

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037238

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.25

(21) Номер заявки
201691542

(22) Дата подачи заявки
2015.01.29

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)

(54) ПЕРФУЗИОННАЯ СРЕДА

(31) 61/933,665

(32) 2014.01.30

(33) US

(43) 2016.12.30

(86) PCT/US2015/013524

(87) WO 2015/116820 2015.08.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КОХЕРУС БАЙОСАЙЕНСИС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Пухач Эла, Грив Джеймс Расселл (US)

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

(56) US-A1-20090068705
US-A1-20130224855
US-A1-20130150554
US-A1-20110091936
US-A1-20080108106

(57) Приводится описание перфузионной среды, обеспечивающей превосходную плотность клеток, титр и качество продукта для производства терапевтического белка в перфузионном способе.

037238

B1

037238

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к питательной среде, подходящей для производства терапевтического белка перфузионным способом.

Предпосылки создания изобретения

Белки, такие как предназначенные для фармацевтического применения, могут быть произведены с использованием либо единовременной загрузки, периодическим способом или способом перфузии. Настоящее изобретение направлено на перфузионные способы, включая те, что используются для производства терапевтических белков.

Перфузионные способы производства терапевтических белков чувствительны к изменениям состава культуральной среды, температуры, к накоплению метаболитических отходов, а также к физико-химическим параметрам биореактора. Несоответствующие или колеблющиеся условия влияют на белковые посттрансляционные модификации, такие как гликопрофиль, который, как известно, коррелирует с фармакокинетическими свойствами.

Использование перфузионного способа более целесообразно в сравнении с периодическим производством, поскольку первый позволяет получать больше продукта в течение определенного периода времени при меньшей стоимости товаров. Следовательно, требуется преодолеть проблемы разработки подходящих питательных условий, которые поддерживают перфузионный способ.

В патентном документе с номером U.S. Patent 7300773 и патентном документе с номером EP 1781802 приводится описание производства слитого белка TNFR-IG с использованием периодического процесса, в котором питательной среде предписаны заданные концентрации аминокислот и/или неорганических ионов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен график плотности жизнеспособных клеток (ПЖК) культур с низкой концентрацией питательных веществ (прогоны SF3 и SF4) в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 2 представляет собой график ПЖК культур, содержащих более высокообогащенную питательную среду.

Фиг. 3 представляет собой график уровней содержания аммиака в культурах, содержащих более высокообогащенную питательную среду.

Фиг. 4 представляет собой гистограмму производства белка в пониженной питательной среде и в более высокообогащенной питательной среде.

Фиг. 5 представляет собой изображение изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в геле, которое содержит распределение заряженных частиц базальной среды под торговым названием SFM4CHO, дополненной двумя различными концентрациями питательной среды под торговым названием Cell Boost 5, таких же как в коммерческом этанерцепте (продукт под наименованием ENBREL®).

Фиг. 6 представляет собой график ПЖК культур, содержащих 10 и 20% добавки CHOZN.

Фиг. 7 также представляет собой график ПЖК культур, содержащих 10 и 20% добавки CHOZN.

Фиг. 8 представляет собой изображение геля ИЭФ, который содержит распределение изоформ в продукте, выделенном из культур, содержащих 10 и 20% питательных сред, так же как в эталонном стандарте.

Фиг. 9 представляет собой гистограмму производства белка в культурах, содержащих упрощенную (10%) и обогащенную (20%) питательные концентрации.

Фиг. 10 представляет собой ПЖК и жизнеспособность культуры, выращенной согласно описанию в примере 7.

Сущность изобретения

Нами выявлено, что среда, используемая в перфузионном способе, должна быть существенно менее насыщенной с точки зрения содержания питательных веществ, в частности, с точки зрения содержания аминокислот, чем среда, предназначенная для использования в способе с единовременной загрузкой или в периодическом способе. Для целей настоящего изобретения под содержанием питательных веществ следует понимать концентрацию указанных питательных веществ в объеме перфузионного реактора. В частности, данное изобретение относится к способу, в котором перфузионный способ проводят в присутствии питательной среды с суммарной концентрацией аминокислот меньше или равной 70 мМ и предпочтительно в диапазоне приблизительно от 15 до 65 мМ. В различных вариантах исполнения настоящего изобретения суммарная концентрация аминокислот находится в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из приблизительно от 15 до 20 мМ; приблизительно от 20 до 25 мМ; приблизительно от 25 до 30 мМ; приблизительно от 30 до 35 мМ; приблизительно от 35 до 40 мМ; приблизительно от 40 до 45 мМ; приблизительно от 45 до 50 мМ; приблизительно от 50 до 55 мМ; приблизительно от 55 до 60 мМ; приблизительно от 60 до 65 мМ и приблизительно между 65 и 70 мМ.

