные концентрации составляют $t < 50$ нМ, например, < 40 нМ, < 30 нМ, < 25 нМ, < 20 нМ, < 15 нМ, < 14 нМ, < 13 нМ, < 12 нМ, < 11 нМ, < 10 нМ, < 9 нМ, < 8 нМ, < 7 нМ, < 6 нМ, < 5 нМ. Например, химические реагенты, используемые в настоящем изобретении, могут присутствовать в конечной концентрации 0,001-0,5 мкМ, предпочтительно примерно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 или 0,10 мкМ. Предпочтительно химический реагент контактирует с клеткой-хозяином при самой низкой концентрации, что может обеспечивать увеличение выхода продукта по меньшей мере на 20%. Более предпочтительно химический реагент контактирует с клеткой-хозяином при самой низкой концентрации, которая может обеспечить по меньшей мере двукратное увеличение выхода продукта.

Концентрация химического реагента будет также зависеть от конкретного реагента, системы или условий, которые могут привести к результатам, описанным в данном изобретении, и остаются нетоксичными по отношению к клетке-хозяину, вирусу или биологическому продукту. Оптимальные концентрации, которые обеспечивают достижение результатов по изобретению, могут быть скорректированы с использованием стандартных методов. Например, могут подбираться эксперименты для достижения соответствующих условий и результатов в промышленном масштабе.

Некоторые химические реагенты, описанные в данном изобретении, могут характеризоваться их физическими, химическими и фармакологическими свойствами. Эти реагенты могут подвергаться химической обработке для обеспечения реагента при оптимальной концентрации для увеличения выхода биологических продуктов в системах клеток-хозяев, в частности клеточных культурах и яйцах.

В одном аспекте действие или активность некоторых химических реагентов, которые контактируют с клетками-хозяевами, могут быть улучшены с помощью повышения липофильности реагента. Химические и структурные модификации реагентов могут усиливать мембранный транспорт или экспрессию белка. В конкретном аспекте химические реагенты могут быть химически модифицированы для получения пролекарственных аналогов. Стандартные способы получения и применения пролекарств соответствующим образом особенно применимы к химическим реагентам, используемым в настоящем изобретении. См. *The Practice of Medicinal Chemistry*, Ch. 31-32 (Ed. Wermuth, Academic Press, San Diego, Calif., 2001).

Примеры пролекарств реагентов, применяемых в настоящем изобретении, являются коммерчески доступными фармацевтическими веществами, которые, как известно, проявляют физиологическое действие в условиях *in vivo*, таких как гидролиз, метаболизм и т.п., после введения пролекарства субъекту. Как правило, пролекарствами-биопрещественниками являются соединения, которые являются неактивными или обладают низкой активностью по сравнению с соответствующим активным лекарственным соединением и которые содержат одну или несколько защитных групп и превращаются в активную форму в результате метаболизма или сольволиза. И активная форма лекарственного средства, и любые высвободенные продукты метаболизма должны обладать приемлемой низкой токсичностью. Пролекарства-носители представляют собой лекарственные соединения, которые содержат транспортный фрагмент, например которые улучшают поглощение и/или локализованную доставку на сайт(ы) действия. У такого

пролекарства-носителя связь между лекарственным фрагментом и транспортным фрагментом желательна представляет собой ковалентную связь, пролекарство является неактивным или менее активным, чем лекарственное соединение, и любой высвобожденный транспортный фрагмент является приемлемо нетоксичным. Для пролекарств, в которых транспортный фрагмент предназначен для усиления поглощения, обычно высвобождение транспортного фрагмента должно быть быстрым. В других случаях желательно использовать фрагмент, который обеспечивает медленное высвобождение, например некоторые полимеры или другие фрагменты, такие как циклодекстрины. Пролекарства-носители могут, например, использоваться для улучшения одного или нескольких из следующих свойств: повышенная липофильность, повышенная продолжительность фармакологических эффектов, повышение сайт-специфичности, снижение токсичности и побочных реакций и/или улучшение характеристик лекарственной формы (например, стабильности, растворимости в воде, подавление нежелательного органолептического или физико-химического свойства). Например, липофильность может быть повышена этерификацией (а) гидроксильных групп липофильными карбоновыми кислотами (например, карбоновой кислотой, содержащей по меньшей мере один липофильный фрагмент) или (б) групп карбоновых кислот липофильными спиртами (например, спиртом, содержащим по меньшей мере один липофильный фрагмент, например алифатическими спиртами). Химические реагенты, используемые в настоящем изобретении, модифицируются для способствования производительной способности систем клеток-хозяев, экспрессирующих биологические продукты *in vitro*.

Таким образом, изобретение относится к химическим реагентам в форме обычных фармацевтически приемлемых кислот, например малеиновой, хлористоводородной, бромистоводородной, фосфорной, уксусной, фумаровой, салициловой, лимонной, молочной, миндальной, винной и метансульфоновой. Химические реагенты могут также образовывать сольваты, такие как гидраты, и изобретение также распространяется на эти формы.

Следует отметить, что структура некоторых химических реагентов, используемых в настоящем изобретении, может содержать один или несколько стереоцентров, и каждый центр может существовать в R- или S-конфигурации или их комбинациях. Аналогично, соединения, представленные в данном изобретении, могут содержать одну или несколько двойных связей, и каждая из них может существовать в E (транс) или Z (цис) конфигурации или их комбинации. Следует иметь в виду, что представление одного конкретного стереоизомера, региоизомера, диастереомера, энантиомера или эписомера включает все возможные стереоизомеры, региоизомеры, диастереомеры, энантиомеры или эписомеры и их смеси. Таким образом, соединения, представленные в настоящем изобретении, включают все отдельные стереоизомерные, региоизомерные, диастереомерные, энантиомерные и эписомерные формы, а также их соответствующие смеси. Следует иметь в виду, что представление одной конкретной химической структурой или химическое название соединения, которое содержит один или несколько хиральных центров, но не определено конкретной стереохимией, включает все возможные стереоизомеры, включая смеси всех возможных стереоизомеров, чистые формы или практически чистые формы одного конкретного стереоизомера и чистые формы или практически чистые формы альтернативного стереоизомера. Методики обращения или оставления без изменений конкретного стереоцентра и методики разделения смесей стереоизомеров хорошо известны в данной области, и специалисты данной области техники могут выбрать подходящий метод для конкретной ситуации (См., например, Furniss et al. (eds.), VOGEL'S ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY 5th ED., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, 809-816; and Heller, Acc. Chem. Res. 1990, 23, 128).

Любой асимметричный атом (например, атом углерода или т.п.) реагента(ов), используемого(ых) в настоящем изобретении, может быть представлен в рацемической или энантиомерно обогащенной конфигурации, например (R)-, (S)- или (R, S)-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления изобретения

каждый асимметричный атом имеет по меньшей мере 50% энантиомерный избыток, по меньшей мере 60% энантиомерный избыток, по меньшей мере 70% энантиомерный избыток, по меньшей мере 80% энантиомерный избыток, по меньшей мере 90% энантиомерный избыток, по меньшей мере 95% энантиомерный избыток или по меньшей мере 99% энантиомерный избыток (R)- или (S)-конфигурации. Заместители на атомах с ненасыщенными связями могут, если это возможно, присутствовать в цис-(Z)- или транс-(E)-форме. Химические реагенты по настоящему изобретению могут быть представлены в виде рацемической смеси, содержащей R- или S-форму, или, альтернативно, энантиомерно обогащенной R- или S-формой и/или в зависимости от желаемого уровня функциональной активности в каждом энантиомере.

Любые полученные смеси изомеров могут быть разделены на основе отличия физико-химических свойств составляющих в чистые или по существу чистые геометрические или оптические изомеры, диастереоизомеры, рацематы, например, с помощью хроматографии и/или фракционной кристаллизации.

Химические реагенты, используемые в настоящем изобретении, могут быть разработаны или смоделированы с помощью общего химического анализа. Например, специалист в данной области техники сможет модифицировать компоненты и боковые группы соединения с получением конформационного аналога при использовании соотношения "структура-активность" (structure-activity relationships - SAR).

Целями SAR являют предоставление каждого достаточного активного соединения для дальнейшего профилирования биологической активности. Структуры могут быть определены, главным образом, на основе данных масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса.

Выделение и очистка химических реагентов, промежуточных соединений и аналогов достигаются, если это желательно, с помощью любой подходящей методики разделения или очистки, такой как, например, фильтрация, экстракция, кристаллизация, колоночная хроматография, тонкослойная хроматография, тонкослойная хроматография, центробежная хроматография, ВЭЖХ или комбинацией этих методик. Конкретные примеры подходящих методик синтеза и выделения можно найти в патентах, описанных в настоящем документе, которые включены в данное изобретение во всей полноте в качестве ссылок.

Проблемой добавления синтетических соединений к процессу производства является потенциальная токсичность продуктов разложения, таких как метаболиты. Продуктами разложения могут быть метаболиты соединения, полученные в результате его биотрансформации в клетке-хозяине, например биотрансформации в более полярную молекулу, такой как окисление, восстановление. Продукт разложения может отличаться от исходного соединения по таким параметрам, как молекулярная масса, степень растворимости и молекулярная структура или композиция. Поскольку продукты разложения подвергаются технологической переработке, есть вероятность того, что концентрация этих продуктов разложения может достичь неприемлемых уровней, которые являются особенно проблематичным в последующих процессах.

Анализ выведения химического реагента, метаболита или их аналогов по существу могут проводиться, как описано в настоящем изобретении. Методы количественного определения или идентификации метаболита известны специалистам в данной области техники в свете применения стандартных аналитических методов, включая ВЭЖХ, ТСХ, электрохимический анализ, масс-спектроскопию, спектроскопию показателя преломления, ультрафиолетовую спектроскопию, флуоресцентный анализ, радиохимический анализ, спектроскопию в ближней инфракрасной области, спектроскопию ядерного магнитного резонанса, анализ рассеяния света и другие способы, известные в данной области техники.

В одном аспекте химические реагенты, используемые в настоящем изобретении, по существу не метаболизируются или не подвергаются разложению во время технологической обработки, очистки или концентрации НА антигенов вируса гриппа. Следовые количества неметаболизированных соединений могут оставаться после очистки вируса гриппа, как определено с помощью масс-спектропии, обычно менее 0,25% от первоначально введенного количества остается после очистки.

Уровни содержания метаболита, присутствующие в среде или продукте, не должны превышать, например, более примерно 1%, более примерно 2%, более примерно 3%, более примерно 4%, более примерно 5%, более примерно 10%, более примерно 20%, более примерно 30%, более примерно 40%, более примерно 50% по меньшей мере одной испытанной активности исходного соединения или введенного количества выбранного химического реагента.

В одном аспекте химические реагенты не обнаруживаются в очищенном образце. Химические реагенты могут отслеживаться, как показано в данном изобретении при пределе обнаружения (LOD) примерно 0,5 нг/мл чистого растворителя (50% ацетонитрил). Предпочтительно любые химические реагенты, которые могут присутствовать в очищенном образце, обнаруживаются при 0,5 нг/мл или менее в супернатанте клеточной культуры, более предпочтительно в очищенном образце, таком как конечный продукт, который представляет собой монопродукт, содержащий одновалентные частицы вируса гриппа или антигена.

Аналоги статина.

Применение симвастатина в качестве усилителя роста было описано ранее (см выше). Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что некоторые другие статиновые соединения способствуют увеличению выхода биологических молекул, продуцируемых в системах клеток-хозяев. Эти статиновые реагенты могут повышать выход по меньшей мере в 2 раза при низких концентрациях статинов. В конкретном аспекте химические реагенты, описанные в данном изобретении, удивительным образом нашли широкое применение на многих подтипах и штаммах гриппа в особенно низких концентрациях.

Принципы настоящего изобретения в целом могут широко применяться со многими статинами, но предпочтительно отличными от симвастатина. Значение и определение ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим-А редуктазы ("ингибитор HMG-КоА редуктазы") в данном изобретении относится к любому селективному, конкурентному ингибитору HMG-КоА редуктазы, скорость-лимитирующего фермента, превращающего HMG-КоА в мевалонат, которые обычно называют холестеринопонижающими статинами.

Статины описываются характерной структурой, состоящей из фрагмента гептеновой или гептановой кислоты (в форме свободной кислоты, соли или лактона), связанного с ароматическим или алициклическим ядром. Биологическая активность статинов тесно связана с их стереохимией, особенно в конфигурации хиральных атомов указанного фрагмента гептеновой или гептановой кислоты. Статины и их аналоги являются коммерчески доступными и широко используются для ингибирования превращения мевалоната с помощью HMG-КоА редуктазы в холестерин. Анализ определения действия статинов

через данный биологический путь метаболизма раскрыты в патенте США № 4231938.

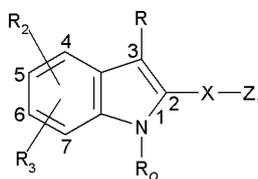
Статины можно разделить на две группы: полученные в результате брожения и синтетические. Природные статины являются производными метаболитов грибов (ML-236В/компактин/монокалин К), выделенных из *Pythium ultimum*, *Monascus ruber*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium brevicompactum* и *Aspergillus terreus*, хотя было показано, что они могут быть получены и синтетическим путем. В качестве примера статинов может быть выбран из аторвастатина, мевастатина (или компактина), флуиндостатина, велостатина, флувастатина, далвастатина, церивастатина, пентостатина, розувастатина, ловастатина (такого как мевинолин), питаваастатина, симвастатина или их аналогов.

Стабиновые производные хорошо известны в литературе и могут быть получены способами, описанными в публикации *The Peptides: Vol. 5, Analysis, Synthesis, Biology: Academic Press NY (1983)* и в патенте США № 4397786. Различные аналоги статина, которые увеличивают экспрессию и выход биологических молекул и продуктов, в частности биологических продуктов вируса гриппа, получены из культивируемых клеток и яиц.

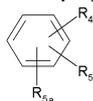
Любой из этих статинов и их аналогов может применяться в настоящем изобретении.

Формула 1 - Флувастатин и родственные аналоги.

В одном предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к применению химического реагента формулы 1 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в системах клеток-хозяев, таких как культура клеток, или в яйцах. Формула 1 включает статин структуры:



Формула 1



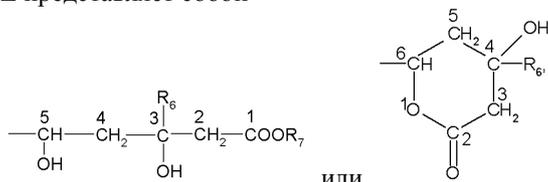
где один из R и R₀ представляет собой C_{1-6} алкил, не содержащий асимметричный атом углерода, C_{3-6} циклоалкил или фенил-(CH₂)_m-, где R₄ представляет собой водород, C_{1-3} алкил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, C_{1-3} алкокси, н-бутоксид, изобутоксид, трифторметил, фтор, хлор, фенокси или бензилокси, R₅ представляет собой водород, C_{1-3} алкил, C_{1-3} алкокси, трифторметил, фтор, хлор, фенокси или бензилокси, R_{5a} представляет собой водород, C_{1-2} алкил, C_{1-2} алкокси, фтор или хлор и m равно 1, 2 или 3, при условии, что оба R₅ и R_{5a} должны представлять собой водород, когда R₄ представляет собой водород, R_{5a} должен представлять собой водород, когда R₅ представляет собой водород, не более чем один из R и R₅ представляет собой трифторметил, не более чем один из R и R₅ представляет собой фенокси, не более чем один из R₄ и R₅ представляет собой бензилокси;

R₂ представляет собой водород, C_{1-3} алкил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, C_{3-6} циклоалкил, C_{1-3} алкокси, н-бутоксид, изобутоксид, трифторметил, фтор, хлор, фенокси или бензилокси;

R₃ представляет собой водород, C_{1-3} алкил, C_{1-3} алкокси, трифторметил, фтор, хлор, фенокси или бензилокси при условии, что R₃ должен представлять собой водород, когда R₂ представляет собой водород, не более чем один из R₂ и R₃ представляет собой трифторметил, не более чем один из R₂ и R₃ представляет собой фенокси и не более чем один из R₂ и R₃ представляет собой бензилокси;

X представляет собой -(CH₂)_n- или -CH=CH-, где n равно 0, 1, 2 или 3; и

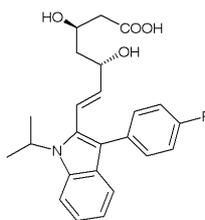
Z представляет собой



где R₆ представляет собой водород или C_{1-3} алкил и

R₇ представляет собой водород, C_{1-3} алкил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, бензил или M, где M представляет собой фармацевтически приемлемый катион.

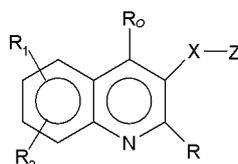
Натриевая соль флувастатина, выпускаемая в продажу фирмой Novartis Pharmaceuticals под названием Лескол (LESCOL), может быть получена как описано в патенте США № 5354772. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения аналог статина формулы 1 представляет собой флувастатин (C₂₄H₂₆FNO₄ или (3R,5S,6E)-7-[3-(4-фторфенил)-1-(пропан-2-ил)-1H-индол-2-ил]-3,4-дигидроксигепт-6-еновая кислота) следующей структуры:



Повышенная клеточная активность может быть получена при конечной концентрации флувастатина или его аналогов в интервале от 0,001 до 10 мкМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, но без ограничения, оптимальная конечная концентрация флувастатина составляет 0,05 мкМ или менее.

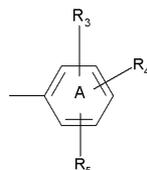
Формула 2 - Питавастатин и родственные аналоги.

В другом предпочтительном аспекте изобретение относится к применению химического реагента формулы 2 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в системах клеток-хозяев, таких как культура клеток, или в яйцах. Предпочтительно формула 2 включает статины следующей структуры:



Формула 2

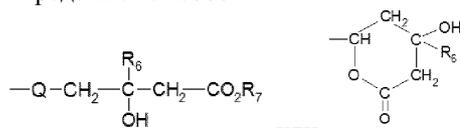
где каждый из R и R₀ независимо представляет собой C₁₋₆алкил (первичный, вторичный или третичный), C₃₋₇циклоалкил или цикл A



каждый из R₁, R₂, R₃, R₄ и R₅ независимо представляет собой водород, C₁₋₄алкил, C₁₋₄алкокси, трифторметил, фтор, хлор, фенокси, бензилокси или гидроксильную группу; при условии, что не более чем один из R₁ и R₂ представляет собой трифторметил, не более чем один из R₁ и R₂ представляет собой фенокси, не более чем один из R₁ и R₂ представляет собой бензилокси, не более чем один из R₁ и R₂ представляет собой гидроксильную группу, не более чем один из R₃-R₅ представляет собой трифторметил, не более чем один из R₃-R₅ представляет собой гидроксильную группу;

X представляет собой -(CH₂)₂- или -CH=CH- (цис и/или транс);

Z представляет собой



или



где Q представляет собой —C(=O)— или —CH(OH)— при условии, что Q может представлять собой —C(=O)— , только когда X представляет собой -CH=CH и/или R₆ представляет C₁₋₃алкил;

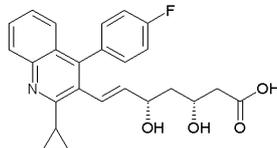
R₆ представляет собой водород или C₁₋₃алкил;

R₇ представляет собой водород, R₈ или M;

R₈ представляет собой физиологически приемлемую и гидролизуемую эфирную группу;

M представляет собой фармацевтически приемлемый катион.

Кальциевая соль питавастатина, выпускаемая в продажу фирмой Kowa Co. под названием Ливало (LIVALO), может быть получена, как описано, среди прочих, в патенте США № 5753675. В особенно предпочтительном варианте осуществления используется питавастатин (изображен как соединение G в табл. 2), который представляет собой аналог статина формулы 2 (C₂₄FNO₄ или (3R,5S,6E)-7-[2-циклопропил-4-(4-фторфенил)хинолин-3-ил]-3,5-дигидроксигепт-6-еновая кислота) следующей структуры:

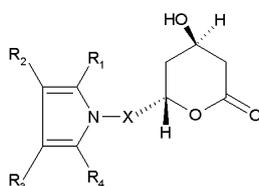


Повышенную клеточную активность получают при конечной концентрации производных формулы 2 в интервале от 0,001 до 10 мкМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, но без ограничения, оптимальная конечная концентрация питавастатина составляет 0,05 мкМ или менее. В качестве примера, как описано далее в настоящем изобретении, неожиданно было установлено, что питавастатин является более эффективным в повышении выхода продуцирования белка в концентрации 5 нМ, чем в концентрации 50 нМ, которая, в свою очередь, более эффективна, чем концентрация 500 нМ. Это особенно выгодно при производстве терапевтических композиций для применения человеком.

Однако данное изобретение не ограничивается исключительно питавастатиновыми или флувастатиновыми реагентами. Аналоги формулы 1 и 2 были испытаны и привели к неожиданным эффектам, охватываемым настоящим изобретением. Эти аналоги были протестированы как дополнительно описано ниже.

Формула 3 - Аторвастатин и родственные аналоги.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению химического реагента формулы 3 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в системах клеток-хозяев, таких как культура клеток, или в яйцах. Предпочтительно формула 3 включает статиновой аналог следующей структуры:



Формула 3

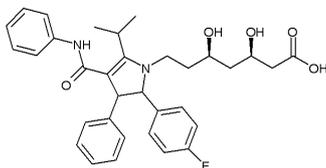
где X представляет собой $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ или $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$;

R_1 представляет собой 1-нафтил; 2-нафтил; циклогексил; норборненил; 2-, 3- или 4-пиридирил; фенил, фенил, замещенный фтором, хлором, бромом, гидроксильной группой; трифторметил; алкил, содержащий от одного до четырех атомов углерода, алкокси, содержащий от одного до четырех атомов углерода, или алканоилокси, содержащий от двух до восьми атомов углерода;

один из R_2 или R_3 представляет собой $-\text{CONR}_5\text{R}_6$, где R_5 и R_6 независимо представляют собой водород; алкил, содержащий от одного до шести атомов углерода; 2-, 3- или 4-пиридирил; фенил; фенил, замещенный фтором, хлором, бромом, циано, трифторметилом или карбоалкокси-группой, содержащей от трех до восьми атомов углерода; а другой из R_2 или R_3 представляет собой водород; алкил, содержащий от одного до шести атомов углерода; циклопропил; циклобутил; циклопентил; циклогексил; фенил; или фенил, замещенный фтором, хлором, бромом, гидроксильной группой; трифторметил; алкил, содержащий от одного до четырех атомов углерода, алкокси, содержащий от одного до четырех атомов углерода, или алканоилокси, содержащий от двух до восьми атомов углерода;

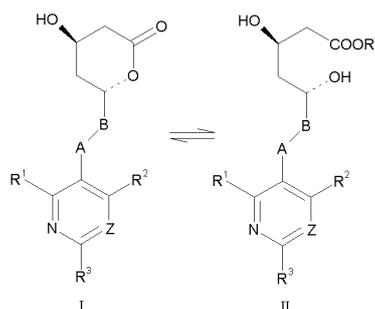
R_4 представляет собой алкил, содержащий от одного до шести атомов углерода; циклопропил; циклобутил; циклопентил; циклогексил; или трифторметил.

Кальциевую соль аторвастатина, выпускаемую в продажу фирмой Pfizer под названием Липитор (LIPITOR), получают, как описано, среди прочих, в патенте США № 5273995. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения аналог статина формулы 3 представляет собой аторвастатин ($\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{FN}_2\text{O}_5$; $[\text{R}-(\text{R}^*,\text{R}^*)]-2-(4\text{-фторфенил})-\beta$, тригидрат кальциевой соли δ -дигидрокси-5-(1-метилэтил)-3-фенил-4-[(фениламино)карбонил]-1Н-пиррол-1-гептановой кислоты (2:1)) следующей структуры:



Формула 4 - Церивастатин и родственные соединения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению химического реагента формулы 4 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Предпочтительно формула 4 включает в себя аналог статина следующей структуры:



Формула 4

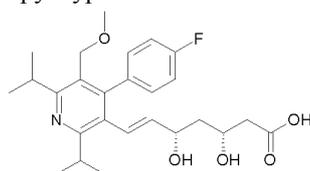
где А - В представляет собой радикал формулы $-\text{CH}=\text{CH}-$ или $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$;

Z представляет собой радикал формулы $-\text{CH}$ или атом азота;

R_1 , R_2 и R_3 независимо друг от друга представляют собой водород, насыщенный или ненасыщенный, линейный или разветвленный углеводородный радикал, который содержит до 6 атомов углерода и, необязательно, может быть замещенным на концевом атоме углерода насыщенным или ненасыщенным циклическим углеводородным радикалом, содержащим 3-6 атомов углерода, циклическим углеводородным радикалом, содержащим 3-7 атомов углерода и насыщенным или ненасыщенным один или два раза, ароматическим радикалом, выбранным из группы, включающей фенил, фурил, тиенил или пиридинил, который может необязательно нести на ядре 1-3 одинаковых или разных заместителя, выбранных из группы, включающей галоген, трифторметил, алкил или алкенил, каждый из которых содержит до 6 атомов углерода, гидроксильную группу, алкоксигруппу, содержащую 1-6 атомов углерода, карбоксильную группу или карбалкоксильную группу, содержащую 1-6 атомов углерода в алкоксильном фрагменте;

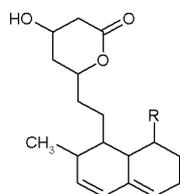
R_4 представляет собой водород, прямой или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный углеводородный радикал, содержащий до 5 атомов углерода, бензильный радикал, ядро которого может быть замещенным 1-2 раза галогеном или алкильным радикалом, содержащим 1-4 атома углерода, ион щелочного металла или аммония $\text{NR}_5\text{R}_6\text{R}_7\text{R}_8$, где R_5 , R_6 , R_7 и R_8 являются одинаковыми или разными и представляют собой водород, алкил, содержащий 1-4 атомов углерода, или гидроксиалкил, содержащий 1-4 атома углерода.

Натриевая соль церивастатина, выпускаемая на рынок фирмой Bayer под названием Байкол (BAYCOL), может быть получена, как описано, среди прочих, в патенте США № 5177080. В особенно предпочтительном варианте осуществления аналог статина формулы 4 представляет собой церивастатин ($[\text{S}^*[\text{R}^*, \text{S}^*-(\text{E})]]-7-[4-(4\text{-фторфенил})-5\text{-метоксиметил})-2,6\text{-бис}-(1\text{-метилэтил})-3\text{-пиридинил}]-3,5\text{-дигидрокси-6-гептеноат}$; $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{FNO}_5\text{Na}$) следующей структуры:



Формула 5 - Ловастатин/мевастатин и их родственные соединения.

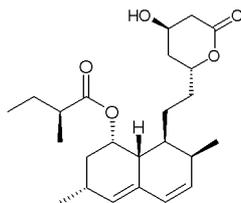
В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению химического реагента формулы 5 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Предпочтительно формула 5 включает аналог статина следующей структуры:



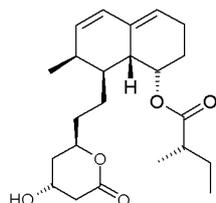
Формула 5

где R представляет собой атом водорода, гидроксильную группу или 2-метилбутирилоксигруппу ($-\text{OCOCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Ловастатин, выпускаемый на рынок фирмой Merck под торговым названием Мевакор (MEVACOR), может быть получен, как описано, среди прочих, в патенте США № 4231938. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения статиновый аналог формулы 5 представляет собой ловастатин ($[\text{1S}-[1\alpha(\text{R}^*), 3\alpha, 7\alpha, 8\alpha(2\text{S}^*, 4\text{S}^*), 8\alpha\alpha]]-1,2,3,7,8\text{-гексагидро-3,7-диметил-8-[2-(тетрагидро-4-гидрокси-6-оксо-2H-пиран-2-ил)этил]-1-нафталил-2-метилбутаноат}$; C_{36}O_5) следующей структуры:



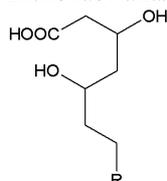
В еще одном особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения аналог статина формулы 5 представляет собой мевастатин (1S,7R,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-гидрокси-6-оксотетрагидро-2H-пиран-2-ил]этил}-7-метил-1,2,3,7,8,8a-гексагидронафталин-1-ил-(2S)-2-метилбутаноат; $C_{23}H_{34}O_6$) следующей структуры:



В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения симвастатин, который является аналогом формулы 5, не применяется.

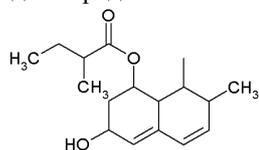
Формула 6 - Правастатин и родственные соединения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению химического реагента формулы 6 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Предпочтительно формула 6 включает аналог статина следующей структуры:

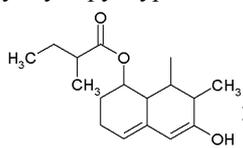


Формула 6

где R представляет собой группу структуры:

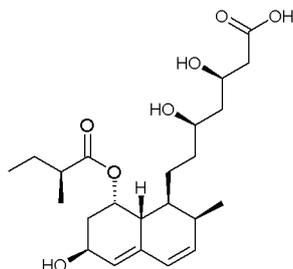


или



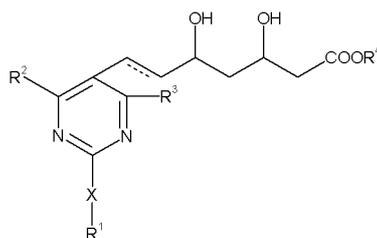
и лактоны с закрытым кольцом, их соли и сложные эфиры.

Натриевая соль правастатина, выпускаемая на рынок фирмой Bristol-Myers-Squibb под торговым названием Правахол (PRAVACHOL), может быть получена, как описано, среди прочих, в патенте США № 4346227. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения аналог статина формулы 6 представляет собой правастатин (1-нафталингептановая кислота, 1,2,6,7,8,8a-гексагидро-β,δ,5,6-тригидрокси-2-метил-8-(2-метил-1-оксобутоксид)-, моноватриевая соль 1S-[1α(βS*,δ5S*),2α,6α,8β(R*),8aα]C₂₃H₃₅NaO₇) следующей структуры:



Формула 7 - Розувастатин и родственные соединения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению химического реагента формулы 7 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Предпочтительно формула 7 включает аналог статина следующей структуры:



Формула 7

где R_1 представляет собой низший алкил, арил или аралкил, каждый из которых может содержать один или несколько заместителей;

R_2 и R_3 , каждый независимо, представляют собой водород, низший алкил или арил, и каждый из указанных низшего алкила и арила может содержать один или несколько заместителей;

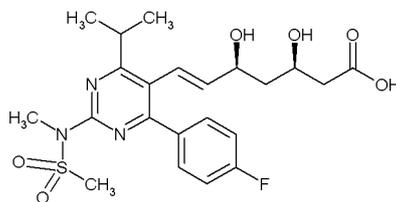
R_4 представляет собой водород, низший алкил или катион, способный образовывать нетоксичную фармацевтически приемлемую соль;

X представляет собой атом серы, атом кислорода, сульфонил или иминогруппу, которая может содержать заместитель;

пунктирная линия означает наличие или отсутствие двойной связи или соответствующий лактон с замкнутым кольцом.

Натриевая соль розувастатина, выпускаемая на рынок фирмой AstraZeneca под торговым названием Крестор (CRESTOR), может быть получена, как описано, среди прочих, в патенте США № 4346227. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения аналог статина формулы 7 представляет собой розувастатин (бис-[(E)-7-[4-(4-фторфенил)-6-изопропил-2-[метил(метилсульфонил)амино]-пиримидин-5-ил](3R,5S)-3,5-дигидроксигепт-6-еновая кислота]; $C_{22}H_{27}FN_3O_6S_2$) структуры, представленной ниже.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам повышения выхода продуцирования представляющих интерес биологических продуктов в клетках-хозяевах, включающим ингибирование мевалонатного пути метаболизма клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибирование мевалонатного пути метаболизма включает в себя прямое или не прямое ингибирование самого мевалоната. Кроме того или в качестве альтернативы, ингибирование мевалонатного пути метаболизма может включать в себя ингибирование передачи сигнала вниз по каскаду передачи сигнала, а именно, путей передачи сигнала, которые контролируют пренилирование белка и биосинтез холестерина соответственно. Как показано на фиг. 9B, блокирование всех трех ветвей пути метаболизма мевалоната комбинациями специфических ингибиторов ферментов может имитировать действие правастатина на выход белка в клетках-хозяевах. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения применяются специфические ингибиторы ферментов, которые катализируют пути метаболизма, такие как ингибиторы сквален-синтазы (например, зарагозовые кислоты), ингибиторы фарнезилтрансферазы, ингибиторы геранилгеранилтрансферазы и любые их сочетания. Таким образом, данное изобретение предоставляет один или несколько ингибиторов мевалонатного пути метаболизма для применения в производстве биологических продуктов в клетке-хозяине. Изобретение также представляет способы производства биологического продукта, включающие в себя стадию ингибирования мевалонатного пути метаболизма клетки-хозяина, в которых ингибирование может включать контактирование клетки-хозяина с одним или несколькими ингибиторами ферментов, задействованными в белковом пренилировании, и синтеза холестерина. Изобретение включает биологический продукт, полученный любым из указанных способов.



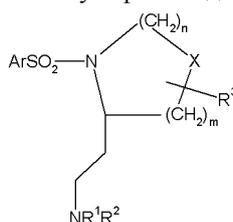
Соединения, не являющиеся производными статинов.

Настоящее изобретение включает также соединения, не являющиеся производными статинов (далее нестатиновые соединения), которые могут применяться для повышения выхода биологических молекул в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подходящие нестатиновые соединения для осуществления настоящего изобретения представляют собой реагенты, которые действуют посредством серотонин-ассоциированного пути метаболизма, допамин-ассоциированного пути метаболизма или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения подходящие соединения представляют собой реагенты, которые модулируют определенные G-белок-связанные рецепторы.

Формула 8 - Сульфонамиды, их аналоги и другие обратные агонисты 5HT7.

В одном аспекте химические реагенты, применяемые в настоящем изобретении, включают сульфонамидные аналоги. Сульфонамидные аналоги были идентифицированы как обратные агонисты G-белок-связанных рецепторов (G-protein-coupled-receptors - GPCR), в частности обратные агонисты 5HT7. Соответственно, настоящее изобретение также включает в себя применение химических реагентов, которые взаимодействуют 5HT7 рецепторами или модулируют 5HT7 рецепторы, в частности обратных агонистов 5HT7. Другие агонисты 5HT7, охватываемые данным изобретением, включают, но без ограничения, арилсульфонамиды на основе арилпиперазин- и 1,2,3,4-тетрагидроизохинолинов (Vermeulen, et al. (2004), Journal of Medicinal Chemistry, 47, 5451-5466), 5-гидрокситриптофан, 8-гидрокси-2-(ди-н-пропиламино)тетралин 1-Br (8-OH DPAT) и 5-карбоксиаминотриптамин (5-CT) (Siddiqui, et al. (2007), Pharmacology Biochemistry and Behavior, 87, 386-392).

В одном аспекте настоящее изобретение предоставляет применение химического реагента формулы 8 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Предпочтительно формула 8 включает сульфонамидные соединения следующей структуры:



Формула 8

где Ag представляет собой необязательно замещенный моно- или бициклический ароматический или гетероароматический цикл;

R¹ и R² независимо представляют собой водород, C₁₋₆алкил, арил-C₁₋₆алкил или вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное 5-7-членное гетероциклическое кольцо, необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из атома азота, атома серы или атома кислорода, причем атом азота является замещенным атомом водорода, C₁₋₆алкилом, C₃₋₇циклоалкилом или необязательно замещенной арильной, гетероарильной или арил-C₁₋₆алкильной группой;

R³ представляет собой водород или C₁₋₆алкил;

X представляет собой атом кислорода, атом серы или связь;

n равно 2 или 3;

m равно 1 или 2.

C₁₋₆алкильные группы, сами по себе или как часть другой группы, могут быть прямыми или разветвленными. Необязательные заместители для ароматических и гетероароматических групп включают в себя C₁₋₆алкил, необязательно замещенный NR⁷R⁸, C₂₋₆алкенил, C₂₋₆алкинил, C₁₋₆алкилтио, циано, нитро, галоген, CF₃, C₂F₅, NR₇R₈, CONR₇R₈, NR₇COR₈, S(O)_pNR₇R₈, CHO, OCF₃, SCF₃, COR₉, CH₂OR₉, CO₂R₉ или OR₉, где p равно 1 или 2, и R₇, R₈ и R₉ независимо представляют собой водород, C₁₋₆алкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный арил-C₁₋₆алкил. Могут присутствовать несколько заместителей, и в случае нескольких заместителей они могут быть одинаковыми или разными.

Соответственно, Ag представляет собой необязательно замещенный моно- или бициклический ароматический или гетероароматический цикл. Предпочтительно Ag представляет собой необязательно замещенную нафтильную, фенильную или тиенильную группу. Наиболее предпочтительно Ag представляет собой нафтил, фенил или тиенил, замещенный одним или несколькими атомами галогенов, в частности, 2,3-дибромтиенил. В R₁ и R₂ необязательные заместители для гетероциклических колец включают C₁₋₆ алкил. Предпочтительно R₁ и R₂ образуют необязательно замещенное 5-7-членное гетероциклическое кольцо, в частности необязательно замещенное 6-членное кольцо. Наиболее предпочтительно R₁ и R₂ образуют пиперидиновое кольцо, необязательно замещенное одной или двумя метильными группами, или R₁ и R₂ образуют пиперазиновое кольцо, замещенное по атому азота необязательно замещенным арильным кольцом.

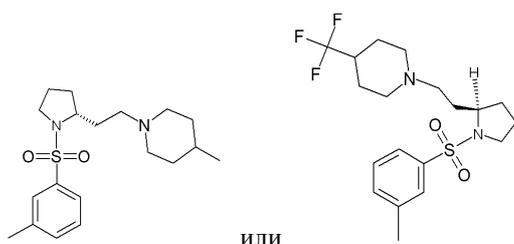
Предпочтительно R₃ представляет собой водород.

Предпочтительно X представляет собой связь.

Предпочтительно n и m принимают такие значения, что вместе с X образуют часть 5- или 6-членного кольца.

Предпочтительная оптимальная конечная концентрация соединения формулы 8 составляет 1,0 мкМ или менее.

Особенно предпочтительным сульфонамидным аналогом формулы 8 является (C₁₉H₃₀N₂SO₂), который может быть получен, как описано в патенте США № 6265408, и структура которого соответствует формулам:



или

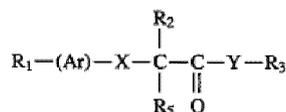
Неограничивающий вариант осуществления изобретения представлен как соединение E в табл. 2, которое представляет собой обратный агонист серотонина 5HT-2 и 5HT-7-рецепторов. Обратный агонист представляет собой реагент, который связывается с тем же рецептором, что и агонист, но вызывает фармакологическую реакцию, противоположную реакции, которую вызывает агонист. Таким образом, необходимым условием для обратного агониста является то, что рецептор должен иметь конститутивный (также известный как внутренний или базальный) уровень активности в отсутствие какого-либо лиганда. Это означает, что обратный агонист снижает активность ниже базального уровня.

Было известно, что при связывании с лигандом 5HT7 рецептор передает сигналы посредством увеличения внутриклеточного цАМФ через активность аденилилциклазы (АЦ). Обнаружение s в примере 13 (фиг. 15) свидетельствует о том, что повышение выхода продукции зависит от снижения лиганд-опосредованной активности рецептора 5HT7, поскольку эффекты повышения могут быть аннулированы при наличии серотонина (5HT), который должен конкурировать с ингибитором в связывании с рецептором.

Формула 9 - Сложные эфиры тропанола, их аналоги и другие ингибиторы ауторецепторов.

В другом предпочтительном аспекте настоящее изобретение предоставляет применение химического реагента формулы 9 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Молекулы этого класса были идентифицированы в качестве ингибиторов пресинаптических ауторецепторов и действуют как антихолинергические средства. Соответственно, настоящее изобретение включает в себя применение химических реагентов, которые модулируют пресинаптические ауторецепторы и другие пресинаптические гетерорецепторы на холинергической синапсе, включая, но без ограничения, 7-(4-[4-(2,3-дихлорфенил)-1-пиперазинил]бутокси)-3,4-дигидро-2(1H)-хинолинон (Kikuchi, et al. (1995), The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 274, 329-336) и (-)-3-(3-гидроксифенил)-N-пропилпиперидин [(-)-3-PPP] (Thorberg, et al. (1987), Journal of Medicinal Chemistry, 30, 2008-2012). Антихолинергические средства по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, неостигмин, гликопирроний, физостигмин и пиридостигмин (Nair, et al. (2004), Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain, 4, 164-168).

Предпочтительно формула 9 включает аналоги тропанила следующей структуры:

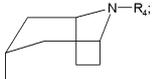


Формула 9

где Ar представляет собой фенил, бета-нафтил или ароматическое гетероциклическое 6-членное кольцо, содержащее один из двух атомов азота;

R₁ представляет собой один или несколько заместителей на ядре Ar, предпочтительно в пара-положении, и выбран(ы) из группы, включающей H, CH₃, CH₂-CH(CH₃)₂, O-CH₃, Cl, F, Br, CF₃, NH₂, S-CH₃, CN, NO₂;

R₂=H, CH₃, C₂H₅, -CH(CH₃)₂;

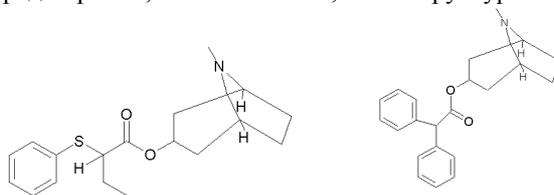
R₃ представляет собой , где R₄ представляет собой H, CH₃, C₂H₅;

R₅ представляет собой H, CH₃;

X отсутствует или представляет собой O, S, NH, NCH₃, -CH=CH-, -C≡C-;

Y представляет собой O, NH.

Предпочтительный аналог тропанила формулы 9, который представляет собой (C₁₈H₂₅NO₂), может быть получен, как описано, среди прочих, в WO 94/01435, и его структура соответствует формулам:

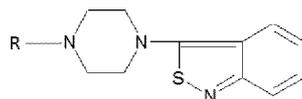


или

Формула 10 - Бензотиазол, его аналоги и другие допамин-, 5HT₂A и 5HT₁A-связывающие реагенты.

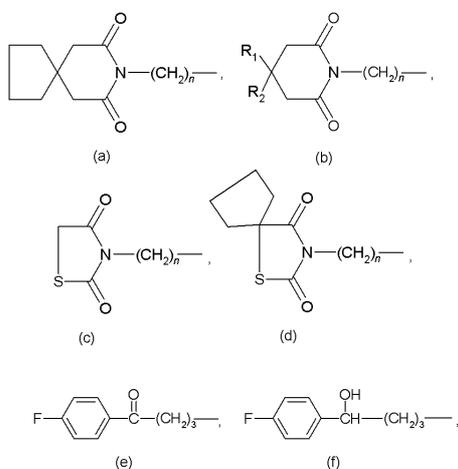
В еще одном аспекте настоящее изобретение представляет применение химического реагента формулы 10 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Молекулы данного класса были идентифицированы как обладающие нейролептической активностью. Соответственно, настоящее изобретение включает в себя химические реагенты, которые обладают сродством к допаминному D₂ и серотониновым 5HT₂A и 5HT₁A рецепторам (Hrib, et al., J. Med. Chem., 22; 37(15):2308-2314 (1994)). Другие допамин-, 5HT₂A и 5HT₁A связывающие реагенты, охватываемые изобретением, включают, но без ограничения, клозапин, галоперидол и гидроксированные дибензазепины (Hamacher, et al., (2006), BMC Pharmacology, 6, 11).

Предпочтительно формула 10 включает бензотиазоловые и бензизоксазоловые аналоги следующей структуры:



Формула 10

где R представляет собой



n равно 3 или 4;

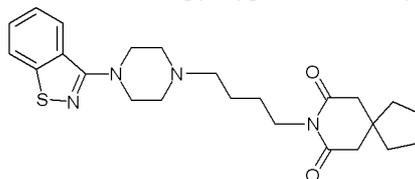
R₁ и R₂ независимо представляют собой низший алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода;

Y представляет собой атом кислорода или атом серы;

Z представляет собой водород или галоген,

или их фармацевтически приемлемые нетоксичные кислотные-аддитивные соли.

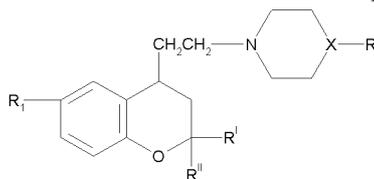
В одном аспекте аналог формулы 10, представляющий собой (C₂₄H₃₂N₄O₂S), может быть получен, как описано, среди прочих, в DE 3247530, и его структура соответствует следующей формуле:



Формула 11 - Бензипираны, их аналоги и другие противоаритмические лекарственные средства.

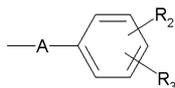
В еще одном аспекте настоящее изобретение предоставляет применение химического реагента формулы 11 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Молекулы данного класса были идентифицированы как обладающие противоаритмической активностью. Соответственно, настоящее изобретение включает в себя химические реагенты, которые обладают противоаритмической активностью класса I, класса II, класса III или класса IV, включая лидокаин, дифенилиндантион, хинидин, прокаинамид, флекаинид, бета-блокаторы, верапамил, дигиталис, бретилий, ибутилид, соталол, амиодарон, дофетилид (Kowey, et al. (2000), American Heart Journal, 140, 12-20).

Предпочтительно формула 11 включает в себя аналоги бензопирана следующей структуры:



Формула 11

где R₁ представляет собой водород, галоген, гидроксильную группу, алкокси, нитрогруппу, аминогруппу, алкилсульфонамидо, бис-(алкилсульфонил)амино или ациламиногруппу;
X представляет собой атом азота или >CH-радикал;
R представляет собой радикал формулы

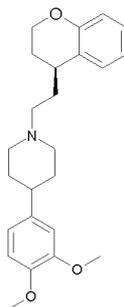


где A представляет собой одинарную связь или метилен, когда X представляет собой атом азота, карбонил, и

R₂ и R₃, которые являются одинаковыми или разными, представляют собой водород, галоген, гидроксильную группу, алкокси, нитро, амино, алкилсульфонамидо, бис-(алкилсульфонил)амино, ациламино, сульфоамид или циано или R₂ и R₃, когда они являются соседними, вместе образуют метилendioкси- или этилендиокиррадикал, или R представляет собой пиридил или 2(2H)-бензимидазолонил, если X представляет собой >CH-; и

R' и R'', которые являются одинаковыми, представляют собой водород или алкил, и их соли.

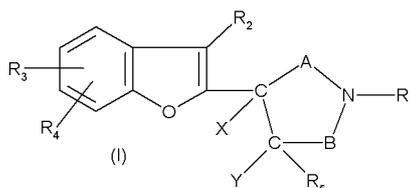
Аналог формулы 11, который представляет собой (C₂₄H₃₁NO₃), может быть получен, как описано, среди прочих, в EP 300908, и его структура соответствует следующей формуле:



Формула 12 - Тетрагидропиридины, их аналоги и другие ингибиторы MAO.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению химического реагента формулы 12 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Молекулы данного класса были идентифицированы как обладающие положительным терапевтическим действием при лечении депрессии. Соответственно, настоящее изобретение включает в себя применение химических веществ, которые ингибируют моноаминоксидазы (MAO), противодействуют действию тетрабеназина или обладают направленным воздействием на допаминергические и серотонинергические системы в головном мозге (Mattson, Doctorates Thesis, Gothenborg University, ISBN: 978-628-8741-4 (2013)). Другие ингибиторы MAO, охватываемые настоящим изобретением, включают, но без ограничения, производные оксадиазолон, тетразола, оксадиазинона, инденопиридазина и (1H)-пиразола (Chimenti, et al. (2006), Chemical Biology & Drug Design, 67, 206-214).

Предпочтительно формула 12 включает аналоги тетрагидропиридина и пиперидина следующей структуры:



Формула 12

где R₁ представляет собой водород, алкильную группу, содержащую 1-4 атомов углерода, которая может быть замещенной гидроксильной группой или оксоррадикалом, алкенильную или алкинильную группу, каждая из которых содержит от 3 до 4 атомов углерода, циклоалкилметильную группу, содер-

жащую от 4 до 7 атомов углерода, или бензильную группу, в которой фенильный радикал может быть замещенным не более чем 3 заместителями, выбранными из группы, включающей алкильную и алкокси-группы, каждая из которых содержит от 1 до 4 атомов углерода, но R_1 не должен представлять собой метильную группу в случае, когда А представляет собой этиленовый радикал и В представляет собой метиленовый радикал; и в то же время

R_2 , R_3 , R_4 и R_5 , каждый, представляют собой водород;

R_2 представляет собой водород или алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода;

R_3 представляет собой водород, алкильную или алкоксигруппу, каждая из которых содержит от 1 до 4 атомов углерода, галоген с атомным номером до 35 или гидроксильную группу; или

R_3 и R_4 вместе представляют собой триметиленовый или тетраметиленовый радикал или соответствующий конденсированному бензольному кольцу 1,3-бутадиеновый радикал;

R_5 представляет собой водород или алкильную группу, содержащую 1-4 атомов углерода;

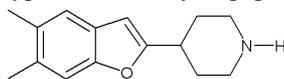
А представляет собой этиленовый или метиленовый радикал или прямую связь;

В представляет собой метиленовый, этиленовый или триметиленовый радикал, в результате чего А и В вместе всегда содержат 3 атома углерода; и

Х и Y, каждый, представляют собой атом водорода или вместе они представляют собой дополнительную связь,

их соли с неорганическими и органическими кислотами.

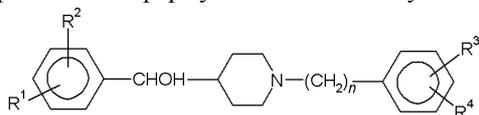
Аналог формулы 12, который представляет собой ($C_{15}H_{19}NO$), может быть получен, как описано, среди прочих, в DE 2408476, и его структура соответствует формуле



Формула 13 - Диметоксифенилпиперидинметанола и их аналоги.

В еще одном аспекте настоящее изобретение представляет применение химического реагента формулы 13 для производства биологических продуктов, в частности вакцин против гриппа, в культуре клеток или в яйцах. Было описано, что эти аналоги выступают в качестве 5HT2 антагонистов и противоритмических средств. Соответственно, настоящее изобретение включает в себя химические реагенты, которые обладают противоритмической активностью класса I, класса II, класса III или класса IV, включая лидокаин, дифенилдантоин, хинидин, прокаинамид, флекаинид, бета-блокаторы, верапамил, дигиталис, бретилий, ибутирид, соталол, амиодарон, дофетилид (Kowey, et al. (2000), American Heart Journal, 140, 12-20).

Предпочтительно структура аналогов формулы 13 соответствует следующей формуле:



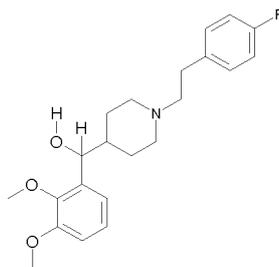
Формулы 13

где n равно 2, 3 или 4;

каждый R и R_1 независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, галоген, трифторметил, гидроксильную группу, C_{1-6} алкокси или аминогруппу и R и R_1 заместители для C_{1-6} алкила представляют собой метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, пентил, гексил, циклопропил, циклопентил, предпочтительно метил и этил.

Включены все галогены, предпочтительными являются фтор и хлор. Типичными C_{1-6} алкоксильными заместителями являются метокси, этокси, изопропокси и вышеуказанные алкильные группы, присоединенные через атом кислорода. В тех случаях, когда R или R_1 отличны от водорода, заместители могут находиться в любом положении, (орто-, мета- или пара), но пара-положение является предпочтительным для монозамещенных фенильных фрагментов. 2,3-, 2,4-, 2,5-, 3,4- или 3,5-дизамещенные фенильные фрагменты включены в настоящее изобретение.