Суммарные концентрации аминокислот, прописанные в данном описании, меньше тех, которые рекомендованы как для способа с единовременной загрузкой, так и для перфузионных способов в патентном документе с номером U.S. Patent 7300773. Для сравнения, в патентном документе с номером US Patent 7300773 требуется общая концентрация аминокислот выше 70 мМ. Несмотря на утверждение в патентном документе '773, что такие концентрации могут быть понятны специалистам в данной области

техники как пригодные для использования в перфузионных системах (см. столбец 18, строки 5-11), настоящее изобретение частично основано на нашем открытии, что, напротив, проведение перфузионного способа производства терапевтического белка с помощью питательной среды, удовлетворяющей высоким суммарным концентрациям аминокислот, прописанных в патентном документе '773, приводит к получению значительно заниженных количеств требуемого белка и, следовательно, концентрации аминокислот в средах, предназначенных для перфузии, обязательно должны быть понижены и предпочтительно понижены существенно, с точки зрения суммарной концентрации аминокислот. При условии, что выполнены ограничения по концентрации аминокислот в настоящем изобретении, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что различные неаминокислотные компоненты, обычно используемые в питательной среде (например, витамины, гидролизаты и т.д.), могут быть подобраны опытным путем известным способом без отклонения от сущности и объема настоящего исследования.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения в перфузионном способе производства биологического белка использована питательная среда, удовлетворяющая указанной выше пониженной суммарной концентрации аминокислот, в которой питательная среда дополнительно характеризуется одним или несколькими из следующих критериев: молярное соотношение глутамина и суммарной концентрации аминокислот составляет больше чем 2; молярное соотношение глутамина и суммарной концентрации аминокислот составляет больше чем 0,2; молярное соотношение неорганических ионов к суммарной аминокислоте составляет больше чем 1 и суммарное количество глутамина и аспарагина в единице объема составляет менее 16 мм. Эти критерии следует понимать как обозначающие концентрации и количества устойчивого состояния в сосуде перфузионной реакции.

Наше изобретение также относится к модификации питательной среды, которая в ином случае подходит для производства терапевтического белка периодическим способом, для получения среды, пригодной для использования в перфузионном способе производства белка, в которой модификация включает уменьшение питательной ценности подаваемой среды, такое, что при использовании в перфузионном реакторе суммарная концентрация аминокислот в питательной среде находится в интервале от приблизительно 40 до 95% и предпочтительно от приблизительно 50 до 70% от суммарной концентрации аминокислот подаваемой питательной среды. В предпочтительном варианте данным способом достигается одно или оба из условий: (i) производственный титр, сравнимый с достигаемым при периодическом способе с использованием среды с большей питательной ценностью; и/или (ii) существенное снижение уровня содержания аммиака, который, в любом случае, вырабатывается в перфузионном реакторе, если такой перфузионный процесс проводят с использованием тех же сред, что используют в периодическом способе.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения в перфузионном способе задействованы следующие стадии: (a) подготовка смеси, содержащей клетки, способные экспрессировать требуемый терапевтический белок, и культуральной среды, подходящей для осуществления такой экспрессии; (b) в подходящем сосуде, содержащем смесь, инициирующую производство белка клетками; и (c) периодическое или непрерывное удаление отработанной культуральной среды из реакционного сосуда и добавление свежей культуральной среды в него.