В одном аспекте аналог формулы 13, который представляет собой альфа-(2,3-диметоксифенил)-1-[2-(4-фторфенил)этил]-4-пиперидинметанол ($C_{22}H_{27}NO_3F$), может быть получен, как описано, среди прочих, в патенте США № 5134149, и его структура соответствует следующей формуле:



Настоящее изобретение включает в себя применение других реагентов с аналогичными фармакологическими активностями в производстве представляющих интерес биологических молекул в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие реагенты включают в себя реагенты, которые действуют на такой(ие) же или частично совпадающий(е) путь(и) клеточной передачи сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения такие реагенты совместно используют один и тот же механизм действия или частично совпадающие механизмы действия для осуществления определенного клеточного результата в клетке-хозяине. Такие механистически эквивалентные реагенты могут быть или не быть структурно связанными друг с другом.

Таким образом, настоящее изобретение представляет способы получения представляющего интерес биологического продукта в клетке-хозяине или повышения выхода такого продукта, включающие контактирование клетки-хозяина с реагентом для повышения выхода белка в клетке-хозяине, где реагент выбран из группы, включающей средства, которые ингибируют передачу сигнала 5HT7 рецептора, реагенты, которые ингибируют один или несколько путей передачи сигнала допаминового рецептора, реагенты, которые являются обратными агонистами одного или нескольких гистаминовых рецепторов, реагенты, которые блокируют ионные каналы (например, натриевые каналы, кальциевые каналы и т.д.), реагенты, которые ингибируют продуцирование цАМФ, реагенты, которые ингибируют передачу сигналов гистаминового рецептора, а также их любые комбинации. Способ обычно включает контактирование клетки-хозяина с реагентом, выращивание или культивирование клетки-хозяина в течение периода времени, по меньшей мере часть которого осуществляется в присутствии указанного реагента, сбор представляющего интерес биологического продукта из клетки-хозяина, необязательно дополнительную очистку биологического продукта, введение биологического продукта в фармацевтическую композицию, содержащую биологический продукт и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель, необязательно стерильное фильтрование фармацевтической композиции, расфасовка стерильной фармацевтической композиции в подходящие лекарственные формы. Фармацевтические композиции, полученные способами, описанными в настоящем изобретении, включены в настоящее изобретение.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения реагент ингибирует передачу сигнала 5HT₇, где реагент может представлять собой обратный агонист рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения реагент может быть ингибитором допаминового(ых) рецептора(ов). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения реагент может представлять собой допаминовый D1 и/или D2 агонист. Таким образом, применение реагента, который действует в качестве обратного агониста 5HT₇ для производства терапевтической композиции, содержащей биологический продукт, включено в настоящее изобретение.

Примеры таких реагентов включают, без ограничения, SB-258719 (нейтральный антагонист 5HT₇R, доступный от GSK), SB-258741 ("AFZ"; частичный обратный агонист 5HT₇R, доступный от GSK), SB-269970 (надежный обратный агонист 5HT₇R, доступный от GSK), рисперидон (антагонист допаминовых рецепторов D1 и D2, а также обратный агонист 5HT₇ серотониновых рецепторов; а также обратный агонист H1 и H2 гистаминовых рецепторов), сертиндол (связывается с D2, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆, 5-HT₇, D3, a1); зипразидон (связывается с D2, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇, D1, D4, a1, NRI, SRI); локсапин (связывается с D2, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇, D1, D4, a1, M1, H1, NRI); зотепин (связывается с D2, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆, 5-HT₇, D1, D3, D4, a1, H1, NRI); клозапин (связывается с D2, 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5-HT₃, 5-HT₆, 5-HT₇, D1, D3, D4, a1, a2, M1, H1); оланзапин (связывается с D2, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₆, D1, D3, D4, D5, a1, M1-5, H1), кветиапин (связывается с D2, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇, a1, a2, H1); прометазин (сильный антагонист H1 гистаминового рецептора с от слабой до умеренной аффинностью к 5HT_{2k/c} серотониновым рецепторам и допаминному D2 рецептору, а также блокатор Na⁺ каналов). Могут быть также подходящими некоторые блокаторы ионных каналов. Примеры включают, но без ограничения, ингибиторы и блокаторы потенциал-зависимых Na⁺ каналов и холинэстеразы, задействованные в транспорте и метаболизме липидов, такие как дибукаин (ингибитор бутинэстеразы); ингибиторы и блокаторы потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа (например, нимодипин); ингибиторы и блокаторы натриевых каналов, такие как апридин (противоаритмический мембранстабилизирующий реагент класса 1b), амилорид (прямой блокатор эпителиального натриевого канала ENaC) и ингибиторы и блокаторы калиевых каналов задержанного внутреннего выпрямления и кальциевых каналов L-типа,

такие как полуфумарат ибутилида (противоаритмическое средство III класса).

Обработка клеток-хозяев.

Если не указано иное, рекомбинантные белки, культура клеток, иммунологические и микробиологические методы, используемые в настоящем изобретении, представляют собой стандартные реагенты и методики, хорошо известные специалистам данной области техники. Такие методики описаны и объяснены в литературных источниках, таких как J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984); J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991); D.M. Glover and B.D. Hanes (editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996); F.M. Ausubel et al., (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1996); J.E. Coligan et al., (editors) *Current Protocols In Immunology*, John Wiley & Sons (включая все обновления до настоящего времени), которые включены в данное описание в качестве ссылок.

Отличительным признаком способов по настоящему изобретению является эффект повышения выхода биологических молекул или продуктов, продуцируемых в системах клеток-хозяев. Термин "выход биологических молекул", когда используется в данном описании, относится к общему количеству рекомбинантно экспрессированных биологических молекул, которые могут быть выделены, таких как белки, полипептиды, антитела (например, полной длины или их антигенсвязывающих фрагменты, аналоги, полученные методами генной инженерии, гуманизированные аналоги и т.д.), нуклеиновые кислоты, вирусы, ферменты, вирусоподобные частицы, полученные с помощью клетки-хозяина, предпочтительно в эукариотической культуре клеток, такой как культура растительных клеток, клеток птиц или млекопитающих, выращенных в условиях, подходящих для экспрессии, секреции или продуцирования. В частности, биологические молекулы могут подвергаться дополнительной технологической обработке с получением желательного биологического продукта, такого как вакцина.

Повышенные выходы обычно измеряются в миллиграммах белка на 1 миллилитр объема (мг/мл) или в граммах белка на 1 литр объема (г/л).

Повышенный выход также может измеряться как кратное увеличение количества биологических молекул, продуцируемых системами клеток-хозяев, подвергающимися воздействию химических реагентов, используемых в настоящем изобретении, по сравнению с соответствующими контрольными системами, включая соответствующие системы клеток-хозяев, которые не обрабатывались такими химическими реагентами.

При применении способов по настоящему изобретению уровни содержания экспрессированных биологических молекул увеличиваются примерно в 2-20 раз по сравнению с контролем. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения выход повышается по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз, примерно в 5,5 раза, примерно в 6 раз, примерно в 6,5 раза, примерно в 7 раз, примерно в 7,5 раз, примерно в 8 раз, примерно в 8,5 раз, примерно в 9 раз, примерно в 9,5 раз или примерно в 10 раз или более по сравнению с контролем.

В альтернативном аспекте любое повышение выхода может измеряться как увеличение количества, выраженное в процентах относительно контроля. Например, увеличение выхода или клеточной продуктивности может включать 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 500% или большее увеличение любых измеряемых параметров по сравнению с контролем.

Как показано в примерах ниже, предпочтительный аспект настоящего изобретения характеризуется измерением повышенного количества вирусных частиц (вРНК копий/мл), инфекционных частиц (IU/мл) или вирусных белков (г/мл), полученных в супернатанте культуры. В одном типе измерений увеличение НА или NP белка показывает способность химического реагента увеличивать выход антигенных белков, продуцированных системой клетки-хозяина. Увеличение продуктивности клеток также может характеризоваться измерением параметров, показывающих по меньшей мере 2-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 15-кратное, 20-кратное, 25-кратное, 30-кратное, 35-кратное, 40-кратное, 45-кратное, 50-кратное увеличение количества вирусных частиц, частиц инфекционного вируса или вирусных белков, предпочтительно выход НА.

Измерение выхода может проводиться во время проводимой ранее технологической обработки вирусного производства, например во время транскрипции гена вируса, экспрессии белка, продуцирования вирусных частиц или высвобождения из клеточной культуры. Стандартные способы обнаружения биологических продуктов в рекомбинантных системах могут применяться в зависимости от измеряемой характеристики биологической молекулы. Измерения, которые могут показывать продуктивность и производительность системы клетки-хозяина, можно также проводить с помощью способов, хорошо известных в данной области; например, количественное определение изменений в морфологии и клеточной поверхности маркеров с использованием таких методов, как проточная цитометрия или иммуноцитохимия (например, окрашивание клеток антителами, специфическими к ткани или к клеточному маркеру), изучение морфологии клеток с использованием светолучевой или конфокальной микроскопии или количественное определение изменений экспрессии генов с использованием методов, хорошо известных в

данной области, таких как ПЦР и определение профиля генной экспрессии.

В предпочтительном аспекте продукты вирусной экспрессии, предпочтительно продукты вируса гриппа, количественно определяются для продуцирования частиц, инфекционных частиц или антигенных белков. Вирус гриппа и антигены могут количественно определяться с помощью таких методов, как иммунологические анализы, включая, но без ограничения, конкурентные и неконкурентные тест-системы, с использованием методов, таких как вестерн-блоттинг, иммуногистохимические радиоиммунологические методы анализа, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), иммуноферментные "сэндвич"-анализы, иммунопреципитация, реакции преципитации, реакции диффузной преципитации в геле, методы иммунодиффузионных анализов, реакции агглютинации, методы анализов реакции фиксации комплемента, методы иммунорадиометрических анализов, флуоресцентных иммуноанализов, иммуноанализов белка А и анализ FACS (возбужденной флуоресценции сортированных клеток).

Титры вирусов могут измеряться в системах клеток-хозяев с помощью методов фокусобразующего анализа и геммаглютинационного анализа. Эти методы анализа хорошо известны в данной области техники.

Способы по настоящему изобретению предназначены для применения в системах клеток-хозяев, таких как клеточные культуры, или в яйцах. В предпочтительном аспекте клеточные культуры обрабатывают по меньшей мере одним химическим реагентом в клеточной культуре объемом более примерно 200 мкл, например более примерно 1 мл. Более предпочтительно объем культуры клеток составляет от примерно 1 мл до 10000 л, например, от примерно 2 мл до примерно 10000 л. В некоторых вариантах осуществления изобретения подходящий объем партии продукции составляет примерно 15, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500 мл, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 350, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 л или более.

В предпочтительном аспекте клетки могут выращиваться в культуре в присутствии достаточного количества химического реагента в условиях, подходящих для репликации и сборки вирусов или экспрессии биологических продуктов. В некоторых аспектах клетки можно культивировать при температуре ниже примерно 37°C, предпочтительно при температуре равной или менее чем примерно 35°C. Обычно клетки выращиваются в присутствии реагента при температуре в интервале от примерно 32 до приблизительно 35°C. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выращиваются при температуре в интервале от примерно 32 до примерно 34°C, например, при температуре примерно 33°C. В предпочтительном аспекте MDC клетки, используемые в данном изобретении, выращиваются при температуре примерно 34°C.

Клетки могут контактировать с химическим реагентом в соответствии с экспериментальными условиями, определяемыми исследователем. В приведенных ниже примерах показан по меньшей мере один функциональный набор условий, применимых для клеток млекопитающих, в частности условия применения суспензий. В одном предпочтительном аспекте стадия контактирования клетки-хозяина может проводиться во время инкубирования или роста клеток и до инокуляции или одновременно с инокуляцией вирусом.

Рекомбинантная экспрессия биологических молекул в клетках-хозяевах представляет собой стандартный способ, доступный специалисту в данной области техники. Способы трансфектирования клеток могут включать электропорацию (электроблоттинг генов), сонопорацию, оптическую трансфекцию, слияние протопластов, импалефекцию, магнетофекцию или вирусную трансдукцию. Обычно используемые реагенты трансфекции включают, например, фосфат кальция, DEAE-декстран и липиды. Ссылки на доступные источники примеров подробных методик включают, например, Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 9, Ausubel, et al. Eds., John Wiley & Sons, 1998. В случае вируса или бактерии клетки инфицируют или инокулируют при желаемой множественности инфекции (MOI). Трансфекция и инфекция могут применяться в данном описании взаимозаменяемо.

Количество биологических молекул, продуцируемых клетками-хозяевами, обработанными химическим реагентом, может количественно определяться после инокуляции или одновременно с инокуляцией вирусом. Мониторинг ответа на вирусную инфекцию клеточной мембраны до, во время и после добавления химических реагентов может обеспечить понимание, например, проникновения вирусов в клетки, уровень содержания вирусной геномной ДНК и/или поврежденной РНК, уровень транскрипции вирусной геномной ДНК в РНК, уровень содержания одного или нескольких экспрессированных вирусных белков, количество вирусных частиц, образованных внутри клетки, и/или количество вирусных частиц, высвобожденных из клетки. Без теоретического обоснования авторы полагают, что химические реагенты оказывают действие на фазы роста вирусов в клетках-хозяевах.

Агент может добавляться в среду, содержащую клетки-хозяева до трансфекции, одновременно с ней или в период времени после трансфекции и до сбора клеток-хозяев или экспрессированной биологической молекулы. Например, клетки-хозяева могут контактировать с химическим реагентом в эффективной концентрации в течение интервала времени в диапазоне от 0 до 1 ч, от 0 до 2 ч, от 0 до 3 ч, от 0 до 4 ч, от 0 до 5 ч, от 0 до 12 ч, от 0 до 20 ч, от 0 до 30 ч, от 0 до 40 ч, от 0 до 50 ч, от 0 до 60 ч до или после трансфекции или после инфицирования. Время контактирования может оптимизироваться для достижения

уровня выхода, который по меньшей мере в 2 раза больше выхода, достигаемого в контроле. Неожиданно, химические реагенты, используемые в настоящем изобретении, могут контактировать с клеткой-хозяином в течение короткого периода времени, предпочтительно клетке не требуется предварительная обработка, и химический реагент может добавляться одновременно с вирусом.

При выборе подходящего реагента для способствования повышению продуцирования представляющих интерес биологических молекул в системах клеток-хозяев одним желательным признаком может быть то, что реагент является эффективным для повышения продуцирования при применении в относительно низких концентрациях по меньшей мере по двум причинам. Во-первых, меньшее количество таких реагентов будут необходимы для производства таких продуктов в промышленных масштабах. Во-вторых, для применения в области фармацевтических средств, нутрицевтиков и косметических препаратов желательно, чтобы конечный продукт представлял собой чистую форму, свободную от загрязняющих веществ или примесей. Применение в процессе производства такого реагента в низких концентрациях означает, что было бы проще удалить указанный реагент из конечного продукта. Другим желательным признаком подходящих реагентов для способствования продуцированию представляющих интерес биологических молекул является то, что такие реагенты представляют собой уже утвержденные коммерчески доступные продукты, профили безопасности которых подробно охарактеризованы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения реагенты, используемые в изобретении, присутствуют в достаточной концентрации в момент трансфекции. Условия могут регулироваться и оптимизироваться специалистом в данной области техники для достижения желаемых параметров для увеличения выхода биологических молекул. Как было упомянуто выше, предпочтительно количество, эффективное для повышения продуцирования или выхода представляющих интерес биологических молекул, является достаточно низким, чтобы оно являлось коммерчески целесообразным и безопасным для применения человеком. Обычно эффективное количество измеряется концентрацией в общем объеме препарата, когда присутствует реагент, например в объеме партии культуры клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективные количества подходящих реагентов, используемых в данном изобретении, находятся в интервале от 0,1 нМ до 10 мкМ, предпочтительно составляют менее 5 мкМ, более предпочтительно составляют менее 1 мкМ, еще более предпочтительно составляют менее 100 нМ.

Оптимальная концентрация параметра, показательного для увеличения выхода или продуцирования может меняться в зависимости от индивидуальных особенностей системы экспрессии, требований пользователя, и определение оптимальной концентрации любого одного или нескольких реагентов, повышающих экспрессию в данной методике эксперимента, находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

Возможно, что для контактирования с системой клеток-хозяев может применяться комбинация химических реагентов, такая как включающая по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре реагента, которые добавляют последовательно или в виде "коктейля". Добавление последующего реагента может осуществляться с временными интервалами в диапазоне 0-1, 2, 3, 4, 5 ч после добавления первого или предшествующего соединения. В зависимости от вируса, клетки-хозяина, условий трансфекции и экспрессии продуктов, обработка химическими реагентами или комбинациями химических реагентов может приводить к супераддитивным ("синергическим") эффектам. Например, в дополнение к повышенному выходу могут наблюдаться следующие эффекты, превышающие ожидаемые эффекты: увеличение количества доз производимых биологических продуктов, сокращение времени от производства до доставки лекарств пациентам, увеличение количества пациентов, проходящих лечение, увеличение экспрессии белка/антигена, увеличение высвобождения вирусных частиц, увеличение количества обнаруженного NP, показывающее увеличение производства вирусных частиц, увеличение плотности НА антигена на вирусных частицах, повышение эффективности комбинации химических реагентов в отношении производства биологических продуктов. Синергические эффекты могут выявляться с помощью применимых способов, описанных в настоящем изобретении.

В одном аспекте обработка клеток-хозяев может проводиться в среде, которая дает возможность системе клетки-хозяина взаимодействовать с химическими реагентами без необходимости изменять среду. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение включает в себя среду, в которой может проводиться выращивание и трансфекция клеток в присутствии по меньшей мере одного химического реагента перед инокуляцией вирусом.

Среда, в которой обрабатываются клетки-хозяева, может также включать в себя ряд ингредиентов, в том числе аминокислоты, витамины, органические и неорганические соли, сахара и другие компоненты, причем каждый ингредиент может присутствовать в количестве, которое поддерживает культивирование эпителиальных клеток млекопитающих в условиях *in vitro*.

В некоторых областях применения может быть предпочтительным дополнительное обогащение содержания питательных веществ для поддержания более быстрого роста и повышения продуцирования биологических молекул с помощью клеток-хозяев, предпочтительно, чтобы обеспечить более подходящие условия окружающей среды для культивирования прихотливых клеток млекопитающих. Для осуществления такого обогащения к базальной среде или к полной среде по изобретению может быть добавлено одно или несколько вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества, которые преимущественно

но могут быть добавлены в данную среду, включают один или несколько цитокинов (например, факторы роста, такие как EGF, aFGF, bFGF, IGF-1, IGF-2, HB-EGF, KGF, HGF и т.п.), гепарин (для стабилизации гепаринсвязывающих факторов роста, таких как FGF, HB-EGF, KGF и HGF) и один или несколько пептидов, полученных из животных (например, HSA или BSA), дрожжей (например, дрожжевого экстракта: дрожжевого экстракта или ультрафильтрата дрожжевого экстракта) или растений (например, пептиды из риса или сои). Цитокины, которые могут быть природными или рекомбинантными, являются коммерчески доступными, например, от компании Life Technologies, Inc. (Rockville, Md.) или от компании R&D Systems, Inc. (Rochester, Minn) и могут добавляться в питательные среды в концентрациях, рекомендованных производителем для конкретного типа клеток, подлежащих культивированию (обычно конечная составляет примерно 0,00001-10 мг/л). Гепарин является коммерчески доступным, например, от Sigma (St. Louis, MO), и предпочтительно гепарин слизистой оболочки свиней используется в среде в конечной концентрации примерно 1-500 USP единиц/литр. Животные, дрожжевые и растительные пептиды могут быть получены на коммерческой основе (например, животные пептиды - от Sigma; дрожжевые пептиды - от Difco, Norwell, Mass., и растительные пептиды - от Quest International, Norwich, New York) или могут быть получены и введены в настоящую культуральную среду, как подробно описано в одновременно находящейся на рассмотрении заявке на патент США № 60/028,197, поданной 10 октября 1996 г., содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В некоторых аспектах настоящего изобретения особенно подходящим типом среды для практического осуществления настоящего изобретения является среда, не содержащая белков (protein-free medium ("РЕМ среда"), которая полностью очищена от белка (например, не содержащая белки сыворотки крови, такие как сывороточный альбумин или факторы прикрепления, питательные белки, такие как факторы роста, или белки-носители ионов металлов, такие как трансферрин, церулоплазмин и т.д.).

В идеале, среды, не содержащие сыворотки и не содержащие белки, которые предполагается использовать по настоящему изобретению, дополнительно будут очищены от любого вещества животного происхождения или любого материала, который полностью или частично получен из животного источника, включая рекомбинантные ДНК животного происхождения или рекомбинантные ДНК белка животного происхождения.

Клеточные линии и клеточная культура.

В соответствии с изобретением может применяться любая система клеток-хозяев, предпочтительно эукариотическая, предпочтительно клеток млекопитающих. Обычно клетки-хозяева позвоночных включают, но без ограничения, клетки приматов (например, людей, обезьян и т.д.), собак, птиц (например, кур, уток и т.д.), кошек, крупного рогатого скота, лошадей, овец, свиней, коз, грызунов и кроликов. В одном предпочтительном аспекте клетки позвоночных представляют собой клетки из яиц с развивающимся эмбрионом.

В другом аспекте клетка представляет собой клеточную линию. Обычно культивируемая клетка сертифицирована в соответствии с требованиями ВОЗ для производства вакцин. Требования к сертификации таких клеточных линий включают характеристику в отношении по меньшей мере одной генеалогии, ростовых характеристик, иммунологических маркеров, вирусной чувствительности, туморогенности и условий хранения, а также тестирования на животных, яйцах и культурах клеток. Неограничивающие примеры клеток-хозяев, подходящих для настоящего изобретения, включают эукариотические клетки, такие как клетки растений, клетки млекопитающих, клетки птиц (например, такие как клетки утки), клетки насекомых, дрожжевые клетки и т.д. Неограничивающие примеры подходящих клеток включают в себя первичные клетки, такие как первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, клетки эпителия шейки матки, клетки эпителия бронхов, клетки трахеального эпителия, эпителиальные клетки почек и ретинальные эпителиальные клетки) и устойчивые клеточные линии и их штаммы или производные (например, 293 эмбриональные клетки почки, ВНК клетки, эпителиальные клетки шейки матки HeLa и PER-C6 клетки сетчатки, MDBK (NBL-1) клетки, 911 клетки, CRFK клетки, MDCK клетки, CaCo-2, CapT клетки, CHO клетки, BEWO клетки, Chang клетки, Detroit 562 клетки, FRIK-4, HEK-293, 229 клетки HeLa, S3 клетки HeLa, Нер-2 клетки, KB клетки, LS180 клетки, LS174T клетки, NCI-H-548 клетки, RPMI 2650 клетки, SW-13 клетки, T24 клетки, WI-28 VA13, 2RA клетки, WISH клетки, BS-C-1 клетки, LLC-MK2 клетки, клетки M-3 клона, клетки 1-10, RAG клетки, RD, 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, WSW клетки, TH-1, B1 клетки или их производные), NS0 (клетки миеломы мыши), стволовые клетки, такие как эмбриональные стволовые клетки (например, EB66® клетки), клетки фибробластов из любой ткани или органа (включая, но без ограничения, клетки фибробластов сердца, печени, почек, толстой кишки, кишечника, пищевода, желудка, нервной ткани (головного и спинного мозга), легких, сосудистой ткани (артерии, вены, капилляров), лимфоидной ткани (лимфатических желез, аденоидные, миндалин, костного мозга и крови), селезенки и клеточные линии фибробласта и фибробластоподобные клеточные линии (например, CHO, TRG-2 клетки, IMR-33 клетки, Don клетки, GHK-21 клетки, клетки цитруллинэмии, клетки Dempsey, 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 MiCl.sub.1, клетки CHO, CV-1 клетки, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки Vero, DBS-FrhL-2 клетки, клетки BALB/3T3, F9 клетки, SV-клетки T2, M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, C.sub.3H/10T1/2 клетки, клетки HSDM1C3, клетки KLN2O5, клетки McCoy, мышинные L-клетки, клетки штамма 2071 (мышинные L), клетки L-M штамма (мышинные L), L-MTK- (мышинные L) клетки, NCTC клоны 2472 и 2555, SCC-PSA1 клетки, Swiss/3T3, клетки индийского мунжтака, SIRC клетки, СИ клетки и клетки Йенсена или их производные). Предпочтительно клетки млекопитающих выбраны из группы, включающей клетки MDCK, клетки 293, клетки PER-C6, клетки CHO или их производные.

Оптимальные условия посева на чашки и культивирования для данного типа клеток животного происхождения могут быть определены специалистами данной области техники с использованием стандартного эксперимента. В обычных условиях получения монослойной культуры клетки можно высевать на поверхность культуральных сосудов без факторов прикрепления. В качестве альтернативы сосуды могут предварительно покрываться природными, recombinantными или синтетическими факторами прикрепления или пептидными фрагментами (например, коллагеном, фибронектином, витронектином, ламинином и т.п. или их природными или синтетическими фрагментами), которые являются коммерчески доступными, например, от компании Life Technologies, Inc. (Rockville, Md.), компании R&D Systems, Inc. (Rochester, Minn.), Genzyme (Cambridge, Mass.) и компании Sigma (St. Louis, Mo.). Выделенные клетки могут также высеваться в или на природную или синтетическую трехмерную матрицу подложки, такую как предварительно отформованный коллагеновый гель или синтетический биополимерный материал. Для суспензионного культивирования клетки, как правило, суспендируют в культуральной среде и вводят в сосуд для культивирования, который облегчает выращивание клеток в суспензии, например во вращающуюся колбу, перфузионное устройство или биореактор (см. Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, New York: Alan R. Liss, Inc., p. 123-125 (1983)). В идеале, перемешивание среды и суспендированных клеток сводится к минимуму для предотвращения денатурации компонентов среды и срезания клеток в процессе культивирования.

В предпочтительном аспекте клетки для получения вируса гриппа могут быть выращены в среде, содержащей сыворотку, или бессывороточной среде. В некоторых случаях, например, для получения очищенных вирусов желательно выращивать клетки в бессывороточных условиях. Клетки можно культивировать в небольших масштабах, например менее чем в 25 мл среды, в культуральных пробирках или колбах или в колбах большего объема при перемешивании, в роллерных бутылках или на микрогранулированном носителе (например, на микрогранулированных носителях DEAE-декстран, таких как Dormacell, Pfeifer & Langen; Superbead, Flow Laboratories, гранулах из сополимера стирола и триметиламина, таких как Hillel, SoloHill, Ann Arbor), в колбах, бутылках или культуральных реакторах. Микрогранулированные носители представляют собой маленькие сферы (диаметром в интервале 100-200 мкм), которые обеспечивают большую площадь поверхности для роста прикрепленных клеток на единицу объема клеточной культуры. Например, 1 л среды может включать в себя более 20 млн гранул микроносителя, обеспечивающих более 8000 см² поверхности роста. Для промышленного производства вирусов, например для производства вакцин, зачастую желательно культивировать клетки в биореакторе или ферментере. Объем доступных биореакторов, например биореактора Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, Minn.); биореакторов NBS (New Brunswick Scientific, Эдисон, штат Нью-Джерси); лабораторных и промышленных биореакторов от B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, German) составляет от менее 1 до более 100 л.

В соответствии с предпочтительным аспектом клетка-хозяин может контактировать с вирусом до контактирования, одновременно с контактированием или после контактирования с химическим реагентом. Оптимальные методы инфицирования клеток млекопитающих с вирусом хорошо известны в данной области и знакомы любому специалисту. Вирусное инфицирование клеток может количественно определяться различными способами. MOI представляет собой отношение числа инфекционных вирусных частиц к числу клеток, подлежащих инфицированию. Таким образом, MOI 0,1 приводит к средней инокуляции 1 вирусной частицей каждые 10 клеток. Теоретически обоснованной MOI является введение одной инфекционной вирусной частицы в каждую клетку-хозяин, которая присутствует в культуре. Тем не менее одну и ту же клетку могут инфицировать несколько вирусов, что сохраняет некоторый процент неинфицированных клеток. Это явление может быть уменьшено при использовании более высокого MOI для гарантированного инфицирования каждой клетки. Таким образом, представленные вирусные частицы могут быть введены в клетки, которые описаны в данном изобретении, с MOI в интервале от 0,001 до 100, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100.

Можно ожидать, что вирус-инфицированные клетки млекопитающих, культивируемые в суспензии в присутствии реагента, дают более высокие титры вируса (например, в 2, 3, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 250, 500 или в 1000 раз более высокие титры), чем клетки, которые не контактировали с соединением-кандидатом. Эти способы могут применяться для получения различных вирусов млекопитающих и вирусных векторов, включая, но без ограничения, ретровирусы и т.п., и наиболее предпочтительно могут применяться для получения вирусов гриппа. После обработки инфицированных клеток химическим реа-

гентом используемые культуральные среды, содержащие вирусы, вирусные векторы, вирусные частицы или их компоненты (белки и/или нуклеиновые кислоты (ДНК и/или РНК)), могут использоваться для различных целей, включая производство вакцин, производство вирусных векторов для применения в клеточной трансфекции или генной терапии, инфицирования животных или клеточных культур, изучении вирусных белков и/или нуклеиновых кислот и т.п. В качестве альтернативы вирусы, вирусные векторы, вирусные частицы или их компоненты могут необязательно выделяться из используемой культуральной среды в соответствии с методиками выделения белка и/или нуклеиновой кислоты, которые известны специалисту в данной области техники.

Настоящее изобретение может также применяться в способах получения рекомбинантных белков из клеток млекопитающих, в частности из клеток млекопитающих, выращенных в суспензии. Клетки могут подвергаться изменениям методами генной инженерии перед контактированием с химическим реагентом либо они могут быть трансфицированы одной или несколькими экзогенными молекулами нуклеиновых кислот и контактировать с достаточным количеством химического реагента. Оптимальные методы генной инженерии клеток млекопитающих для экспрессирования представляющего интерес полипептида хорошо известны в данной области техники и, следовательно, известны любому специалисту. Клетки, полученные методами генной инженерии, могут быть выращены в присутствии реагента в виде монослойных культур или более предпочтительно в виде суспензионных культур в соответствии с методами, описанными в настоящем документе. После культивирования клеток представляющая интерес биологическая молекула необязательно может подвергаться очистке от клеток и/или применяемой культуральной среды в соответствии с методами выделения белков, которые известны специалистам в данной области техники. Выделение и очистка биологических молекул или их производных, полученных способом в соответствии с настоящим изобретением, проводятся с помощью обычных методов, которые известны специалистам в данной области техники.

В целом, выделение белков изначально зависит от их происхождения. Различаются внутри- и внеклеточные белки. Если белки находятся внутри клеточных тел, сначала необходимо разрушить клетки, что проводится, например, с помощью сдвиговых усилий или осмозиса. После этого отделение нерастворимого материала, например клеточных мембран и клеточных стенок, осуществляется, например, путем центрифугирования.

Центрифугирование используется по умолчанию для разделения клеток, клеточных органелл и белков. Более эффективным методом с точки зрения тонкости разделения является пульс-электрофорез. Кроме того, после отделения других компонентов клеток существует необходимость разделения белков различных размеров, пептидов и аминокислот. Выделение белков может проводиться с помощью одно- или двумерного гель-электрофореза или капиллярного электрофореза. Для выделения аминокислот и пептидов используются, например, хроматографические методы, такие как аффинная хроматография, ионообменная хроматография (ИЕС) или хроматография с обращенной фазой (RPC). Наличие липидов и необходимость удаления или дезактивации протеаз являются неблагоприятными для очистки. Белки, присутствующие во внеклеточном матриксе, необязательно извлекать из клеток, но после отделения всех нерастворимых веществ, они являются сильно разбавленными и, как правило, присутствуют в гораздо меньших количествах, чем в качестве внутриклеточных белков.

Технологическая обработка вируса.

После культивирования клетки-хозяина в течение периода времени, подходящего для репликации вируса до высоких титров, вирус может быть выделен. Вообще вирусы могут выделяться из культуральной среды, в которой были выращены инфицированные клетки. Сырую среду обычно осветляют перед концентрацией вирусов гриппа. Общие методы включают фильтрацию, ультрафильтрацию, адсорбцию на сульфат бария и элюирование, а также центрифугирование. Например, сырую среду из инфицированных культур можно сначала осветлять центрифугированием, например, при 1000-2000×g, в течение периода времени, достаточного для удаления остатков клеток и других крупных твердых частиц, например, от 0 до 30 мин. В качестве альтернативы, среду фильтруют через 0,8 мкм фильтр из ацетата целлюлозы для удаления интактных клеток и других крупных частиц. Необязательно, супернатант осветленной среды затем центрифугируют для осаждения вирусов гриппа, например при 15000×g, в течение примерно 3-5 ч. После повторного суспендирования вирусного пеллета в подходящем буфере, таком как STE (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl, 0,0001 M ЭДТА) или фосфатно-буферный раствор (PBS) при pH 7,4, вирус концентрируют центрифугированием в градиенте плотности по сахарозе (60-12%) или тартрату калия (50-10%). Подходящими являются непрерывные или ступенчатые градиенты, например градиент сахарозы от 12 до 60% в четыре стадии с шагом 12%. Градиенты центрифугируют со скоростью и в течение времени, достаточных для концентрирования вирусов в различимый пеллет для восстановления. В качестве альтернативы и для наиболее крупномасштабных коммерческих применений вирус элюируют с градиентом плотности с использованием центрифуги с зональным ротором, работающим в непрерывном режиме. Дополнительные подробные сведения, достаточные для специалиста для получения вирусов гриппа из культур тканей, предоставлены, например, в публикациях Furminger. Vaccine Production, in Nicholson et al. (eds), Textbook of influenza, p. 324-332; Merten et al. (1996), Production of influenza virus

incell cultures for vaccine preparation, in Cohen & Shafferman (eds) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines* pp. 141-151, а также в патенте США № 5690937 и публикациях заявок США № 20040265987, 20050266026 и 20050158342, которые включены в данное описание в виде ссылок. При желании, выделенные вирусы можно хранить при -80°C в присутствии сахарозы-фосфата-глутамата (SPG) в качестве стабилизатора.

Вирусы, полученные способом по настоящему изобретению, могут подвергаться технологической обработке для получения вакцинных препаратов. Такие вакцинные препараты могут быть получены описанным далее способом, который является особенно предпочтительным вариантом осуществления изобретения. Вакцина гриппа может быть получена следующим образом: вирусы гриппа выращивают в культуре клеток, например в суспензии клеток MDCK (WO 97/037000). Вирусы собирают, очищают и концентрируют фильтрацией с использованием 0,45 мкм фильтра и СS-хроматографии. После добавления детергента (например, Tween 80) препарат вируса обрабатывают BPL. Затем вирусы подвергают расщеплению с использованием СТАВ. После ультрацентрифугирования и стадии адсорбции препарат вирусного белка подвергается ионообменной хроматографии с использованием ТМАЕ или Sartobind Q в качестве смолы. Хроматография может проводиться в присутствии каприлата натрия (приблизительно 50 мМ для Sartobind; 100 мМ для ТМАЕ) и хлорида натрия (400 мМ для Sartobind и 200 мМ для ТМАЕ). Перед применением детергента в сочетании с ионообменной хроматографией части фрагментированной статочной ДНК могут быть удалены путем осаждения с катионным детергентом, таким как СТАВ, как описано в Onions et al., *Biologicals*, 2010, (38) 544-551. Настоящее изобретение может применяться в качестве части процесса, описанного в вышеуказанной публикации Onions.

Далее белковый препарат концентрируют с помощью ультрафильтрации. Белки можно дополнительно смешивать с другим вирусным препаратом (в случае трех- или четырехвалентных сезонных вакцин) и, необязательно, стерильно фильтровать, смешивать с наполнителем и расфасовывать. Часть настоящего изобретения включает в себя вакцины против гриппа, которые могут быть получены при использовании данного процесса.

Анализ.

В одном из примеров анализ клеточной продуктивности клетки-хозяина, обработанной химическими реагентами, может включать в себя определение клеточной производительности, например количественное определение по меньшей мере одного продукта экспрессии. Термин "клеточная производительность" (клеточная продуктивность), как используется в данном изобретении, относится к общему количеству рекомбинантно экспрессированного белка (например, полипептидов, антител и т.п.) или частиц, продуцированных клеткой в единицу времени при определенных условиях роста.

Клеточная производительность может также определяться путем идентификации изменения в природе биологического продукта или клеточного фенотипа в присутствии химического реагента по сравнению с соответствующим контрольным элементом в отсутствие реагента. Предпочтительно экспрессия или биологический продукт в этом способе количественно определяет продуцирование вирусных частиц, нуклеиновых кислот или белков.

В конкретном аспекте прямое количественное определение биологической молекулы является более точным, чем стандартные методы анализа бляшкообразования.

В предпочтительном примере продукт экспрессии представляет собой НА белок, количественно определенный с помощью ELISA и методов, известных специалистам в данной области. НА белок может представлять собой очищенный гликопротеиновый белок или связанный с вирусными компонентами, такими как расщепленные или цельные мембраны вирионов.

Для количественного определения синтеза рекомбинантных белков, кодирующих последовательности нуклеиновых кислот, РНК или ДНК могут количественно определяться с помощью хорошо известных методов, таких как методы нозерн-блоттинга, а также полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), в которых используются классические методы гибридизации нуклеиновых кислот.

Антигены.

Антиген может представлять собой любую молекулу (например, нуклеиновой кислоты, ДНК, РНК, белка, пептида, гликопротеина, гликопептида, углевода, липида, липопептида, полисахарида), которая может распознаваться компонентами иммунной системы независимо от того, могут они вызывать активацию иммунной системы или нет.

Антиген может быть связан с патогеном, таким как вирус коровьей оспы, авипоксвирус, вирус гриппа индейки, вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус лейкоза кошачьих, вирус птичьего гриппа, куриный пневмовирус, собачий парвовирус, вирус лошадиного гриппа, FHV, вирус ньюкаслской болезни (NDV), вирус гриппа штамма цыпленок/Пеннсилвания/1/83, вирус инфекционного бронхита; вирус Денге, вирус кори, вирус краснухи, вирус псевдобешенства, вирус Эпштейна-Барр, ВИЧ, SIV, EHV, BHV, HCMV, вирус Хантаан, столбнячная палочка, вирус эпидемического паротита, вирус кори, вирус герпеса 1 типа, вирус герпеса 2 типа, цитомегаловирус человека, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита Е, респираторно-синцитиальный вирус, вирус папилломы человека, вирус гриппа, Salmonella, Neisseria, Borrelia, Chlamydia, Bordetella, Plasmodium (например, Plasmodium

falciparum и Plasmodium vivax), Toxoplasma, Cryptococcus, Streptococcus, Staphylococcus, Haemophilus, Diphtheria, Tetanus, Pertussis, Escherichia, Candida, Aspergillus, Entamoeba, Giardia и Trypanosoma. Антигены могут представлять собой фрагмент или часть природно существующего антигена или синтетической молекулы, которая имитирует природный антиген или часть природного антигена.

В предпочтительном аспекте любой штамм вируса гриппа или его подтипа охватывается настоящим изобретением. Предпочтительно штамм вируса гриппа соответствует клиническому изоляту по меньшей мере одного циркулирующего штамма вируса гриппа А или В. Вирусы типа А в основном подразделяются на антигенные подтипы на основе двух вирусных поверхностных гликопротеинов: гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA). В настоящее время идентифицировано 16 подтипов НА (обозначенных как H1-H16) и 9 подтипов NA (N1-N9), которые могут быть обнаружены у диких водоплавающих птиц. Из 135 возможных комбинаций НА и NA только четыре (H1N1, H1N2, H2N2, H3N2 и H5N1) широко распространены в человеческой популяции, поскольку вирус был впервые выделен в 1933 году.

Способ согласно настоящему изобретению демонстрирует конкретное улучшение продуцирования подтипов и штаммов, которые трудно поддавались воспроизводству. Например, процессы рекомбинации, как правило, не используются для вакцин против гриппа В вследствие отсутствия подходящих высокопродуктивных донорных штаммов гриппа В, которые антигенно являются достаточно разными. Скорее всего, рекомбинация как процесс была недооценена, поскольку эволюция вируса гриппа В была количественно определена с использованием данных, полученных только из генов НА. Тем не менее, настоящее изобретение значительно улучшает выход антигенных белков, полученных из штаммов вируса гриппа В типа, включая штаммы, полученные более константным и менее трудоемким способом, который был недостижим до настоящего изобретения. Штаммы В типа могут быть получены с выходом более 20, 30, 40, 50, 60 мкг/мл, что определяют с помощью ОФ-ВЭЖХ вирусных культур, очищенных от сахарозы. Выход антигенов типа В является штамм-специфическим, и возможно, что некоторые штаммы могут производить меньше чем в среднем 20 мкг/мл, что наблюдается в обычных штаммах и подтипах вируса гриппа. В тех случаях, когда выход зависит от штамма или вида, увеличение выхода может быть относительным измерением, которое может быть определено по сравнению с контрольным штаммом или типом.

Вакцина против гриппа В может быть частью одновалентной, двухвалентной, трехвалентной, четырехвалентной или семивалентной вакцины, которая может включать в себя более одного штамма подтипа В и может включать в себя комбинации других штаммов, таких как, но без ограничения, штаммы H1, H2, H3, H5, H7 и/или H9.

Подходящие штаммы вируса гриппа подтипа В, полученные по изобретению, включают вирус гриппа В, вирус гриппа В/Энн Арбор 1/8 6, вирус гриппа В/Харбин/7/94, вирус гриппа В/Гонконг/5/72, вирус гриппа В/Lee/40, вирус гриппа группы В/Виктория, вирус гриппа В/Ямагата 16/88, вирус гриппа группы В/Ямагата, вирус гриппа В/Яманаши/166/98, вирус гриппа типа В/Панама 45/90.

В особенно предпочтительном аспекте способы по настоящему изобретению повышают выход штаммов пандемического гриппа, включая, но без ограничения, штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Ирландия/1378/83 (H5N8), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Англия/63 (H7N3), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Англия/66 (H6N2), А/индюк/Англия/69 (H7N2), А/индюк/Шотландия/70 (H6N2); штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Англия N28/73 (H5N2), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Англия/110/77 (H6N2), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Англия/647/77 (H1N1), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Онтарио/7732/66 (H5N9), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Англия/199/79 (H7N7), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Онтарио/7732/66 (H5N9), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Ирландия/1378/85 (H5N8), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Англия/50-92/91 (H5N1), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Висконсин/68 (H5N9), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Массачусетс/65 (H6N2), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Орегон/71 (H7N3), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Онтарио/6228/67 (H8N4), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Висконсин/66 (H9N2), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Англия/647/77 (H1N1), штамм вируса гриппа индеек А индюк/Онтарио/6118/68 (H8N4), штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Германия 3/91, штамм вируса гриппа индеек А/индюк/Миннесота/833/80 (H4N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Индонезия/03 (H5N1), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/FPV/Росток/1934, штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Техас/298313/04, штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Техас/167280-4-/02, штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Гонконг/220/97, штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Италия/8/98, штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Виктория/76 (H7N7), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Германия/79 (H7N7), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Шотландия/59 (H5N1); штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Пенсильвания/1370/83 (H5N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Керетаро-19/95 (H5N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Керетаро-20/95 (H5N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Гонконг/258/97 (H5N1), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Италия/1487/97 (H5N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Лейпциг/79 (H7N7), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Виктория/185 (H7N7), штамм вируса куриного

гриппа А/цыпленок/Виктория/92 (H7N3), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Квинсленд/95 (H7N3), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Пакистан/1369/95 (H7N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Пакистан/447-4/95 (H7N3), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/НК/69/97 (H9N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Наком-Патом/Таиланд/CU-K2/2004 (H5N1), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Гонконг/31.2/2002 (H5N1), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Вьетнам/C58/04 (H5N1), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Вьетнам/38/2004 (H5N1), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Алабама/7395/75 (H4N8), штамм вируса куриного гриппа А/Германия/N/49 (H100N7), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Пекин/1/94 (H9N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Гонконг/623/97 (H9N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Пенсильвания/8125/83 (H5N2), штамм вируса куриного гриппа А/цыпленок/Гонконг/97 (H5N1), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Аньян/AVL-1/01, штамм вируса утиного гриппа А/утка/Нью-Йорк/17542-4/86 (H9N1), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Альберта/28/76 (H4N6), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Наньчан/4-165/2000 (H4N6), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Германия/49 (H10N7), штамм вируса утиного гриппа А/черная утка/Австралия/702/78 (H3N8), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Вьетнам/11/2004 (H5N1), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Альберта/60/76 (H12N5), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Гонконг/196/77 (H1), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Висконсин/1938/80 (H1N1), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Бавария/2/77 (H1N1N1), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Бавария/1/77 (H1N1), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Австралия/749/80 (H1N1), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Гонконг/Y280/97 (H9N2), штамм вируса утиного гриппа А/утка/Альберта/35/76 (H1N1), штамм вируса птичьего гриппа А/кряква/Гурьев/263/82 (H14N5), штамм вируса птичьего гриппа А/кряква/РА/10218/84 (H5N2), штамм вируса птичьего гриппа А/кряква/Астрахань/244/82 (H14N6), штамм вируса гусяного гриппа А/гусь/Гуандун/1/96, штамм вируса гусяного гриппа А/гусь/Лейпциг/137-8/79 (H7N7), штамм вируса гусяного гриппа А/гусь/Гонконг/1л/222/97 (H6N7), штамм вируса гусяного гриппа А/гусь/Лейпциг/187-7/79 (H7N7), штамм вируса гусяного гриппа А/гусь/Лейпциг/192-7/79 (H7N7), штамм вируса гусяного гриппа А Env/НК/437-4/99, штамм вируса гусяного гриппа А Env/НК/437-6/99, штамм вируса гусяного гриппа А Env/НК/437-8/99, штамм вируса гусяного гриппа А Env/НК/437-10/99, штамм вируса птичьего гриппа А/штамм вируса птичьей чумы/Нидерланды/27 (H7N7), штамм вируса птичьего гриппа А/штамм вируса птичьей чумы/Росток/34 (H7N1), штамм вируса птичьего гриппа А/штамм вируса птичьей чумы/Египет/45 (H7N1), штамм вируса птичьего гриппа А/штамм вируса птичьей чумы/Уэйбридж (H7N7), штамм вируса птичьего гриппа А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3), штамм вируса птичьего гриппа А/крачка/Австралия/670С/75 (H11N9), штамм вируса птичьего гриппа А/перепел/Вьетнам/36/04 (H5N1), штамм вируса птичьего гриппа А/чайка/Мэриленд/704/77 (H13N6), штамм вируса птичьего гриппа А/обыкновенная чайка/Швеция/5/99 (H16N3), штамм вируса птичьего гриппа А/серебристая чайка/DE/677/88 (H2N8), штамм вируса птичьего гриппа А/лебедь/Италия/179/06 (H5N1), штамм вируса птичьего гриппа А/Гонконг/156/97 (АНК/156/97), штамм вируса птичьего гриппа А/перепел/НК/G197 (H9N2), штамм вируса птичьего гриппа А/перепел/Гонконг/AF57/93 (H9N2), штамм вируса птичьего гриппа А/чирок/НК W312/97 (H6N1), штамм вируса птичьего гриппа А/буревестник/Западная Австралия/2576/79 (H15N9), штамм вируса птичьего гриппа А/буревестник/Австралия/72 (H6N5), штамм вируса птичьего гриппа А/Гонконг/212/03, штамм вируса птичьего гриппа А/Англия/32177 (H3N2), вирусы пандемии гриппа А птичьего происхождения, вирус птичьего гриппа H5N1, штамм вируса птичьего гриппа H7N1, вирус птичьего гриппа H9N2 и вирус птичьего гриппа, адаптированный к холоду (ca) и чувствительный к температуре (ts), исходный донорный штамм А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

Вакцины вируса гриппа могут содержать все белки, пептиды или части вируса гриппа, а также нуклеиновые кислоты, которые кодируют эти белки, пептиды или их части, а также сами частицы вируса гриппа, рекомбинантные белки вируса гриппа, в том числе белки оболочек вируса гриппа белки, субвирусные частицы, вирусоподобные частицы (VLP), VLP-комплексы и/или их части, которые могут использоваться для целей иммунизации против гриппа.

Инактивированные вакцины гриппа обычно могут быть предоставлены с помощью дезактивирующего реплицированного вируса по изобретению с использованием известных способов, таких как, но без ограничения, обработка формалином или пропиолактоном. Типы инактивированных вакцин, которые могут применяться в настоящем изобретении, могут включать в себя цельно-версионную (WV) вакцину или субверсионную (SV) вирусную вакцину. WV вакцина содержит интактный инактивированный вирус, в то время как SV вакцина содержит очищенный вирус, разрушенный с помощью детергентов, которые солюбилизируют липид-содержащую вирусную оболочку с последующей химической инактивацией остаточного вируса.

Кроме того, вакцины, которые могут применяться, включают вакцины, которые содержат изолированные поверхностные белки HA и NA, называемые поверхностными антигенными вакцинами. В общем, ответы на SV поверхностные антигенные вакцины (т.е. очищенный HA или NA) похожи. Экспериментальная инактивированная WV вакцина, содержащая антиген NA, иммунологически связанный с эпидемическим вирусом и несвязанный HA, оказывается, является менее эффективной, чем обычные вакцины.

Инактивированные вакцины, содержащие оба соответствующих поверхностных антигена, являются предпочтительными.

Живые вакцины аттенуированного гриппа, использующие реплицированный вирус, также могут применяться для профилактики или лечения вирусной инфекции гриппа в соответствии с известными этапами способа: Ослабление предпочтительно достигается в одну стадию путем передачи ослабляющих генов из ослабленного вируса-донора к реплицированному изоляту или реассортантному вирусу в соответствии с известными способами (см., например, Murphy, *Infect. Dis. Clin. Pract.* 2:174-181 (1993)). Поскольку устойчивость к вирусу гриппа А опосредуется развитием иммунного ответа на HA и NA гликопротеины, гены, кодирующие эти поверхностные антигены, должны приходиться из подтвержденных вирусов или клинических изолятов высокого роста. Аттенуирующие гены получают от ослабленного родителя. При таком подходе гены, придающие ослабление, предпочтительно не кодируют HA и NA гликопротеины. В противном случае эти гены не могут быть переданы реассортантам, несущим поверхностные антигены изолята клинического вируса. Многие донорные вирусы были оценены на их способность воспроизводимо ослаблять вирусы гриппа. В качестве неограничивающего примера адаптированный к холоду (CA) донорный вирус А/Энн Арбор(AA)/6/60 (H2N2) может применяться для получения аттенуированных вакцин (см., например, Edwards, J. *Infect. Dis.* 169:68-76 (1994); Murphy, *Infect. Dis. Clin. Pract.* 2:174-181 (1993)). Кроме того, живые аттенуированные реассортантные вирусные вакцины могут быть получены в результате скрещивания донорного вируса с вирулентным реплицированным вирусом по изобретению.

Реассортантное потомство затем отбирают при 25°C (ограничивающей репликации вирулентного вируса) в присутствии H2N2 антисыворотки, которая ингибирует репликацию вирусов, несущих поверхностные антигены аттенуированного донорного вируса AI AAI6/60 (H2N2) са.