Изобретение может быть применено к производству любого терапевтического белка. В одном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтический белок может быть выбран из любого слитого белка или любого антитела. Слитые белки могут включать в себя TNFR-Fc (иногда упоминаемые как TNFR-Ig). Антитела могут включать в себя антитела к TNF. Другие неограниченные примеры белков, пригодных для изготовления в настоящем изобретении, включают этанерцепт, ритуксимаб, адалимумаб, трастузумаб, бевацизумаб, натализумаб, экулизумаб или лучшие биоварианты таковых. Следует понимать, что перфузионный способ согласно изобретению не ограничен каким-либо конкретным терапевтическим белком. Таким образом, могут быть получены другие белки, отличные от тех, которые упомянуты в данном документе, например эритропоэтины.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение представляет собой способ производства терапевтического белка, включающий следующие стадии: (a) подготовка смеси, содержащей клетки CHO, способные к экспрессии белка, и культуральной среды, подходящей для проведения такой экспрессии; (b) в подходящем сосуде, содержащем смесь, инициирующую производство белка клетками; и (c) периодическое или непрерывное удаление отработанной культуральной среды из и добавление свежей культуральной среды в реакционный сосуд, в котором культуральная среда содержит (i) суммарную концентрацию аминокислот от приблизительно 15 до 65 mM; и по меньшей мере одно из перечисленного: подходящая базовая среда (например, под торговым названием SFM4CHO, BalanCD CHO Growth A, Nu-Cell CHO и т.д.), сложная химически определенная питательная добавка (например, под торговым названием BalanCD CHO Добавка 1), дексаметазон, ManNAc, гидролизат хлопковых семян и D-(+)-галактоза.

В еще одном варианте осуществления перфузионного способа перед стадией (a) клетки, способные к экспрессии этанерцепта, выращивают в фазе роста при температуре, выбранной из интервала (i) приблизительно от 28 до 37°C; и (ii) приблизительно от 35 до 36°C.

В другом варианте осуществления перфузионного способа во время производства этанерцепта, происходящего на стадиях (b) и (c), в реакционном сосуде поддерживают температуру, выбранную из (i)

больше чем приблизительно 32°C; (ii) больше чем приблизительно 34°C; (iii) больше чем приблизительно 35°C; (iv) из диапазона приблизительно от 33 до 36°C; (v) из диапазона приблизительно от 35 до 36°C; (vi) 32,5°C; (vii) 33,5°C; (viii) 34,5°C и (ix) 35,5°C. Возможность производить превосходный по качеству продукт, правильно свернутые белки и превосходные титры при этих температурах является удивительным и неожиданным фактом, учитывая противоположные по результатам исследования в области техники, направленные на применение более низких температур в течение фазы производства (по сравнению с фазой роста) в процессе производства белка.

С точки зрения композиции, наше изобретение направлено на создание композиции среды, подобранной для обеспечения требуемой суммарной концентрации аминокислот в перфузионном способе производства терапевтического белка, причем указанная требуемая концентрация, основанная на объеме перфузионного реактора, используемого в данном способе, находится в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из приблизительно от 15 до 20 мМ; приблизительно от 20 до 25 мМ; приблизительно от 25 до 30 мМ; приблизительно от 30 до 35 мМ; приблизительно от 35 до 40 мМ; приблизительно от 40 до 45 мМ; приблизительно от 45 до 50 мМ; приблизительно от 50 до 55 мМ; приблизительно от 55 до 60 мМ; приблизительно от 60 до 65 мМ; и в которой композиция при ее предложении, рекомендации или рекламировании на продажу сопровождается письменной или устной рекомендациями или инструкциями, поддерживающими или предлагающими ее предполагаемое использование в таком перфузионном способе.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция представляет собой композицию питательной среды, содержащей суммарную концентрацию аминокислот в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из приблизительно от 15 до 20 мМ; приблизительно от 20 до 25 мМ; приблизительно от 25 до 30 мМ; приблизительно от 30 до 35 мМ; приблизительно от 35 до 40 мМ; приблизительно от 40 до 45 мМ; приблизительно от 45 до 50 мМ; приблизительно от 50 до 55 мМ; приблизительно от 55 до 60 мМ; приблизительно от 60 до 65 мМ, и дополнительно содержащий по меньшей мере один из компонентов и предпочтительно один из следующих: гидролизат хлопковых семян, дексаметазон, ManNAc и/или D-(+)-галактоза.

В любом из указанных выше вариантов осуществления предпочтительный диапазон концентраций аминокислот составляет от приблизительно 15 до 30 мМ, и среда может включать в себя установленные и не установленные среды.