Другие аттенуирующие мутации могут вводиться в гены вируса гриппа с помощью сайт-направленного мутагенеза для спасения инфекционных вирусов, несущих эти мутантные гены. Аттенуирующие мутации могут вводиться как в не кодирующие области генома, так и в кодирующие области. Такие аттенуирующие мутации могут также вводиться в другие гены, отличные от HA или NA, например PB2 ген полимеразы (Subbarao et al., *J. Virol.* 67:7223-7228 (1993)). Таким образом, также могут генерироваться новые донорские вирусы, несущие аттенуирующие мутации, введенные с помощью сайт-направленного мутагенеза, и такие новые вирусы-доноры могут использоваться в производстве живых аттенуированных реассортантов вакцин-кандидатов H1N1 и H3N2 способом, аналогичным способу, описанному выше для донорского вируса AI AAI6/60 са. Аналогично, другие известные и подходящие аттенуированные донорские штаммы могут быть реассортированы реплицированным вирусом гриппа по изобретению для получения ослабленных вакцин, пригодных для применения в вакцинации млекопитающих (см. Ewami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3802-3805 (1990); Muster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5177-5181 (1991); Subbarao et al., *J. Virol.* 67:7223-7228 (1993); заявка на патент США № 08/471100, содержание которых полностью включено в данное описание в качестве ссылки).

Вакцинные препараты.

Вакцинные композиции по настоящему изобретению, подходящие для вакцинации или для парентерального или перорального введения, включают аттенуированные или инактивированные вирусы гриппа, необязательно дополнительно включающие стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Композиция может дополнительно содержать вспомогательные реагенты или наполнители, которые известны в данной области техники.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и/или эмульсии, которые могут содержать вспомогательные реагенты или наполнители, известные в данной области техники. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и подходящие для инъекций органические сложные эфиры, такие как этилолеат.

Носители или окклюзионные повязки могут применяться для повышения проницаемости кожи и усиления абсорбции антигена. Жидкие лекарственные формы для перорального введения обычно могут содержать липосомные растворы, содержащие жидкую лекарственную форму. Подходящие формы для суспендирования липосом включают эмульсии, суспензии, растворы, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, традиционно используемые в данной области, такие как очищенная вода. Кроме инертных разбавителей, такие композиции могут также включать адьюванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и суспендирующие агенты или подсластители, вкусовые вещества или отдушки. См., например, ниже публикации Berkow, Goodman, Avery's, Osol, и Katzung, содержание которых во всей полноте введено в данное описание в качестве ссылки, включая все приведенные там ссылки.

Когда композиция вакцины по настоящему изобретению используется для введения индивидууму, она может дополнительно содержать соли, буферы, адьюванты или другие соединения, которые желательны для улучшения эффективности композиции.

Адьюванты представляют собой соединения, которые могут использоваться для усиления специфического иммунного ответа. Обычно адьювант и композицию смешивают до введения в иммунную систему или вводят отдельно, но в то же самое место млекопитающего, подлежащего иммунизации.

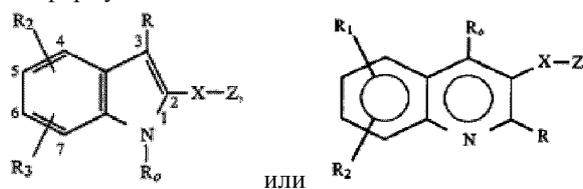
Неоднородность в вакцине может обеспечиваться путем смешивания реплицированных вирусов гриппа по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа, например 2-50 штаммов или любого диапазона разновидности штаммов или значения в указанном диапазоне.

В соответствии с настоящим изобретением вакцины могут быть предоставлены для вариаций одного штамма вируса гриппа или для нескольких штаммов вируса гриппа с использованием способов, известных в данной области техники.

После приготовления композицию вакцины можно затем вводить в субъекту, нуждающемуся в этом. Таким образом, аттенуированная или инактивированная вакцинная композиция по настоящему изобретению обычно может предоставляться либо до вспышки инфекции (так, чтобы предотвратить или ослабить ожидаемую инфекцию), либо после инициации фактической инфекции. Например, такая композиция вакцины может вводиться различными парентеральными путями, такими как подкожный, внутривенный, внутрикожный, внутримышечный, внутривнутрибрюшинный, интраназальный, пероральный или чрескожный. Парентеральное введение может представлять собой болюсную инъекцию или медленную перфузию по времени. Предпочтительным режимом применения вакцинной композиции по настоящему изобретению является внутримышечное или подкожное введение. См., например, ниже публикации Berkow, Goodman, Avery и Katzung, содержание которых полностью включено в данное описание в качестве ссылок, включая все ссылки, указанные в них.

Вакцинная композиция вводится субъекту в эффективном количестве. Эффективное количество композиции вакцины представляет собой количество, которое является достаточным для достижения желаемого биологического эффекта. Понятно, что эффективная доза будет зависеть от возраста, пола, состояния здоровья и массы реципиента, вида сопутствующего лечения, если таковое имеется, частоты приема лечения и природы желаемого эффекта. Диапазоны эффективных доз, приведенных ниже, не предназначены для ограничения изобретения, а представляют предпочтительные диапазоны доз. Тем не менее наиболее предпочтительная доза будет подбираться для индивидуального субъекта специалистом в данной области техники способом, понятным и осуществимым без излишнего экспериментирования.

Данное изобретение включает в себя следующие конкретные варианты осуществления. В одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения терапевтических, профилактических или диагностических биологических молекул из системы клетки-хозяина, включающему контактирование системы клетки-хозяина по меньшей мере с одним химическим веществом, выбранным из табл. 1. Клетка-хозяин может представлять собой культуру клеток или яйцо с развивающимся эмбрионом. Культуру клеток предпочтительно выбирают из группы, включающей MDCK, Vero, BHK, PERC6 или CHO. В предпочтительном варианте осуществления изобретения биологическая молекула представляет собой антитело, фрагмент антитела или вакцинный антиген, в частности вирусный антиген, особенно предпочтительно - антиген, специфический в отношении вируса гриппа. В предпочтительном варианте осуществления изобретения в качестве химических реагентов используется статин или аналоги статина, отличные от симвастатина. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения концентрация этих аналогов статина, отличных от симвастатина, составляет от 0,001 до 10 мкМ, особенно предпочтительно меньше или равна 0,05 мкМ. В предпочтительном варианте осуществления изобретения используются соединения следующей общей формулы:



В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения применяются флувастатин, питавастатин, аторвастатин, церивастатин, ловастатин, мевастатин, правастатин, розувастатин или производные этих соединений, в частности флувастатин, питавастатин или их производные.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полученная биологическая молекула подвергается дальнейшей обработке с получением конечного стерильного продукта, например, посредством дополнительных стадий концентрации, очистки, фильтрации, получения препарата, стерилизации и наполнения. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения терапевтических, профилактических или диагностических биологических молекул из клетки-хозяина, включающему контактирование клетки-хозяина с химическим соединением, описанным в табл. 1, сбор биологической молекулы и технологическую переработку биологической молекулы в конечный терапевтический, профилактический или диагностический продукт. Предпочтительно продукт представляет собой вакцину против гриппа, в частности вакцину против гриппа В.

Определения

Термин "клетка-хозяин" означает клетку, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, такую как вектор, поддерживает репликацию и/или экспрессию нуклеиновой кислоты и, необязательно, продуцирование одного или нескольких кодированных продуктов, включая полипептид и/или вирус. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими, такими как *E.coli*, или эукариотическими, такими как клетки дрожжей, насекомых, амфибий, птиц или млекопитающих, включая клетки человека и клетки яиц с развивающимися эмбрионами. Термин "клетка-хозяин" включает в себя культивируемые клетки, комбинации или смеси клеток-хозяев, включая, например, смешанные культуры клеток различных типов или клеточных линий (например, клетки Vero и CEK).

Термины "биологические молекулы", "биологический продукт", используемые в данном описании, включают в себя любые молекулы, выделенные из живого организма, а также их производные, мутанты или варианты и/или биологически активные фрагменты. В контексте настоящего изобретения биологические молекулы или биологические продукты включают в себя биофармацевтические продукты или биопрепараты. Например, биологический продукт может представлять собой белок, такой как антигены, ферменты (например, киназы, протеазы, фосфатазы, трансферазы, факторы коагуляции и т.д.), пептиды, антитела, рецепторы, слитые белки, факторы роста, гормоны, цитокины (например, хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины, фактор некроза опухоли), нейротоксины и т.п. Биологическим продуктом может быть нуклеиновая кислота, нуклеотид, углевод, липид, вирусные или бактериальные белки, например, для применения в вакцинах, вирусные частицы. Предпочтительно биологическая молекула может применяться в качестве активного ингредиента в фармацевтическом препарате, таком как вакцина или фармацевтическое средство. В контексте настоящего изобретения термины "продукт", "белок" и "биологические молекулы" могут использоваться в данном описании взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления изобретения подходящие биологические молекулы представляют собой рекомбинантные белки, включая, но без ограничения, секретированные белки, фрагменты белков (например, внеклеточные домены трансмембранных белков), химерные белки и/или меченые белки. Одна или несколько меток, если присутствуют, могут находиться на С-конце, N-конце и/или внутри белка (например, между двумя модулями). В некоторых вариантах осуществления изобретения такие рекомбинантные белки могут содержать один или несколько фрагментов сигнальных пептидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие рекомбинантные белки могут быть в виде предшественников (например, прогормонов) или их метаболитов.

Термины "улучшать", "увеличивать" или "повышать" относятся к статистически значимому или физиологически значимому количеству, которое сравнивается с соответствующим контролем.

Термин "соединение-кандидат" или "химический реагент" относится к любому химическому, фармацевтическому или лекарственному средству и т.п., которое используется для модулирования экспрессии или производства биологических молекул в системах клеток-хозяев, таких как клеточная культура или яйца. Химические реагенты, используемые в данном изобретении, также включают их аналоги, а также их фармацевтически приемлемые носители, разбавители и препараты.

Термин "изомеры", когда используется в данном описании, относится к различным соединениям с одинаковой молекулярной формулой, которые различаются по расположению и конфигурации атомов. Кроме того, термин "оптический изомер" или "стереоизомер", когда используется в данном описании, относится к любой из различных стереоизомерных конфигураций, которые могут существовать для данного соединения по настоящему изобретению, включая геометрические изомеры. Подразумевается, что заместитель может присоединяться к хиральному центру, представляющему собой атом углерода. Таким образом, настоящее изобретение включает энантиомеры, диастереомеры или рацематы соединения. "Энантиомеры" представляют собой пару стереоизомеров, которые не являются зеркальными отражениями друг друга. Смесь пары энантиомеров в соотношении 1:1 представляет собой "рацемическую" смесь. Термин используется для обозначения рацемической смеси, когда это необходимо. "Диастереоизомеры" представляют собой стереоизомеры, которые содержат по меньшей мере два асимметричных атома, но которые не являются зеркальным отражением друг друга. Абсолютная стереохимия задается в соответствии с RS-системой Ингольда-Кана-Прелога. Когда соединение представляет собой чистый энантиомер, стереохимия каждого хирального атома углерода может быть определена как R или S. Разделенные соединения, абсолютная конфигурация которых не известна, могут быть обозначены (+) или (-), в зависимости от направления (правовращающее или левовращающее), в котором они вращают плоскополяризованный свет при длине волны D линии натрия. Некоторые из соединений, описанных в данном изобретении, содержат один или несколько асимметричных центров или осей и, следовательно, могут давать энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные формы, которые могут быть определены в терминах абсолютной стереохимии как (R)- или (S)-. Настоящее изобретение включает все такие возможные изомеры, в том числе рацемические смеси, оптически чистые формы и промежуточные смеси. Оптически активные (R)- и (S)-изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов или разделяться с использованием традиционных методик. Если соединение содержит дивалентную двойную связь, заместитель может иметь E- или Z-конфигурацию. Если соединение содержит дизамещенный циклоалкил, циклоалкильный заместитель может иметь цис- или транс-конфигурацию.

Подразумевается, что все таутомерные формы также включены в данное изобретение.

Термин "пролекарство", когда используется в данном описании, означает соединение, которое может быть превращено в физиологических условиях или путем сольволиза в конкретное соединение или фармацевтически приемлемую соль такого соединения. Пролекарства включают соединения, в которых аминокислотный остаток или полипептидная цепь из двух или более аминокислотных остатков ковалентно соединены посредством амидной или эфирной связи со свободной аминогруппой, гидроксильной группой или группой карбоновой кислоты. Рассматриваемые аминокислотные остатки включают, но без ограничения, 20 природных аминокислот. Другие подходящие аминокислоты включают 4-гидроксипролин, гидроксизин, демозин, изодемозин, 3-метилгистидин, норвалин, β -аланин, 5-аминомасляную кислоту, циртуллин, гомоцистеин, гомосерин, орнитин и метионинсульфон.

Термин "обрабатывать", "обработка", "контактирование", "в присутствии" относятся к добавлению химического реагента к раствору или среде или к смешиванию химического реагента с раствором или средой, которые облегчают взаимодействие клетки с реагентом. Термин "обрабатывать (лечить)" или "обработка (лечение)", используемый в контексте введения субъекту (например, пациенту), относится к терапевтическому и/или профилактическому вмешательству для получения желаемого результата у субъекта, например для облегчения, лечения, задержки начала, уменьшения тяжести, предотвращения или снижения вероятности возникновения состояния или заболевания в популяции. Например, настоящее изобретение может быть осуществлено при производстве фармацевтической композиции (терапевтической и/или профилактической), которая может применяться в способе лечения субъекта, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества композиции.

Термины "эффективное количество" и "эффективная доза", когда используются в данном описании, относятся к любому количеству или дозе соединения или композиции, которые являются достаточными для выполнения поставленной(ых) задачи(задач), т.е. получения желаемого биологического или медицинского ответа в ткани или у субъекта при приемлемом соотношении польза/риск. Соответствующее предполагаемая задача может быть объективной (т.е. измеримой некоторым тестом или маркером) или субъективной (т.е. у субъекта проявляются симптомы или субъект чувствует эффект). В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество представляет собой количество, при введении которого популяции субъектов, отвечающих определенным клиническим критериям, в популяции получают статистически значимый ответ. Эффективное количество обычно вводят в соответствии со схемой приема, которая может включать введение нескольких стандартных доз. Для любого конкретного фармацевтического средства эффективное количество (и/или подходящая стандартная доза в схеме введения) может изменяться в зависимости, например, от способа введения, сочетания с другими фармацевтическими реагентами. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество представляет собой количество, которое вызывает достаточный (например, защитный) иммунный ответ, который является статистически значимым в целевой популяции. В некоторых вариантах осуществления изобретения конкретное эффективное количество (и/или стандартная доза) для любого конкретного пациента может зависеть от множества факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и тяжесть расстройства; активность применяемого конкретного фармацевтического средства; применяемую специфическую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента; время введения, путь введения и/или скорость экскреции или метаболизма конкретного применяемого фармацевтического средства; продолжительность лечения и подобные факторы, которые известны в области медицины. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективное количество представляет собой количество, которое при введении в соответствии с определенной схемой дает положительный результат с достаточно приемлемым уровнем нежелательных побочных эффектов, так что побочные эффекты, если они присутствуют, являются достаточно терпимыми для пациента, чтобы продолжать лечение в соответствии с данной схемой. Специалистам в данной области техники будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стандартная доза может рассматриваться как доза, содержащая эффективное количество, если она содержит количество, подходящее для введения в контексте схемы приема лекарственного средства, коррелированной с положительным результатом.

Термин "популяция", "группа населения" (как во фразе "целевая популяция") может относиться к группе индивидуумов (например, пациентов), которые отвечают определенным клиническим критериям. Как правило, статистически значимый биологический эффект может наблюдаться в популяции, включающей в себя по меньшей мере 50 индивидуумов, предпочтительно более 50 индивидуумов. Популяция может быть определена по возрасту, например пожилые люди (например, 65 лет и старше); педиатрическая популяция (например, новорожденные, младенцы, дети 2-12 лет, 3-6 лет, 2-7 лет или 6-12 лет), подростки (например, 12-16 лет, 12-18 лет, 13-19 лет или 19-21 лет), молодые люди (например, 17-24 лет), взрослые (например, 18-64 лет) и т.д. Кроме того, или в качестве альтернативы, популяция может быть определена с помощью определенного(ых) медицинского(их) состояния(ий), например популяция с подавленным иммунитетом, с предшествующей историей конкретного состояния, с более высоким риском развития конкретного медицинского состояния, с определенным генетическим фоном, с диагностиро-

ванным конкретным заболеванием или расстройством, получает или планируют получить конкретную лечебную терапию или любые их комбинации.

Термин "контроль" относится к клетке-хозяину (клеткам-хозяевам) или системам, включающим клетки-хозяева, которые подвергаются, по существу, идентичному тестированию, но не контактируют с химическим реагентом или которые обрабатываются ДМСО. В качестве альтернативы термин "контроль" относится к тестируемому соединению, используемому в качестве сравнительного реагента, с которым сравниваются другие соединения или системы.

Выражение "низкая концентрация" химических реагентов, когда используется данным описанием, относится к присутствию соединений в количестве от 0,1 нМ до 10 мкМ. Низкая концентрация представляет собой относительное количество и может включать в себя концентрации, приведенные выше в данном описании. Соответственно, термин "более низкая концентрация" относится к диапазону концентраций, которые могут адекватно обеспечить нужные результаты в настоящем документе по сравнению с контролем в конкретной системе.

Термин "продукт разложения" в данном контексте означает примесь, образующуюся в результате химического изменения композиции в процессе производства и/или хранения композиции под действием, например, света, температуры, pH, воды или взаимодействия с наполнителем и/или непосредственной закрытой системой контейнера.

Примеры

Схема научного подхода.

Для идентификации химических соединений, подходящих для увеличения роста или продуцирования продукта биологической системы (например, продуцирования вируса гриппа в MDCK клетках), используют подход, включающий следующие этапы.

(1) Проведение высокопроизводительных скринингов с использованием библиотеки соединений с небольшими молекулами, включая природные иммунодепрессанты и соединения с низким уровнем токсичности, которые нацелены на соответствующие биологические процессы и пути клеточного метаболизма на различных стадиях жизненного цикла вируса гриппа.

(2) Подтверждение действия выявленных соединений ("соединений-лидеров") в лабораторных субпензионных культурах клеток MDCK с использованием множества штаммов и подтипов вируса гриппа.

(3) Проведение анализа зависимости "структура-активность" (SAR) выявленных соединений и скрининг дополнительных структурно-родственных аналогов.

(4) Исследование механизма действия (mechanism-of-action - MOA) выявленных соединений.

(5) Подтверждение результатов концептуальных исследований в системе биореактора.

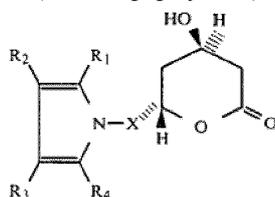
Выявляют несколько соединений, которые даже в низких концентрациях дают значительное повышение выхода различных штаммов и подтипов гриппа, включая штаммы гриппа В.

Пример 1. Высокопроизводительный скрининг.

В соответствии с методикой высокопроизводительного скрининга (High Throughput Screening - HTS) соединения тестируют в 384-луночном формате, содержащем клетки MDCK 33016PF (клетки описаны в патенте США № 6455298), инфицированные вирусом гриппа А/реассортант/NYMC X-183 H3N2. Библиотеку соединений, включающую 14398 химических реагентов, подвергают первичному скринингу с использованием метода ELISA, основанного на нуклеопротеине (NP-ELISA), при концентрации соединения 1 мкМ. 1547 лучших, согласно первичному скринингу, соединений подвергают тестированию методом NP-ELISA в исследовании зависимости "доза-ответ" с использованием диапазона концентраций 0,001-10 мкМ. После этого вторичный скрининг проводят на 268 лучших соединениях первичного скрининга, протестированных методом NP-ELISA в исследовании зависимости "доза-ответ". Вторичный скрининг дает 88 лучших соединений, 80 из которых показывают по меньшей мере 50% увеличение выхода NP и/или HA при концентрациях соединений менее 10 мкМ.

В одном случае при наибольших протестированных концентрациях сигналы HA и NP не поддаются измерению. Например, статиновое лекарственное средство в концентрации 10,0 мкМ дает на -12,34% увеличение HA сигнала и -11,44% увеличение NP сигнала. Вполне возможно, что при такой высокой дозе истощение холестерина, например, из мембраны клетки-хозяина или вируса является результатом функции статина, что ставит под угрозу целостность клеток и вирусной мембраны. Десять лучших соединений, выбранных для тестирования, представлены в табл. 3.

Два наиболее эффективных соединения ("соединения-лидеры"), выбранные для дальнейшего тестирования, представляют собой сульфонамид (аналог формулы 3)



и питавастатин (аналог формулы 2)

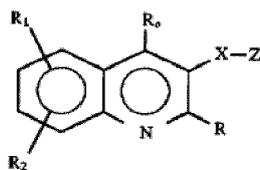
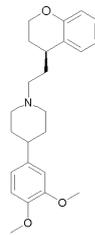
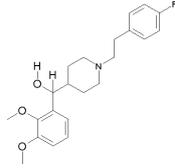


Таблица 3

Соединение	Концентрация в лунке (мкМ)	Средн. % повышения выхода НА	Средн. % увеличения сигнала NP
Тетрагидропиридин 	0,08	24,89	27,29
	0,16	30,19	44,21
	0,31	27,89	40,52
	0,63	38,90	64,44
	1,25	50,71	65,48
	2,50	86,11	104,71
	5,00	91,58	137,47
	10,00	102,19	166,64
Сульфонамид 	0,08	64,93	21,01
	0,16	64,33	31,11
	0,31	64,38	23,61
	0,63	91,94	21,38
	1,25	92,47	50,73
	2,50	129,92	65,71
	5,00	122,77	87,25
	10,00	159,01	107,41
Тропанил 	0,08	33,48	-1,47
	0,16	37,55	1,76
	0,31	42,65	12,87
	0,63	48,67	22,70
	1,25	58,61	52,25
	2,50	77,61	87,42
	5,00	82,92	133,32
	10,00	123,48	175,04
Статин 	0,08	67,38	91,92
	0,16	76,13	90,98
	0,31	74,03	90,22
	0,63	83,20	69,05
	1,25	68,34	65,28
	2,50	60,97	63,19
	5,00	16,25	29,27
	10,00	-12,34	-11,44
Бензизотиазол 	0,08	26,67	5,84
	0,16	25,97	14,84
	0,31	22,62	26,68
	0,63	28,39	26,79
	1,25	34,15	47,70
	2,50	47,99	53,27

	5,00	88,58	78,01
	10,00	124,63	99,38
Бензпираны 	0,08	41,56	49,66
	0,16	50,02	46,81
	0,31	49,52	47,83
	0,63	64,30	69,11
	1,25	60,09	76,67
	2,50	80,12	123,05
	5,00	78,27	97,64
	10,00	107,06	91,94
	Диметоксифенил- пиперидинметанола 	0,08	40,64
0,16		49,76	42,89
0,31		46,61	51,23
0,63		57,07	70,43
1,25		62,46	67,14
2,50		64,47	96,13
5,00		67,07	124,66
10,00		97,73	148,67

Пример 2. Подтверждающее тестирование выявленных соединений.

Два лучших выбранных соединения подвергают тестированию для подтверждения их активности, проводимому в 10 мл суспензионных культур с использованием нескольких штаммов и подтипов вируса гриппа. После инкубирования вируса супернатант собирают и количественно определяют выход вируса/НА. Выход НА количественно определяют с помощью ELISA. Количество инфекционных частиц измеряют с помощью анализа фокусообразования (focus formation assay - FFA) на основе NP. Вирусные частицы количественно измеряют подсчетом с помощью кПЦР последовательностей нуклеиновых кислот. Выход вирусных частиц, инфекционных частиц и НА, определенный в культуральном супернатанте, показывает аналогичное увеличение при применении сульфонамидного аналога (далее "сульфонамидный аналог") и питавастатина по сравнению с контролем. Однако питавастатин повышает выход при значительно более низкой концентрации, чем сульфонамидный аналог. Результаты исследования повышения ответа зависимым от дозы образом для штамма H3N2 IVR-165 представлены на фиг. 2. Питавастатин приводит к 3-кратному увеличению выхода НА даже при таких низких концентрациях, как 0,05 или даже 0,01 мкМ.

Пример 3. Тестирование выявленных соединений с различными штаммами вируса гриппа.

Для изучения области штаммов вируса гриппа, которые могут повреждаться в результате обработки соединениями, описанными в данном изобретении, клетки MDCK инфицируют различными штаммами и подтипами вируса гриппа с использованием 1 мкМ сульфонида или 0,05 мкМ питавастатина. Вирусное инфицирование проводят при MOI 10^{-3} или 10^{-4} в течение примерно 60 ч при температуре 34°C.

I. Вирус гриппа А.

Образец получают из супернатанта через 60 ч после вирусной инокуляции для исследования механизма действия с целью определения экспрессии гена или экспрессии белка. Как показано на фиг. 3, наблюдается значительное повышение выхода НА для нескольких штаммов вируса гриппа, таких как вирус гриппа подтипа А H1N1 (штаммы А/Брисбен/10/10 и А/Соломон х145), вирус гриппа подтипа А H3N2 (штаммы А/Виктория/361/11, А/Брисбен/10/07, А/Уругвай/716/07 и А/Техас/50/12).

II. Вирус гриппа подтипа В.

Химические реагенты, используемые в настоящем изобретении, оказывают значительное влияние на продуцирование вируса/белка вируса гриппа подтипа В. Как показано на фиг. 4, сульфонида и питавастатин дают по меньшей мере 2-кратное увеличение продуцирования НА по сравнению с контролем со множеством штаммов вируса гриппа подтипа В (штамм В/Панама/45/90, В/Флорида/4/06, В/Висконсин/1/10, В/Брисбен/60/08 и В/Массачусетс/2/12).

Эти данные показывают, что действие соединений не ограничивается определенным штаммом вируса.

Пример 4. Механизм действия и жизнеспособность клеток.

Исследования механизма действия проводят с целью определения влияния химических веществ на различные стадии жизненного цикла вируса. Время добавления при исследовании составляет -32, -24, -8, -1, +2, +4, +6 ч от инфицирования клеток. В исследовании вирусной инфекции с единственным циклом клетки инкубируют с вирусом при MOI 5 на льду в течение 1 ч для предоставления возможности вирусу прикрепиться. Спустя 1 ч незакрепленные вирусы смывают, клетки переносят в 34°C для слияния вирусов и проникновения их в клетки. После стадии промывки добавление 1,0 мкМ сульфонида или 0,05 мкМ питавастатина осуществляют в различные моменты времени (T=0, 2, 4, 6 ч). Сульфонида

аналог и питавастатин, как оказывается, являются стабильными в течение периода времени до 32 ч в культуре до заражения вирусом гриппа H3N2 штамма IVR-165 (А/Виктория/361/2011). Выход НА снижается от примерно 20 пг/мл до примерно 5 мкг/мл для сульфонамидного аналога через 6 ч после инфицирования и от примерно 20 до примерно 5 мкг/мл для питавастатина через 2 ч после инфицирования. Полученные результаты свидетельствуют о том, что выход НА зависит от времени добавления после вирусного инфицирования, что может являться результатом действия конкретного реагента и конкретной стадии жизненного цикла вируса.

Анализы жизнеспособности клеток проводят с использованием MDCK клеток, обработанных 1 мкМ сульфонамида или ДМСО (контроль). Жизнеспособность клеток отслеживают в течение 60 ч с использованием VI-CELL машины (Beckman Coulter) (жизнеспособность клеток измеряется на основе вытеснения трипанового синего). Сульфонамидный аналог, используемый в данном тестировании, не является поступающим в продажу лекарственным препаратом, поэтому его токсичность использовалась для идентификации жизнеспособности клеток при инкубации с наивысшей тестируемой концентрацией 10 мкМ и контактировании в течение 60 ч. Ни сульфонамид, ни питавастатин не оказывают негативного влияния на жизнеспособность клеток. В клетках, обработанных сульфонамидом, обнаруживается 91% жизнеспособность.

Пример 5. Масс-спектрометрический анализ.

Анализ жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра, управляемого в режиме мониторинга нескольких реакций (Multiple Reaction Monitoring - MRM), разработан для контроля присутствия соединения/клиренса в супернатанте клеточной культуры и после процесса вирусной очистки с помощью градиента плотности сахарозы. Оценку предела обнаружения (limit of detection - LOD) проводят серийным разведением соединений в жидкости, содержащей моновалентную вакцину и затем выполняют последовательное разведение соединений с использованием указанной жидкости до концентрации 1 нг/мл. Перед анализом во все образцы добавляют ацетонитрил (50% об./об.) и образцы центрифугируют в течение 5 мин на лабораторной центрифуге для удаления осадка белка. Для обоих образцов, содержащих 1 нг/мл сульфонамида и 1 нг/мл питавастатина, соотношение сигнала и шума составляет более 100 (более 400 в случае сульфонамида). Из наблюдаемого соотношения сигнала и уровня шума при концентрации 1 нг/мл консервативно оцененный предел обнаружения составляет менее 0,5 нг/мл, и предел количественного определения составляет примерно 5 нг/мл (фиг. 6А). Калибровочные кривые для каждого соединения выглядят одинаково линейными от 1 до более 50 нг/мл со значениями R_2 более 0,95 (фиг. 6А, 6В). Для определения метаболизма или разложения соединения в культуре клеток соединения вводят только в среду или в смесь среда+MDCK клетки. Супернатант этих образцов отбирают в 0 и 60 ч для масс-спектрометрического анализа. Через 60 ч потери соединений не обнаружены (фиг. 6В). Для определения возможности удаления соединений из супернатанта культуры клеток после процесса очистки вируса клетки MDCK инфицируют вирусом гриппа типа А или В в присутствии соединений. Через 60 ч осветленный супернатант клеточной культуры (1) замораживают при -80°C для последующего ЖХ-МС анализа или (2) подвергают вирусной очистке с центрифугированием в градиенте плотности сахарозы и вирусные частицы пеллеттируют. Эти "очищенные" образцы также тестируют ЖХ-МС для определения качества очистки образцов от соединений. Обнаружены следовые количества (ниже LOQ, приближающиеся к LOD) в этих очищенных образцах. Общее количество (в нг) соединений, остающихся после очистки вируса, составляет менее 0,25% от их исходного количества в клеточных культурах (фиг. 6С).

Пример 6. Исследования в больших объемах.

Для определения возможности воспроизводства выхода НА в больших объемах два выявленных соединения разбавляют ДМСО и применяют в концентрациях 0,2 и 5 мкМ в образцах объемом 10 или 60 мл, содержащих культуру MDCK клеток, инфицированную H3N2 штаммом (IVR165) с $\text{MOI}=10^{-4}$, в течение 60 ч. Количество вирусных частиц определяют с помощью кПЦР РНКазы-резистентных РНК транскриптов, таких как ген М вируса гриппа (см. Ngaosuwankul et al. *Virology Journal*, 7:75 (2010), doi: 10.1186/1743-422X-7-75). Выход НА нормализуют относительно контроля. Исследования показывают, что соответствующее увеличение выхода НА наблюдается в обоих образцах культуры объемом 10 и 60 мл.

Результаты, представленные на фиг. 5, показывают, что повышение выхода НА или повышение количества частиц коррелированы пропорционально, как подтверждено ELISA и кПЦР.

Множество аналогов соединений-лидеров испытывают для сравнения друг с другом. Большинство аналогов повышает выход вируса гриппа при тестируемой концентрации. Однако для некоторых аналогов тестируемая концентрация не является оптимальной. На фиг. 8 представлены результаты тестирования аналогов статины для сравнения активности при 0,05 мкМ. Розувастатин идентифицирован как аналог, который не дает потенциала повышения выхода относительно сравнительных статинов при 0,05 мкМ. Однако необходимо оптимизировать альтернативные концентрации и экспериментальные условия, соответствующие тестируемому химическому реагенту, такому как розувастатин, для получения нужных эффектов.

Пример 7. SAR исследования.

Исследование зависимости "структура-активность" (Structure Activity Relationship - SAR) проводят для выявления аналогов соединений-лидеров. Идентифицируют 88 сульфонамидных аналогов, из которых тестируют три соединения. Один аналог приводит к увеличению выхода аналогично увеличению при применении соединения-лидера. Идентифицируют 155 аналогов питавастатина, из которых тестируют более 148 соединений. Кроме того, тестируют несколько других коммерчески доступных статинов (фиг. 8). Большинство тестируемых аналогов дают по меньшей мере 2-кратное увеличение выхода вирусных частиц. В частности показано, что (i) соединение-лидер пивастатин превосходит некоторые другие коммерчески доступные статины, включая симвастатин (фиг. 8), (ii) флувастатин и некоторые производные флувастатина, такие как метиловый или этиловый эфиры флувастатина, даже превосходят питавастатин (фиг. 7). Особенно предпочтительные варианты аналогов статина по изобретению включают реагенты, представленные в табл. 4, которые дают по меньшей мере 2-кратное увеличение выхода НА, как измерено с помощью ELISA, по сравнению с контрольной обработкой ДМСО в условиях, описанных выше.

Таблица 4

Соединения	НА-ELISA	
	Кратность повшения выхода НА по сравнению с ДМСО контролем	НА (мкг/мл)
Статиноподобный аналог 1	4,92	7,78
Статиноподобный аналог 2	4,71	8,01
Статиноподобный аналог 3	4,71	8,50
Статиноподобный аналог 4	4,32	7,34
Статиноподобный аналог 5	4,14	6,89
Статиноподобный аналог 6	3,56	6,56
Статиноподобный аналог 7	3,51	7,61
Статиноподобный аналог 8	3,43	6,47
Статиноподобный аналог 9	3,16	6,38
Статиноподобный аналог 10	2,99	6,56
Статиноподобный аналог 11	2,97	6,42
Статиноподобный аналог 12	2,92	9,29
Статиноподобный аналог 13	2,89	8,63
Статиноподобный аналог 14	2,83	7,34
Статиноподобный аналог 15	2,73	19,69
Статиноподобный аналог 16	2,59	19,69
Статиноподобный аналог 17	2,57	14,34
Статиноподобный аналог 18	2,56	17,31
Статиноподобный аналог 19	2,54	12,51
Статиноподобный аналог 20	2,53	7,72
Статиноподобный аналог 21	2,43	7,19
Статиноподобный аналог 22	2,40	9,28
Статиноподобный аналог 23	2,24	10,56
Статиноподобный аналог 24	2,13	8,44
Статиноподобный аналог 25	2,09	8,55

Пример 8. Выявление пути передачи сигнала.

В способе повышения продуцирования биологического продукта с помощью добавления химических реагентов, описанном в изобретении, оценивают механизмы действия, объясняющие наблюдаемые эффекты усиления. Для выявления и характеристики химических добавок, подходящих для применения, и для определения целесообразности применения указанного способа для производства указанных продуктов в качестве рабочей модели используют продуцирование вакцины гриппа в клетках MDCK 33016PF. С этой целью для подробного анализа выбирают топ-соединение BYF589, которое повышает выход НА в нескольких штаммах и подтипах вируса гриппа по меньшей мере в 2 раза (соединение G в табл. 2). Для того чтобы определить, является ли повышение выхода НА с помощью BYF589 следствием ингибирования HMGCR, проводят исследования механизма действия соединения в системе. Для проверки мевалонатного (MEV) пути передачи сигнала используют специфические ингибиторы фермента (как показано на фиг. 9A). Эти ингибиторы ферментов селективно нацелены на конкретные ветви MEV пути метаболизма, обеспечивая определение более удобного пути для механизма действия ("MOA") BYF.

Исследуют возможные эффекты BYF589, а также различных ингибиторов ферментов пути метаболизма на жизнеспособность клеток и уровни общего клеточного холестерина. Тестируемые образцы включают ДМСО, BYF589 (1 мкМ), MEV (100 мкМ), FTI (0,5 мкМ), ZA (1 мкМ) и GTI (0,5 мкМ). Через 24 ч после обработки не обнаруживают никакого неблагоприятного влияния на жизнеспособность клеток, как измерено с помощью свечения клеточного титра (cell titer glow).

Свободный холестерин окисляется холестериноксидазой с образованием кетона холестерина и H_2O_2 с последующим взаимодействием со смесью Amplex Red+пероксидаза из хрена (HRP) для получения флуоресцентного резорфуинового продукта. Для этой части эксперимента определяют выход НА и клеточного холестерина, нормализованных по ДМСО, повышение выхода НА коррелирует с более низким уровнем холестерина в клетках, обработанных BYF, и является зависимым от дозы, что позволяет сделать предположение о том, что содержание холестерина может быть задействовано в повышении выхода. MEV сам по себе не оказывает никакого влияния на клеточные уровни холестерина. При применении MEV в сочетании с BYF снижается повышение выхода НА без повышения уровней содержания холестерина в клетках, свидетельствуя о том, что снижение содержания одного холестерина не является достаточным, чтобы привести к повышению выхода НА.

Когда три ингибитора соответствующих ответвлений MEV пути передачи сигнала используют в различных комбинациях, наблюдается аддитивный эффект, свидетельствуя о том, что несколько разветвлений указанного пути фактически участвует в создании эффекта усиления. Полученные результаты представлены на фиг. 9B. Эти результаты показывают, что блокирование всех трех ветвей указанного пути определенной комбинацией ингибиторов фермента может имитировать действие соединения по повышению выхода НА. Кроме того, подтверждено, что бифосфонат, ингибитор действия BYF589, который следует далее, но перед точкой разветвления сигнала, может вызвать аналогичный зависимый от дозы эффект повышения выхода НА, хотя и менее надежный, чем BYF589.

Пример 9. Исследования экспрессии генов.

Доказательства, представленные в литературе, свидетельствуют о том, что статины могут подавлять IFN и IFN-опосредуемые гены, такие как IP10 (CxCL10). Поэтому проводят исследование возможности наличия связи повышения выхода НА вируса гриппа с реакцией на подавление интерферона (IFN) статинами. Экспрессию генов IP10 и IFNB1 измеряют после инфицирования в присутствии или в отсутствие BYF589 соединения. Предварительные данные кОТ-ПЦР позволяют сделать предположение о задержке/подавлении индукции IFN β и IP10 в инфицированных вирусом MDCK клетках в присутствии BYF589. Наблюдаемое время задержки для обоих генов, испытанных в присутствии BYF589 соединения, составляет по меньшей мере 2 ч по сравнению со временем индукции гена (измеренным при пиковом значении) в отсутствие BYF589 соединения.

Пример 10. Определение времени обработки клетки-хозяина соединением, повышающим выход.

Для того чтобы оценить, насколько два соединения-лидера (BYF589 и AFZ077) могут работать посредством обычного пути передачи сигнала, каждое соединение добавляют к культуре клетки-хозяина в различное время после заражения и через 24 ч после заражения измеряют их влияние на выход НА. Результаты показывают, что при добавлении BYF589 во время инфицирования вирусом (T=0) в течение 24 ч достигается примерно 4-кратное увеличение выхода НА по сравнению с контролем, выращенным без соединения. Тем не менее при добавлении соединения BYF589 в последующие моменты времени (T=2, 4 или 6) значительного повышения выхода НА в течение 24 ч не наблюдается. В противоположность этому добавление AFZ077 во время инфицирования (T=0), а также в последующие моменты времени (T=2 и 4) приводит примерно к 4-кратному увеличению выхода НА через 24 ч после инфицирования; однако при добавлении AFZ077 через 6 ч после инфицирования (T=6) существенного увеличения выхода не наблюдается. Эти результаты указывают на то, что повышение выхода НА с помощью двух соединений зависит от времени добавления в инфицированные культуры клеток-хозяев. Кроме того, исходя из временных различий эффектов каждого соединения, есть вероятность того, что эти два соединения целевым образом воздействуют на разные стадии жизненного цикла вируса. Дополнительно или в качестве альтернативы, два соединения могут регулировать различные пути передачи сигналов клеток-хозяев.

Пример 11. Параллельное сравнение в мини-биореакторе.

Указанные два соединения-лидера дополнительно тестируют в коммерчески доступной системе биореактора малой производительности Ambr15™ (TAP Biosystems). Система Ambr15 имитирует характеристики классических биореакторов на микроуровне (10-15 мл), управляемых с помощью автоматизированного рабочего места, что позволяет быстро оценивать несколько культур в биореакторе на микроуровне.

Для тестирования оба соединения-лидера тестируют одновременно в контролируемых условиях с двумя препаратами инфекционной среды (DM134 и CDM) и двумя штаммами гриппа, А/Виктория/361/2011 (IVR-165) (с высоким уровнем экспрессии) и В/Массачусетс/2/2012 (с низким уровнем экспрессии).

Используемое в эксперименте инфицирование, характеризуется следующими показателями: плотность посева $1,0 \times 10^6$ клеток/мл или $2,5 \times 10^6$ клеток/мл; pH $7,1 \pm 0,02$ (двойной контроль pH с помощью 0,05N NaOH и газообразного CO_2); растворенный кислород 50% (50-80%), контролируется газообразным O_2 ; перемешивание 1000 об/мин (местный контроль); температура $34,0^\circ\text{C}$, контролируется с помощью регулирующего зонда биореактора; тип реактора Spargeless, реакторы расширенного диапазона температур; доза аэрации в процессе эксперимента 1 мл/мин.

Результаты, полученные в эксперименте в системе Ambr15, представлены на фиг. 10 и 11. Оба соединения-лидера повышают выход НА для штамма В с низким уровнем экспрессии в обеих тестируемых средах. Однако для тестируемого штамма А с высоким уровнем экспрессии добавление AFZ077 приводит к гораздо большему повышению выхода НА в обеих тестируемых средах. Количественное определение выхода НА осуществляют с помощью ELISA с последующим подтверждением с помощью ВЭЖХ. AFZ077 повышает выход НА в DM134 среде с низкой (1×10^6 на 1 мл) и высокой ($2,5 \times 10^6$ на 1 мл) плотностями инфицированных клеток в системе. Для последней при сочетании высокой ICD с AFZ обработкой обработка AFZ077 приводит к в ~4 раза более высокому выходу по сравнению с первоначальным выходом, что превышает первоначальное целевое 2-кратное повышение (фиг. 12). Таким образом, в системе Ambr15 добавление AFZ077 повышает выход НА в DM134 среде во встряхиваемых колбах и 15 мл биореакторах для всех исследованных штаммов. BYF589 повышает выход НА в DM134 среде во встряхиваемых колбах и 15 мл биореакторах в штамме вируса гриппа В с низким уровнем экспрессии. В целом, больший эффект повышения выхода наблюдается для штаммов с низким уровнем экспрессии. Кроме того, дополнительные эффекты наблюдаются при применении AFZ077 и более высокой плотности инфицирующих клеток.

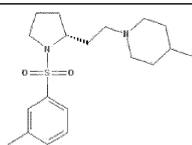
Пример 12. Биореактор большого объема.

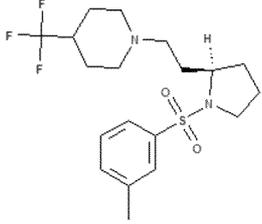
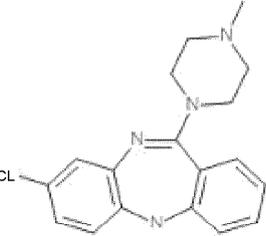
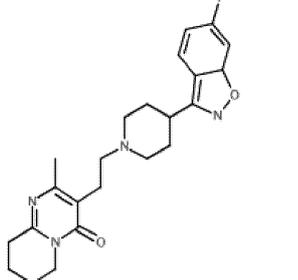
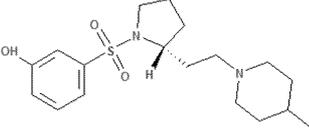
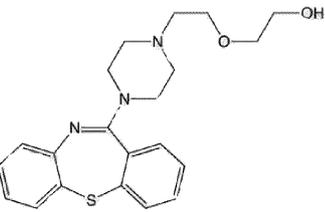
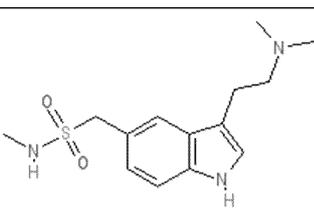
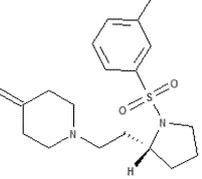
Предыдущие исследования показывают, что соединение AFZ077 повышает выход НА в DM134 среде в опытных встряхиваемых колбах и биореакторах объемом 15 мл. Результаты подтверждают с использованием трех различных вирусов (штаммы высокой, средней и низкой экспрессии). Результаты показывают, что BYF589 повышает выход НА в DM134 среде в исследованиях во встряхиваемых колбах и биореакторах объемом 15 мл для штамма гриппа В с низким уровнем экспрессии, но не для штамма H3N2 с высоким уровнем экспрессии. Для подтверждения этих результатов в системе большого объема используют биореакторы TD AMBR™ объемом 250 мл. Оба соединения-лидера (а также только ДМСО в качестве отрицательного контроля и среду без соединения/без ДМСО в качестве двойного отрицательного контроля) тестируют со штаммами с высоким и низким уровнем экспрессии для определения возможности воспроизведения повышения выхода, наблюдаемого в культурах небольшого объема, в системе большого объема. Параметры эксперимента: отработанный DM134: свежий PFM (1:3); штаммы вируса А/Виктория/361/2011 (IVR-165) и В/Массачусетс/02/2012; MOI 10^{-5} для А/Виктория IVR-165 и 10^{-4} для В/Массачусетс; ICD: $2,0 \times 10^6$ - $3,0 \times 10^6$ клеток/мл; N-1 процесс: 1В (без замены среды); время сбора урожая - через 65-72 ч после инфицирования; выходы НА количественно определяют с помощью двух методов: ОФ-ВЭЖХ и НА-ELISA. Полученные результаты представлены на фиг. 13 и 14. Данные, представленные на фиг. 13, показывают, что BYF589 в дозе 0,005 мкМ приводит примерно к 37% увеличению выхода по сравнению с контролем без ДМСО, как измерено с помощью НА-ВЭЖХ. Данные, представленные на фиг. 14, показывают, что при определенных условиях AFZ077 не дает значительного повышения выхода НА по сравнению с контролем в любой из испытанных доз для штамма В/Массачусетс в системе Ambr250. Примечательно, что значения ошибок представляют одно стандартное отклонение от среднего значения и иллюстрируют вариабельность НА-ELISA анализа при повторах эксперимента.

Пример 13. Механистически связанные соединения (функциональные эквиваленты).

Установлено, что повышающее действие AFZ077 на выход НА гриппа зависит от снижения активности рецептора 5HT7, поскольку AFZ эффекты могут аннулироваться при добавлении серотонина (5HT) в качестве лиганда (фиг. 15). Это свидетельствует о том, что такие эффекты опосредуются активностью рецептора, показывая, что другие реагенты, которые способны опосредовать такие же или подобные клеточные эффекты, могут повышать выход белка так же, как и соединения-лидеры. Исследования соединений формулы 8 (например, соединения Е) проводят для выявления потенциальных соединений, которые могут совместно использовать определенные механизмы действия, как представлено в табл. 5.

Таблица 5

СОЕДИНЕНИЕ	СВЯЗЫВАЮЩИЕ АКТИВНОСТИ	СТРУКТУРА
Соединение Е (контрольное соединение) NVP-AFZ077 (SB-258741)		

Соединение <u>K</u> NVP-AHL128		
Соединение <u>L</u> Клозапин	D2, 5-HT2A, 5-HT1A, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT6, 5-HT7, D1, D3, D4, a1, a2, M1, H1	
Соединение <u>M</u> Рисперидон	D2, 5-HT2A, 5-HT7, a1, a2	
Соединение <u>N</u> NVP-XCD714 SB-269970		
Соединение <u>O</u> Кветиапин	D2, 5-HT2A, 5-HT6, 5-HT7, a1, a2, H1	
Соединение <u>P</u> Суматрипан		
Соединение <u>Q</u> NVP-ARP341		

Результаты сравнительного исследования для оценки относительных выходов НА представлены на фиг. 16. Некоторые из этих кандидатов были дополнительно протестированы на их способность увеличивать выход НА относительно AFZ077 (фиг. 17).

Дополнительные SAR исследования проводят для дальнейшей идентификации соединений-кандидатов, способных повышать выход. 165 аналогов испытывают в концентрации 0,05 мкМ в 10 мл вирусных культур со штаммом H3N2. BYF589 повышает выход по сравнению с контролем "без соедине-

ния" (ДМСО) в ~2 раза. 14 из 165 выявленных в результате скрининга соединений также повышают выход НА, как и ВУF589, или превосходят его при тестируемой концентрации. Выявлены аналоги, которые примерно в 2 раза превосходят ВУF589.

Пример 14. Усиление экспрессии рекомбинантного белка.

Для дальнейшей оценки общей применимости соединений, выявленных в исследованиях выхода НА, одно из соединений-лидеров, ВУF589, тестируют на экспрессию рекомбинантного белка с помощью гетерологичных клеток. В частности, в исследование включены белки, которые, как ранее было установлено, трудно экспрессируются в НЕК293 клетках и которые упоминаются как белки "низких выходов". В типичной оптимизированной системе низкие выходы определяются как выходы 5 мг/л или менее. Для экспериментов отбирают примерно 20 конструкторов целевых белков с типичными выходами в интервале 2-10 мг/л. Они секретируются белками млекопитающих, которые представляют собой усеченные версии аналогов полной длины. Каждый конструктор (в варианте вектора pRS5a) содержит по меньшей мере одну метку (например, по меньшей мере С-концевой FlagHis в дополнение к тому, что многие являются слитыми N- или С-терминально с мышинным IgG1 Fc). Для снижения систематических ошибок выбирают примерно равные количества метки каждого типа.

Все мишени с выходом <1 или >10 мг/л удаляют. Затем мишени сортируют по типу метки. Наконец, если это выглядит как представление определенного диапазона молекулярной массы, несколько "дубликатов" удаляют. Затем для выбора образцов первые 6-7 из меток каждого типа включают без дополнительных критериев отбора. Полученный список мишеней представлен ниже.

Соединение ВУF589 растворяют в ДМСО для получения конечного рабочего раствора с концентрацией 70 мкМ (1000×).

В тестировании используют клетки НЕК293 Freestyl (Life Technologies), которые могут отслеживаться от Главного банка клеток с небольшим количеством пассажей (low-passage Master Cell bank) до получения продукта. Клетки выращивают в НЕК293F средах в высокопроизводительных (UltraYield) колбах Томсона объемом 2,5 л при разведении до 0,2 млн клеток/мл и в течение 3 дней дважды дают им возможность достигать плотности 1,5 млн клеток/мл. Затем перед трансфекцией клетки аликвотируют в стандартные колбы Корнинга с завинчивающимися крышками объемом 1 л при объеме заполнения 300 мл. Для каждой мишени в одну колбу добавляют 300 мкл ВУF589, а в другую - нет. Затем клетки трансфицируют PEI плазмидным комплексом, полученным следующим образом: максипрепарат плазмиды оттаивают, смешивают, затем указанный объем добавляют в 293F среду. Исходный раствор с концентрацией 2 мг/мл линейного PEI с ММ 25000 (Polysciences #23966-2) разбавляют до концентрации 1 мг/мл с помощью 293F среды, затем указанный объем добавляют к плазмидной ДНК, перемешивают с помощью инверсии, а затем оставляют стоять на 2-10 мин. После этого равный объем смеси PEI/ДНК добавляют в каждую из двух колб (одна с соединением, другая без соединения), которые затем энергично закручивают, возвращают в шейкер и инкубируют при 37°C со встряхиванием со скоростью 120 об/мин и 8% CO₂ (те же условия, что при выращивании, описанном выше). Используемые количества отражают ранее оптимизированные условия, при которых (на 1 л) используют 400 мкг плазмиды в 1,6 мл среды плюс 3,2 мл 1 мг/мл PEI.

Отбирают небольшие образцы среды супернатантов (Filipp Gortalum) и анализируют их с помощью Octet. Соотношение между исходным выходом необработанных клеток и соотношением выхода от обработанных и необработанных клеток.

Клеточные суспензии загружают в колонку со смолой Ni-NTA в соответствии со стандартным протоколом. Используют метод очистки на основе имидазола, который хорошо известен в данной области техники. Предварительный анализ выхода белка выполняют с помощью ВСА анализа, результаты которого затем подтверждают LC90 электроферограммой.

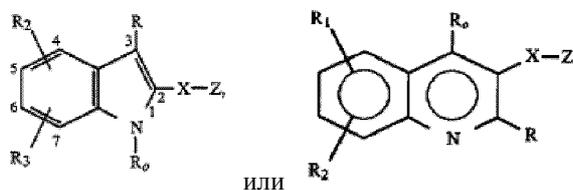
Результаты экспериментов представлены на фиг. 18. График слева (фиг. 18А) показывает взаимосвязь между выходом белка в присутствии и в отсутствие соединения ВУF589 (при 70 нМ). Каждая точка данных на графике представляет 20 протестированных мишеней. График показывает тенденцию способности соединения увеличивать выход белка, хотя и в разной степени. График справа (фиг. 18В) представляет кратность повышения выхода белка как функцию исходного выхода (без обработки соединением). Он показывает общую тенденцию, что выходы белков, уже производимых с высокими выходами ("белки высоких выходов"), далее не увеличиваются за счет присутствия соединения, в то время как экспрессии белков низких выходов более вероятно могут быть повышены с помощью соединения. Среди 20 протестированных белков все белки с выходом примерно <4 мг/л показывают по меньшей мере 1,5-кратное увеличение выхода при обработке соединением ВУF589 в условиях испытания. В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что испытанное соединение показывает общий эффект повышения выхода белка для широкого спектра белков.

Таблица 6

НАЗВАНИЕ ОБРАЗЦА	ID БЕЛКА	ID КЛОНА	выход (мг/л)	Штрих-код	Природная нерасщепленная ММ
HEK293-pRScFchAMBER-NP_000871-1-hum-177-26-177	411251	52985	2,9	152501069	44762
HEK293-pRScFchAMBER-NP_001005609-hum-389-62-389	411269	78290	7,6	152501061	62057
HEK293-pRScFchAMBER-NP_001165099-hum-147-28-147	411270	95023	5,9	152501016	41375
HEK293-pRScFchAMBER-NP_001936-hum-208-20-162	411274	69558	5,2	152501037	43347
HEK293-pRScFchAMBER-NP_003109-hum-303-18-303	411272	75329	9,6	152501064	60073
HEK293-pRScFchAMBER-NP_005082-hum-196-22-196	411263	71090	1,3	152501035	46810
HEK293-pRScFchAMBER-NP_006110-hum-215-23-215	411255	69518	2,4	152501071	49765
HEK293-pRShAMBER\$-NP_000197-hum-369-21-256	410882	61566	1,5	152501363	29825
HEK293-pRShAMBER\$-NP_000708-hum-312-20-293	410900	66255	6,0	152501343	33228
HEK293-pRShAMBER\$-NP_001833-hum-372-23-360	410890	61451	6,8	152501358	38526
HEK293-pRShAMBER-NP_000651-hum-390-30-390	410925	73898	6,8	152501341	43310
HEK293-pRShAMBER-NP_001652-hum-255-1-186	410914	87808	2,0	152501344	21920
HEK293-pRShAMBER-NP_036599-hum-321-20-261	410917	97222	1,6	152501305	29919
HEK293-pRShFchAMBER\$-NP_000726-1-hum-116-25-116	411264	59201	4,7	152501238	37581
HEK293-pRShFchAMBER\$-NP_002334-2-hum-711-20-711	411267	63498	6,9	152501240	103704
HEK293-pRShFchAMBER\$-NP_006265-1-hum-98-22-98	410906	64998	2,1	152501247	36175
HEK293-pRShFchAMBER\$-NP_006705-1-hum-453-23-453	411275	59221	4,2	152501239	76279
HEK293-pRShFchAMBER-NP_000132-hum-821-27-378	410938	77435	4,1	152501274	66440
HEK293-pRShFchAMBER-NP_000445-hum-154-1-154	410913	95263	7,6	152501313	43311
HEK293-pRShFchAMBER-NP_001423-hum-169-33-118	410903	77637	1,0	152501312	36962

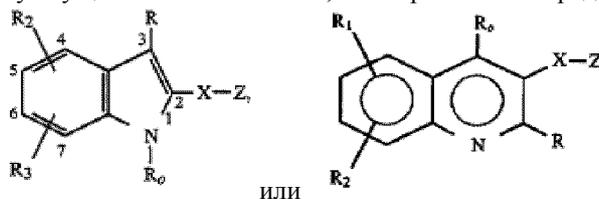
Варианты осуществления изобретения

1. Способ получения терапевтических, профилактических или диагностических биологических молекул в системе клетки-хозяина, включающий контактирование системы клетки-хозяина по меньшей мере с одним химическим реагентом, выбранным из табл. 1-5.
2. Способ по варианту осуществления 1, в котором система клетки-хозяина представляет собой культуру клеток или куриное яйцо с развивающимся эмбрионом.
3. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором культура клетки выбрана из группы, включающей клетки MDCK, Vero, ВНК, EB66 или CHO.
4. Способ по варианту осуществления 1, в котором химический реагент представляет собой статин или его аналог или лиганд серотонинового рецептора с конечной концентрацией от 0,0001 до 10 мкМ.
5. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором концентрация химического реагента составляет 0,05 мкМ или менее и его структура соответствует следующим формулам:



6. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором система клетки-хозяина инфицирована вирусом.
7. Способ по варианту осуществления 6, в котором химический реагент добавлен одновременно с инокуляцией вирусом клетки-хозяина.
8. Способ по варианту осуществления 7, в котором вирус представляет собой вирус гриппа.
9. Способ по варианту осуществления 8, в котором биологическая молекула, продуцируемая системой клетки-хозяина, выбрана из частицы вируса гриппа, расщепленного вириона вируса гриппа или гликопротеина вируса гриппа.
10. Способ по варианту осуществления 9, в котором гликопротеин вируса гриппа представляет собой гематтуктинин.
11. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором выход продуцируемой биологической молекулы повышается по меньшей мере в 2 раза по сравнению с контролем, как измерено с помощью ELISA.
12. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором аналог статина выбран из группы, включающей флувастатин, питавастатин, аторвастатин, церивастатин, ловастатин, мевастатин, правастатин или их изомеры.
13. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором химический реагент представляет собой флувастатин или питавастатин или их изомеры.
14. Способ получения терапевтического, профилактического или диагностического белка вируса гриппа в культуре клеток, включающий контактирование культуры клеток по меньшей мере с одним статинным соединением или его аналогом в концентрации от 0,05 мкМ или меньше.
15. Способ получения терапевтического, профилактического или диагностического белка в культуре клеток, отличающийся тем, что получение проводится в присутствии по меньшей мере одного статина или его производного, отличного от симвастатина, в котором белок получают по меньшей мере с 1,5-кратным повышением по сравнению с контролем, как измерено с помощью ELISA.

16. Способ по варианту осуществления 14 или 15, в котором статин представляет собой



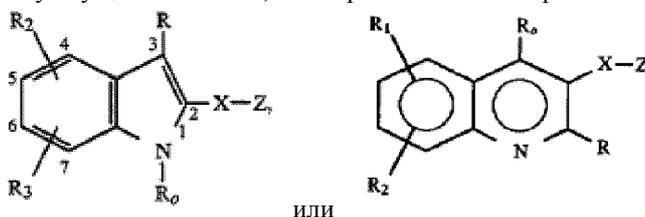
и их аналоги.

17. Способ по варианту осуществления 16, в котором аналог статина выбран из группы, включающей флувастатин, питавастатин, аторвастатин, церивастатин, ловастатин, мевастатин, правастатин или их изомеры.

18. Способ по варианту осуществления 17, в котором аналог статина представляет собой флувастатин или питавастатин или их изомеры.

19. Способ получения штамма вируса гриппа В в клетке-хозяине, включающий контактирование клетки-хозяина с химическим реагентом в концентрации 0,05 мкМ или менее, который повышает выход по меньшей мере 5 раз, как измерено с помощью ELISA.

20. Способ по варианту осуществления 19, в котором химический реагент представляет собой



или и их аналоги.

21. Способ по варианту осуществления 19 или 20, в котором производят штамм вируса гриппа В, расщепленный вирион вируса гриппа В или гликопротеин вируса гриппа В.

22. Способ по варианту осуществления 21, в котором гликопротеин вируса гриппа В представляет собой гемагглютинин.

23. Способ получения терапевтических, профилактических или диагностических биологических молекул из клетки-хозяина, включающий:

(а) способ по любому из предыдущих вариантов осуществления,

(б) технологическую обработку полученной молекулы в конечный терапевтический, профилактический или диагностический продукт.

24. Способ получения вакцины против гриппа, в котором осуществляются следующие стадии:

а) выращивание вируса в среде, содержащей культуру клеток и по меньшей мере один химический реагент, выбранный из табл. 1;

б) обработка вируса для получения стерильной вакцины.

25. Способ получения вакцины гриппа В, в котором осуществляются следующие стадии:

а) выращивание вируса в среде, содержащей культуру клеток и по меньшей мере один химический реагент для получения по меньшей мере 1,5-кратного увеличения выхода вируса гриппа В по сравнению с контролем, как измерено с помощью ELISA;

б) обработка вируса для получения стерильной вакцины.

26. Способ по вариантам осуществления 23-25, в котором химические реагенты выбраны из табл. 1 или 3.

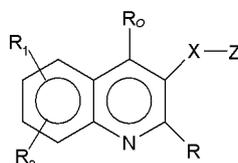
27. Способ получения вакцины против гриппа, в котором проводят следующие стадии:

а) выращивание вируса в культуре клеток в присутствии статинового реагента в концентрации 0,05 мкМ или меньше;

б) обработка вируса для получения стерильной вакцины.

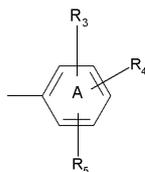
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения терапевтических, профилактических или диагностических рекомбинантных белков и вирусных частиц в системе клетки-хозяина, включающий контактирование системы клетки-хозяина с химическим реагентом формулы 2



имеющим конечную концентрацию от 0,001 до 10 мкМ,

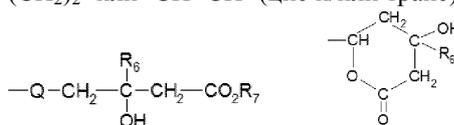
где каждый из R и R₀ представляет собой независимо первичный, вторичный или третичный



C₁₋₆алкил, C₃₋₇циклический алкил или кольцо A

каждый R₁, R₂, R₃, R₄ и R₅ представляет собой независимо водород, C₁₋₄алкил, C₁₋₄алкокси, трифторметил, фтор, хлор, фенокси, бензилокси или гидроксигруппы при условии, что не более чем один из R₁ и R₂ представляет собой трифторметил, не более чем один из R₁ и R₂ представляет собой фенокси, не более чем один из R₁ и R₂ представляет собой бензилокси, не более чем один из R₁ и R₂ представляет собой гидроксигруппы, не более чем один из R₃₋₅ является трифторметилом, не более чем один из R₃₋₅ является гидроксигруппой;

X представляет собой -(CH₂)₂- или -CH=CH- (цис и/или транс);



Z представляет собой

где Q представляет собой  или  при условии, что Q может представлять собой



, только когда X представляет собой -CH=CH- и/или R₆ представляет собой C₁₋₃алкил, R₆ представляет собой водород или C₁₋₃алкил, R₇ представляет собой водород, R₈ или M, где R₈ представляет собой физиологически приемлемую и гидролизуемую сложноэфирную группу, а M представляет собой фармацевтически приемлемый катион.

2. Способ по п.1, в котором система клетки-хозяина представляет собой культуру клеток или куриное яйцо с развивающимся эмбрионом.

3. Способ по любому из пп.1, 2, в котором культура клетки выбрана из группы, включающей клетки MDCK, Vero, ВНК или СНО.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором концентрация указанного химического реагента составляет от 0,5 до 50 нМ.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором систему клетки-хозяина инфицируют вирусом.

6. Способ по п.5, в котором химический реагент добавляют одновременно с инокуляцией вирусом клетки-хозяина.

7. Способ по п.5, в котором вирус представляет собой вирус гриппа.

8. Способ по п.7, в котором указанный рекомбинантный белок или указанная вирусная частица, производимая системой клетки-хозяина, выбраны из частиц вируса гриппа, расщепленного вириона вируса гриппа или гликопротеина вируса гриппа.

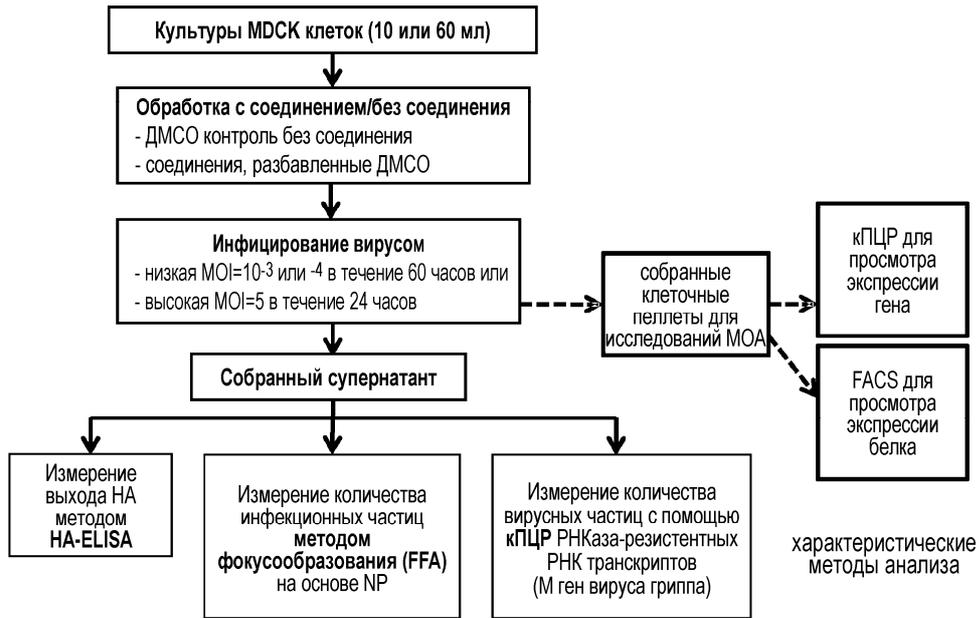
9. Способ по п.8, в котором гликопротеин вируса гриппа представляет собой гемагглютинин.

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором выход продуцируемого(ой) указанного рекомбинантного белка или указанной вирусной частицы повышен по меньшей мере в 1,5 раза по сравнению с контролем, как измерено с помощью ELISA.

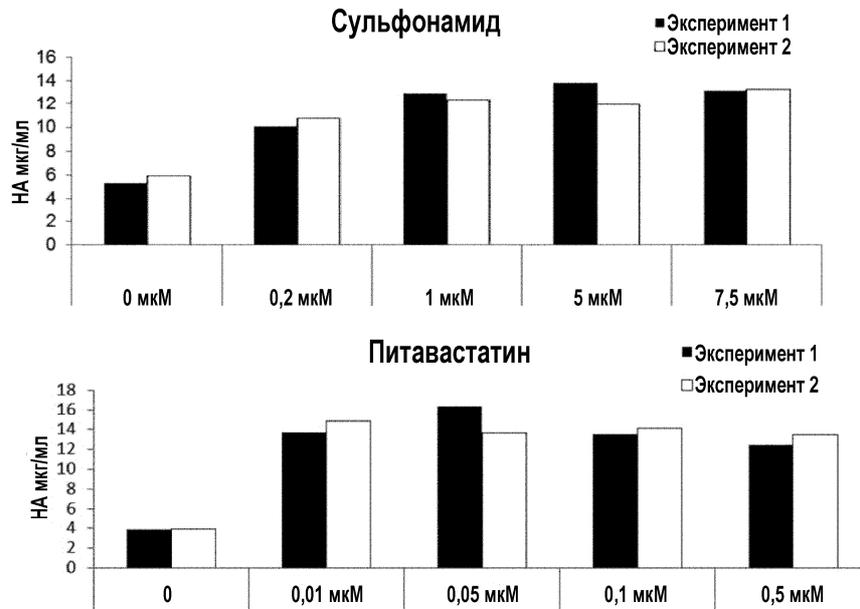
11. Способ по любому из пп.1-10, в котором указанный химический реагент представляет собой пивастатин или его изомеры.

12. Способ по п.1, в котором указанный рекомбинантный белок представляет собой белок вируса гриппа, указанная система клетки-хозяина представляет собой культуру клеток, а концентрация указанного химического реагента составляет от 0,5 до 50 нМ.

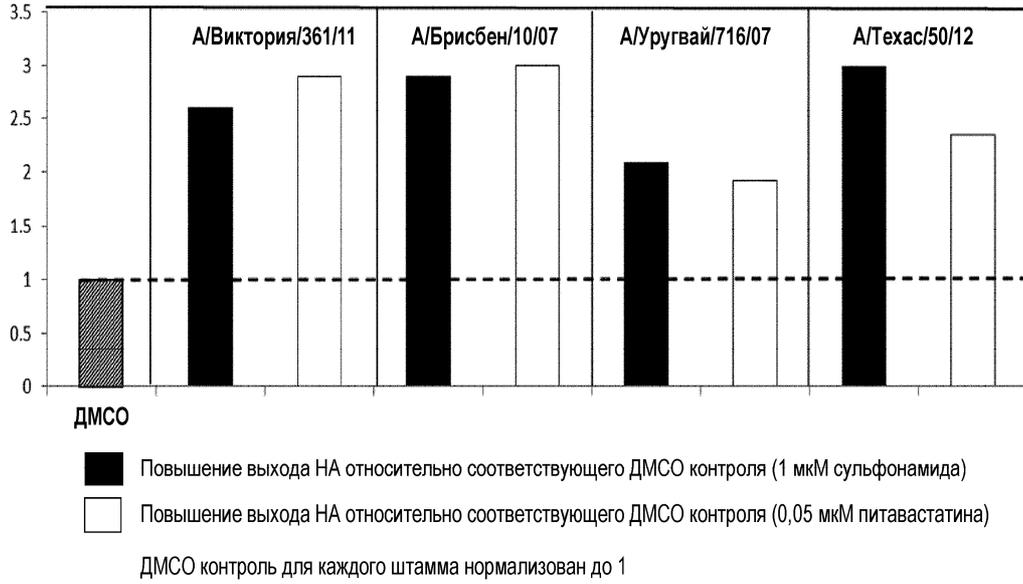
13. Способ по п.1, в котором указанная система клетки-хозяина представляет собой культуру клеток, а указанный рекомбинантный белок получают по меньшей мере с 1,5-кратным повышением по сравнению с контролем, как измерено с помощью ELISA.



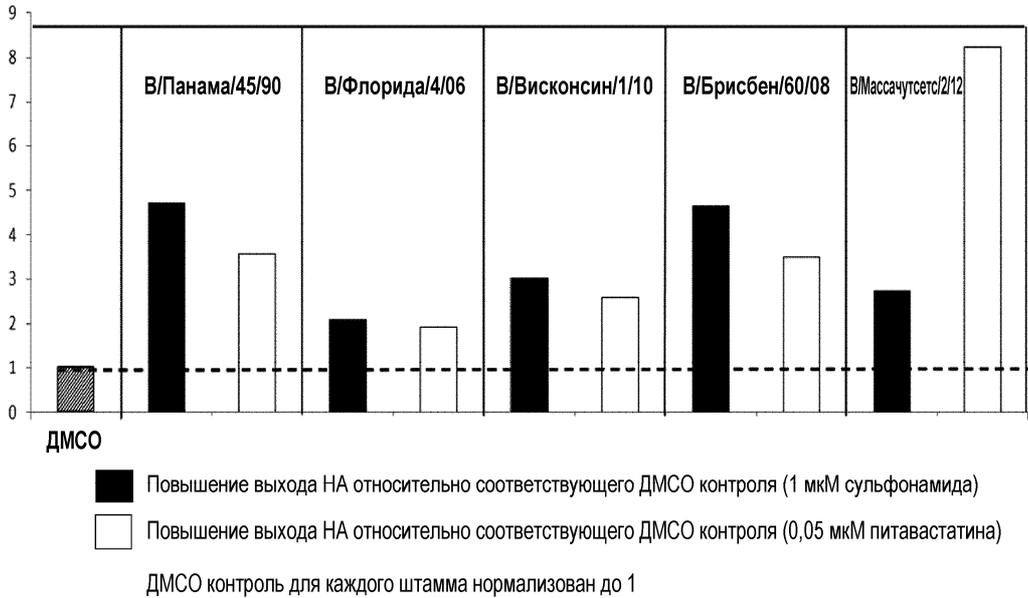
Фиг. 1



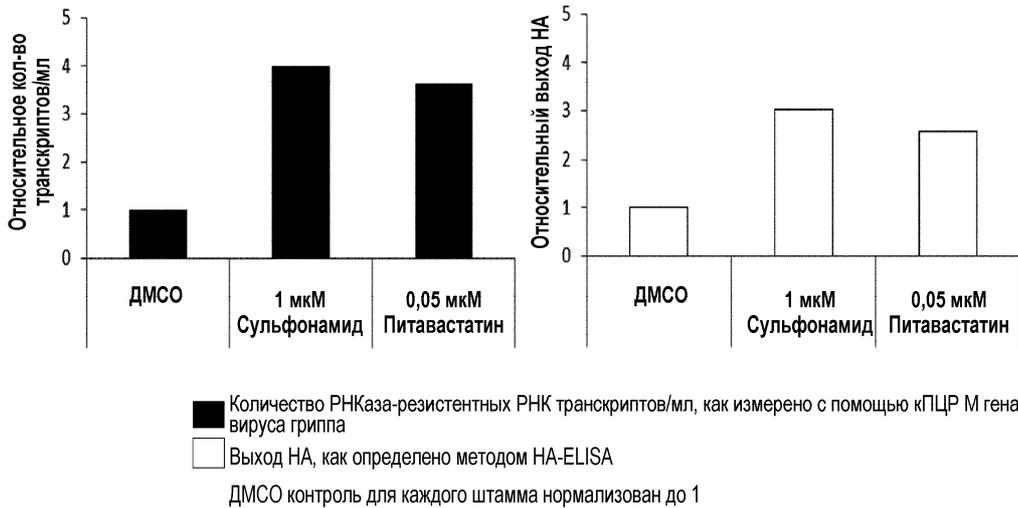
Фиг. 2



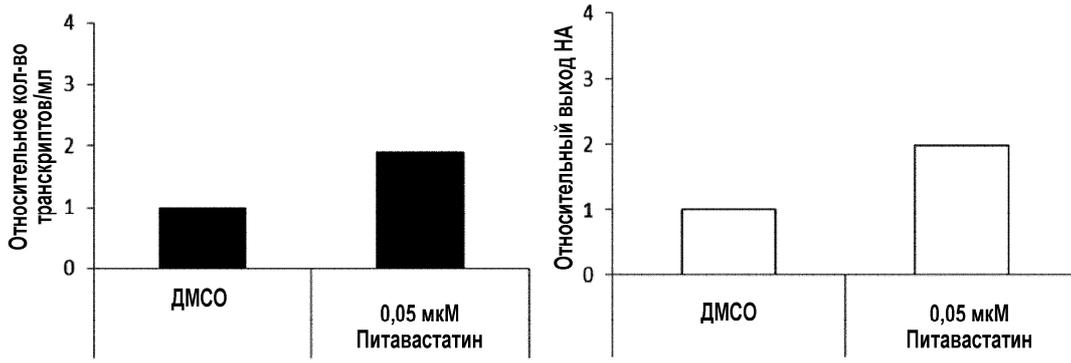
Фиг. 3



Фиг. 4

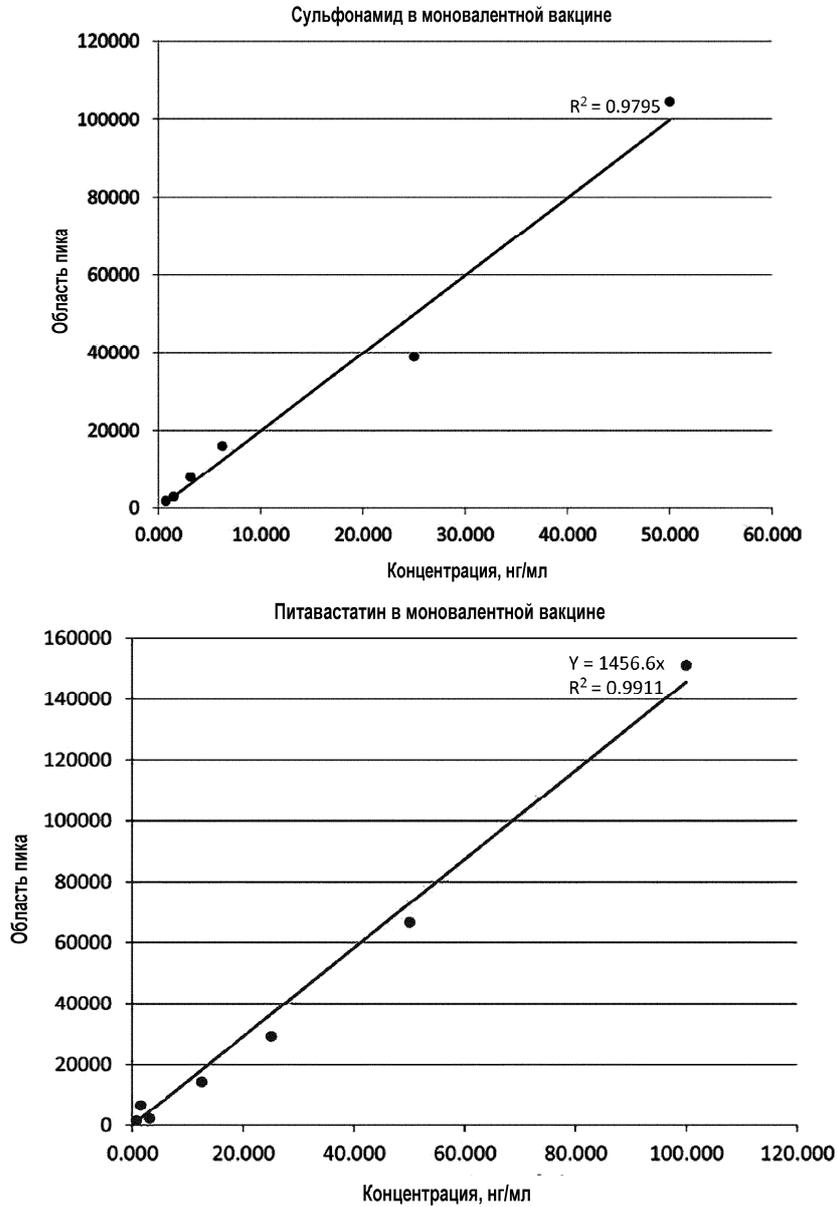


Фиг. 5А



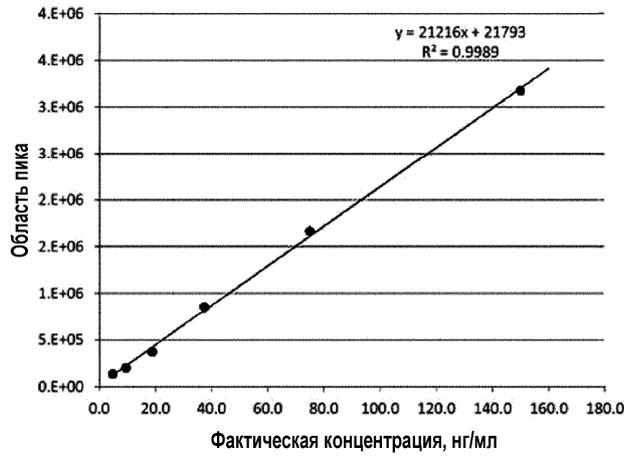
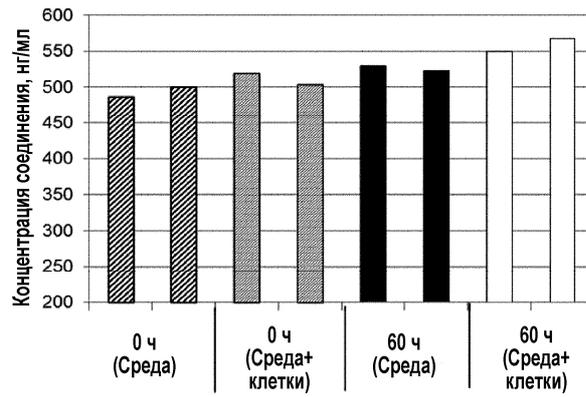
Количество РНКаз-резистентных РНК транскриптов/мл, как измерено с помощью кПЦР М гена вируса гриппа
 Выход НА, как определено методом НА-ELISA
 ДМСО контроль нормализован до 1

Фиг. 5В

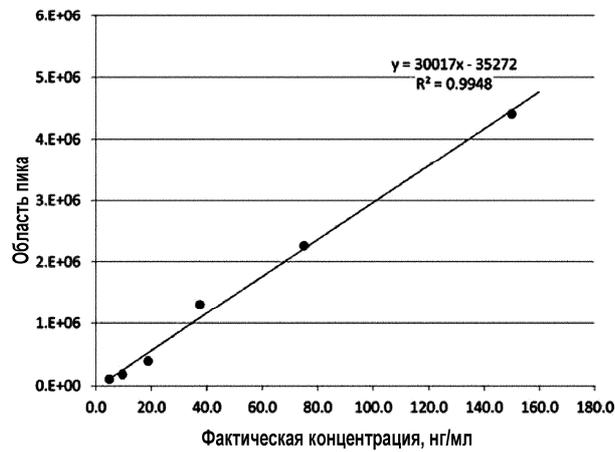
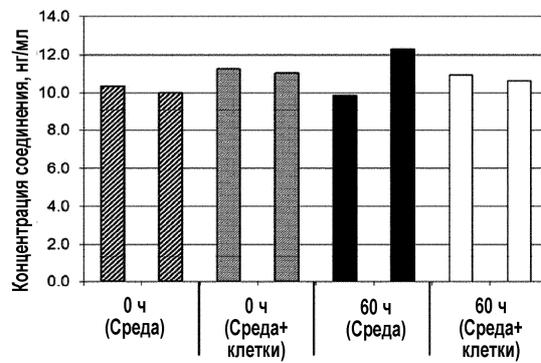


Фиг. 6А

Сульфонамид



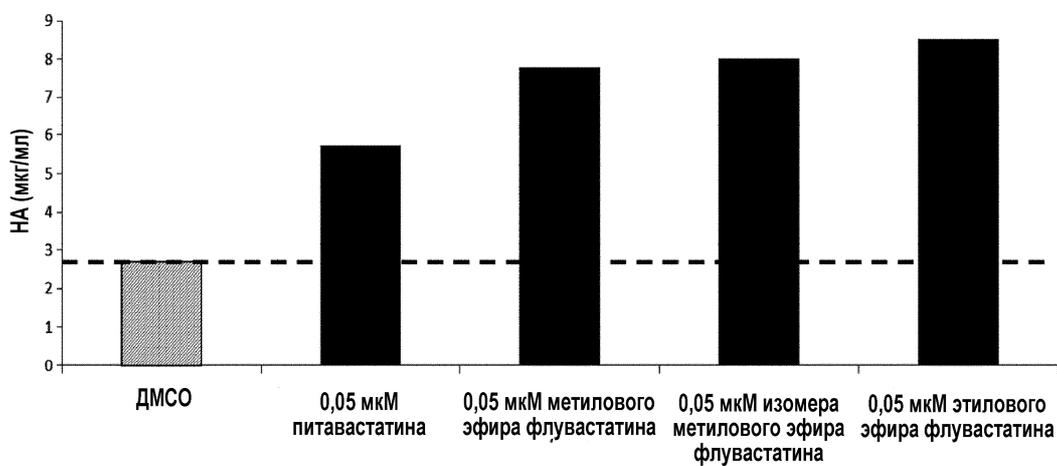
Питавастатин



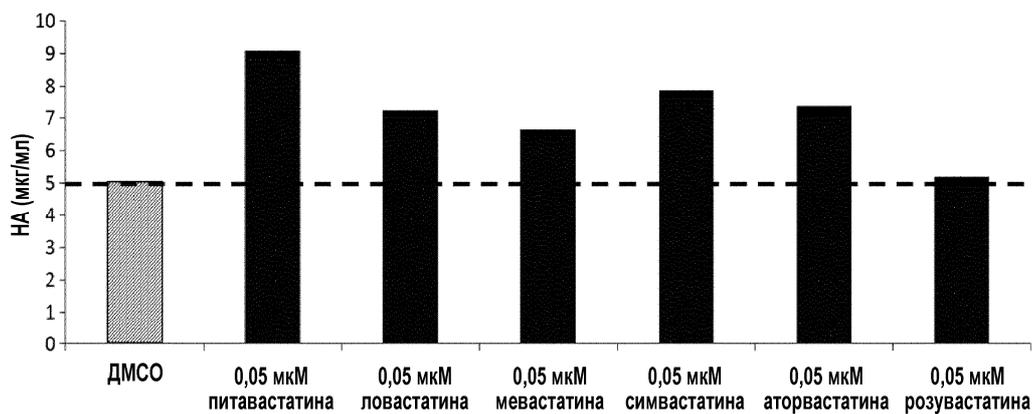
Фиг. 6В

Штамм вируса гриппа	Лекарственное средство	Стадия процесса	Концентрация (нг/мл)	Общее количество лекарственного средства (нг/мл)	% лекарств. ср-ва (исходя из количества до очистки, нормализованного как 100%)
Flu A	Питавастатин	До очистки	15.53	528.02	100
Flu A	Питавастатин	После очистки	0.176	0.88	0.167
Flu B	Питавастатин	До очистки	20.2	686.8	100
Flu B	Питавастатин	После очистки	0.34	1.7	0.248
Flu A	Сульфонамид	До очистки	344.58	11715.72	100
Flu A	Сульфонамид	После очистки	2.246	11.23	0.096
Flu B	Сульфонамид	До очистки	679	23086	100
Flu B	Сульфонамид	После очистки	1.968	9.84	0.043

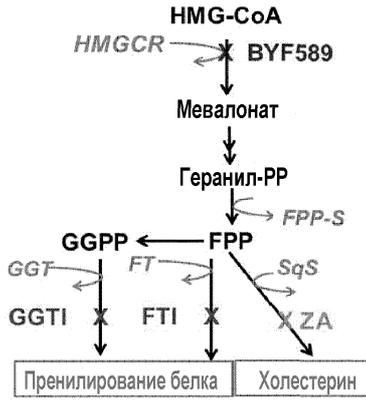
Фиг. 6С



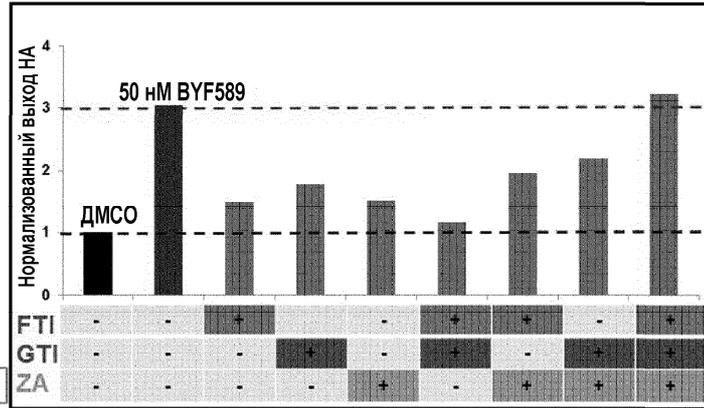
Фиг. 7



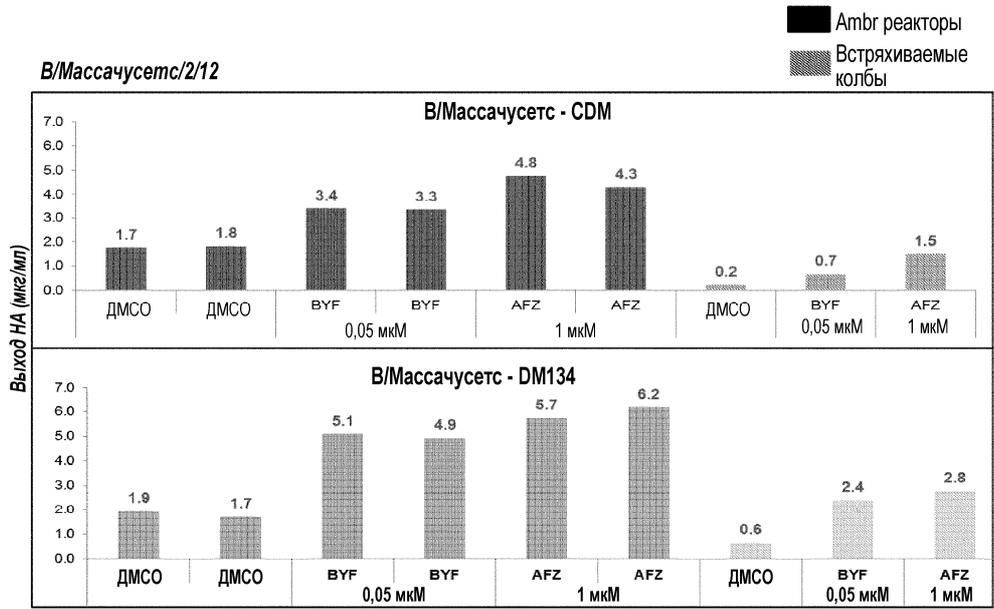
Фиг. 8



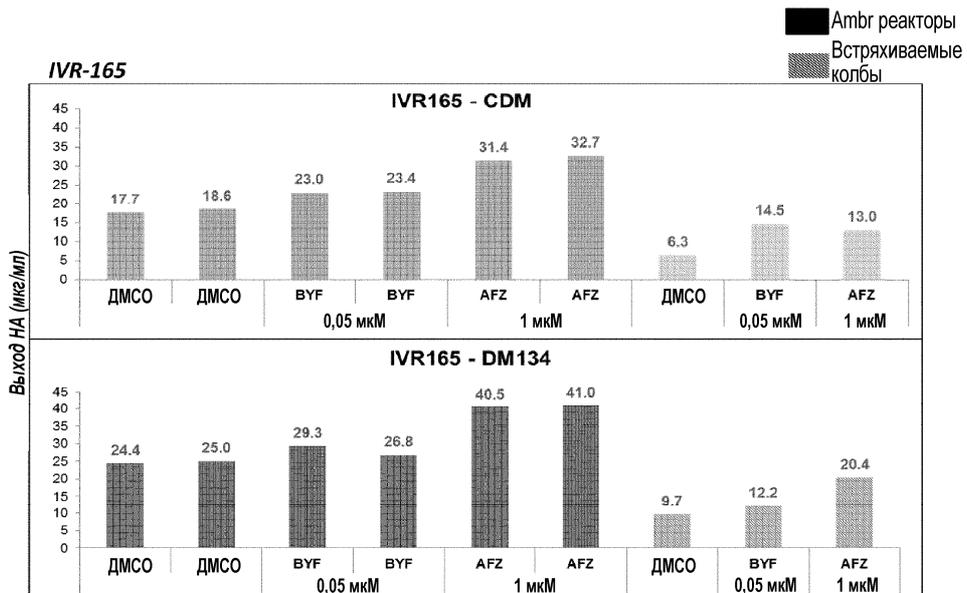
Фиг. 9А



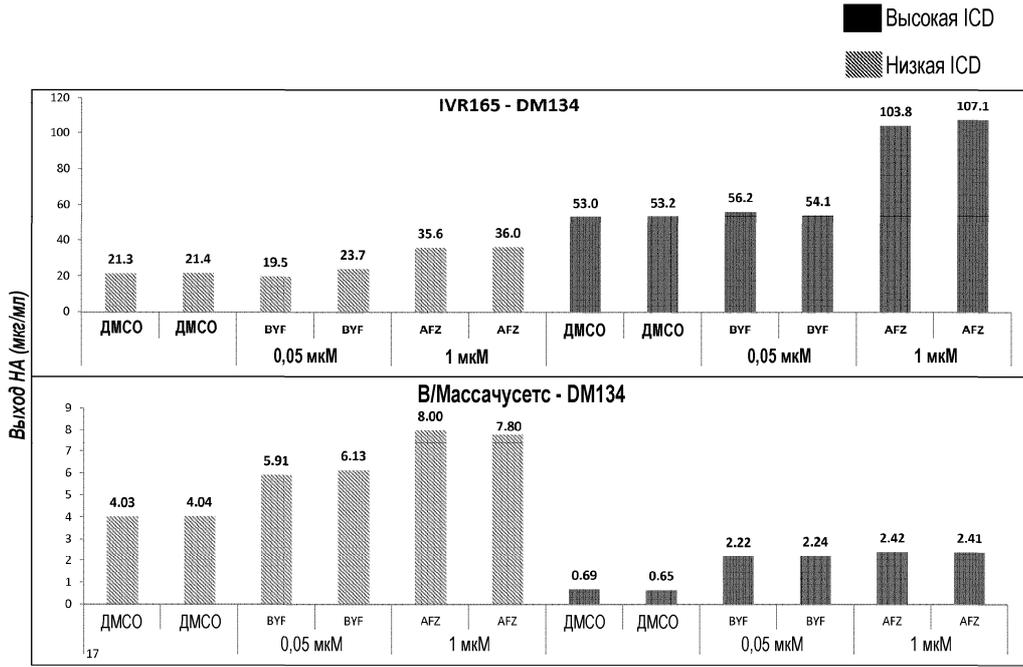
Фиг. 9В



Фиг. 10

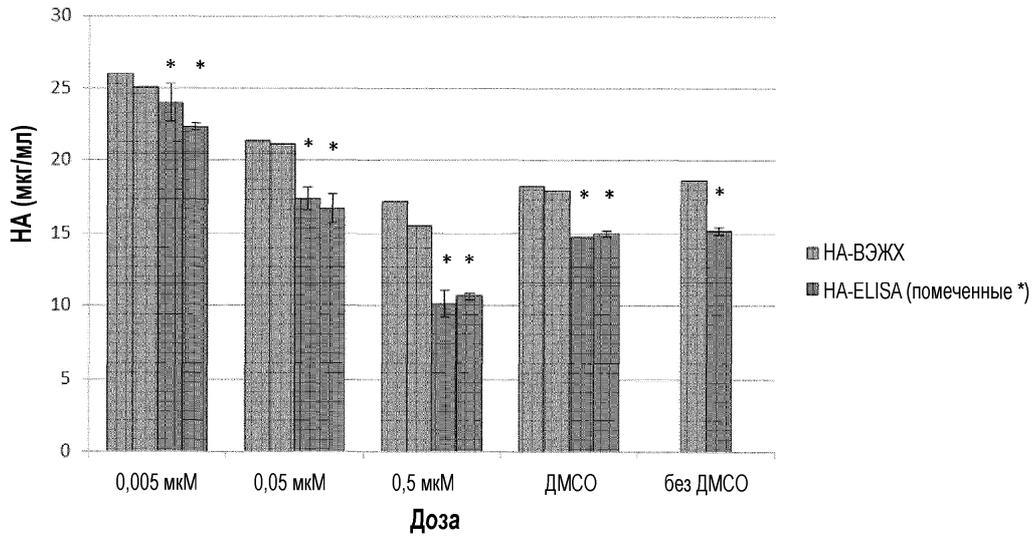


Фиг. 11

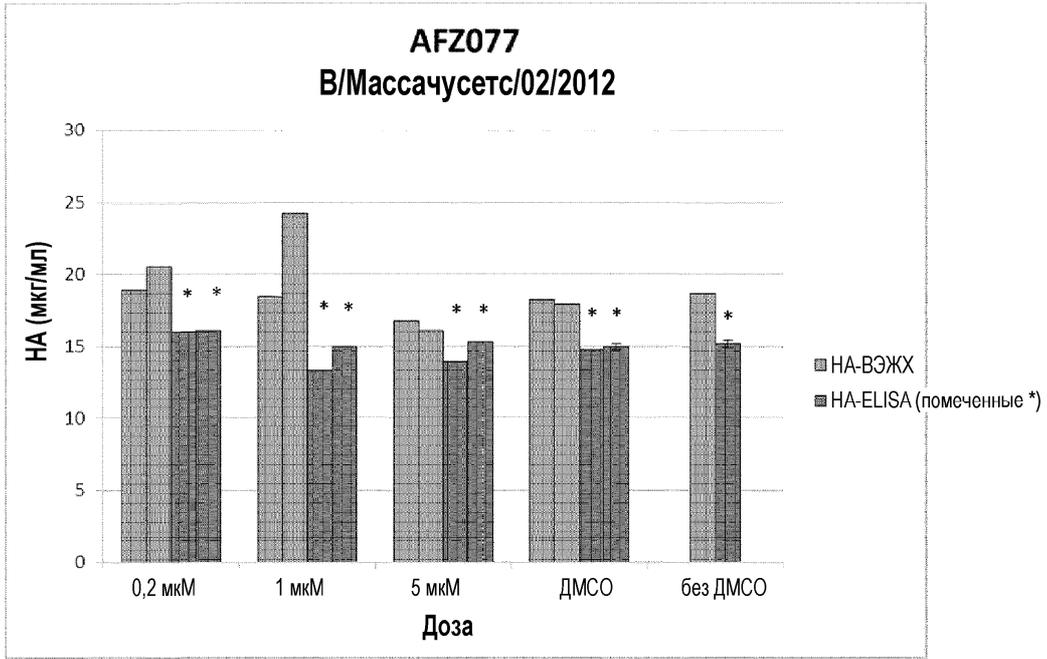


Фиг. 12

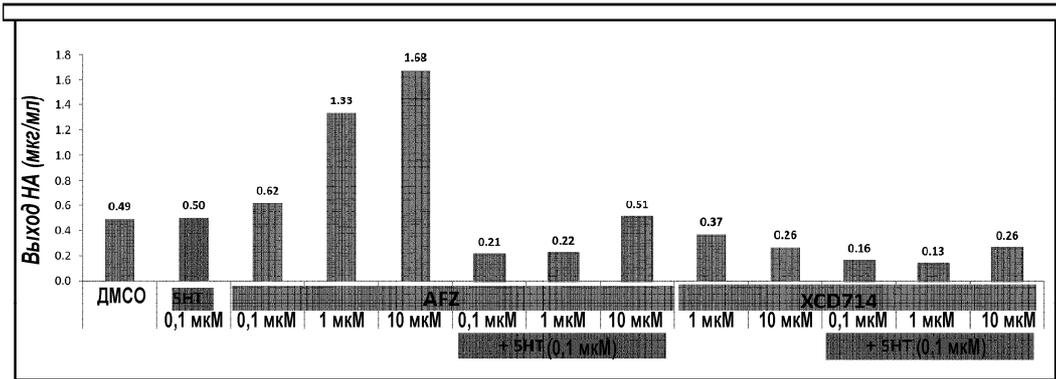
ВУФ589
В/Массачусетс/02/2012



Фиг. 13



Фиг. 14

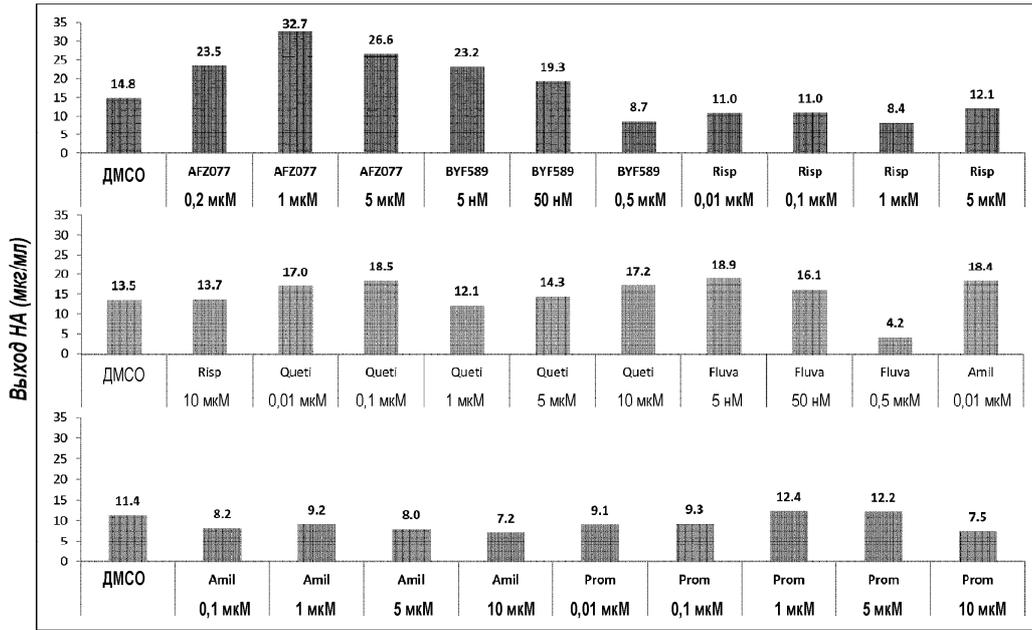


5HT = серотонин (агонист 5HT7 рецептора)

XCD714 = SB269970 соединение, которое является наиболее надежным обратным агонистом 5HT7 рецептора

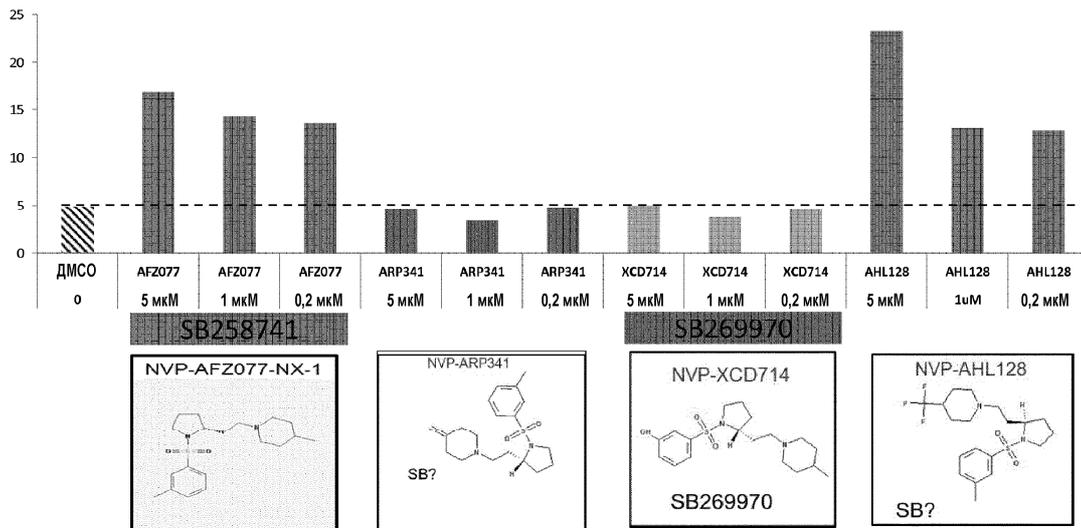
AFZ = SB258741 соединение, которое является частичным обратным агонистом 5HT7 рецептора

Фиг. 15

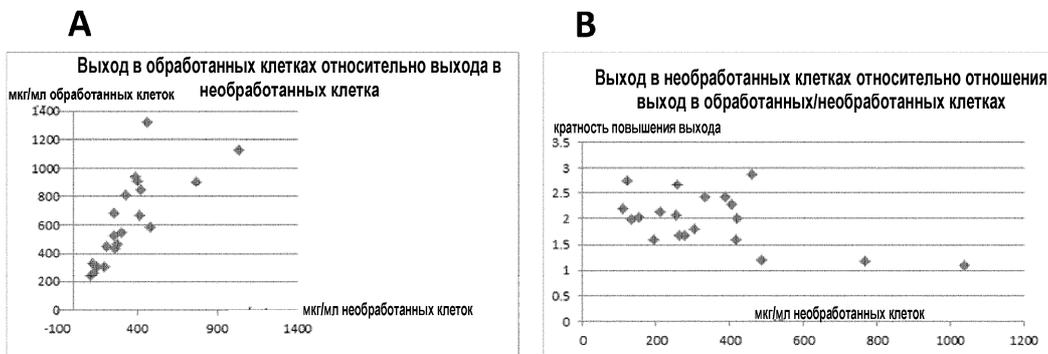


Risp=Рисперидон; Queti=Кветиапин; Fluva=Флувастатин; Amil=Амилорид; Prom=Прометазин

Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18