Такой термин, как "культура", "плотность клеток", "жизнеспособность клеток", "титр", "среды" (или "культуральная среда") "пассирование", "фаза роста", "фаза производства" может пониматься как имеющий значение, хорошо известное в данной области техники. Например, может быть дана ссылка на патентный документ с номером US Patent 7300773.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам изготовления слитого белка или антитела с помощью способа, известного как перфузия. Термин "перфузия", используемый в данном описании, предназначен, как правило, для обозначения способа, в котором суспензионную клеточную культуру непрерывно или периодически и наиболее предпочтительно непрерывно подают со свежей средой в биореактор в то время, как расходуемую культуральную среду непрерывно удаляют, то есть собирают (предпочтительно, с продуктом) для того, чтобы продукт, содержащийся в ней, мог непрерывно собираться, а отходы и токсичные материалы, присутствующие в отработанной среде, могли быть удалены из биореактора. С помощью соответствующих средств фильтрации, хорошо известных в данной области техники, клетки затем непрерывно фильтруют из потока продукта и возвращают в биореактор для поддержания постоянного объема культуры. Такой процесс, как правило, проводимый непрерывно, позволяет достигать высоких плотностей клеток. Соответственно, плотность более чем 10-75 млн клеток/мл, как правило, может быть достигнута и поддерживаться в течение продолжительного периода времени, например по меньшей мере, двух недель и, как правило, от 20 до 60 дней. Это может приводить к очень высокопродуктивному способу культивирования клеток, который может производить в течение более длительного периода времени, в отличие от единовременной загрузки и периодической подачи культур. В качестве альтернативы, вместо непрерывного сбора продукта из удаленной отработанной среды, продукт может быть сохранен и концентрирован в культуре, а затем собран периодически или в конце культивирования. Как хорошо известно в данной области техники, использование фильтров соответствующего размера может обеспечить удаление только отходов с сохранением рекомбинантного продукта в культуре биореактора. Задачей настоящего изобретения является обеспечение надлежащей питательной среды для использования в способе перфузии, в частности, в способах изготовления терапевтических белков, таких как слитые белки или антитела.

Перфузионные способы культивирования клеток, как правило, могут протекать при скорости подачи среды от 0,5 до 2 объемов биореактора в день. Настоящее изобретение основано на обнаружении, что такие перфузионные способы не требуют столь же высокой концентрации питательных веществ, которая обычно используется в питательной среде, используемой в периодическом способе обработки, и, по сути, требуют значительно меньших концентраций. В частности, нами обнаружено, что концентрация питательных веществ, в частности концентрация аминокислот, используемых в периодических способах из-

готовления терапевтического белка (например, слитого белка или антитела) должна быть понижена до уровней, которые, с одной стороны, по-прежнему достаточно богаты питательными веществами для поддержания метаболических потребностей клеток на стационарном уровне, но с другой стороны, не так высоки в отношении питательных веществ, чтобы вызывать другие побочные эффекты, такие как, помимо всего прочего, перепроизводство аммиака или лактата, что приводит к снижению жизнеспособности культуры, общего титра и качества продукции. Изобретение требует понижения уровня питательных веществ с точки зрения снижения суммарных уровней концентрации аминокислот. Дополнительные компоненты питательной среды могут быть определены эмпирическим путем хорошо известным способом на основании плотности клеток, скорости перфузии и удельной производительности (УП), при условии, что снижающийся уровень питательных веществ попадает в общий уровень концентрации аминокислот, указанный в настоящем изобретении. Наше изобретение далее основывается на обнаружении того факта, что потребление аминокислот в среде, подобранной для перфузии (для стимулирования производства, а не пролиферации) снижается. Соответственно, такая среда поддерживает требуемую производительность при значительно более низких концентрациях аминокислот. Сокращение других питательных элементов, таких как глюкоза, витамины и т.д., также является возможным.

Перфузионный способ по настоящему изобретению в особенности хорошо подходит для изготовления слитого белка, известного как этанерцепт (в том числе биоподобные или лучшие биоварианты). Этанерцепт (продукт под наименованием ENBREL®) представляет собой димерный слитый полипептид, состоящий из внеклеточной лиганд-связывающей части человеческого фактора некроза опухоли (TNFR) массой 75 кДа (p75), связанной с Fc-участком IgG1 человека. Он состоит из 934 аминокислот и обладает кажущейся молекулярной массой приблизительно 150 кДа (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.). Fc-компонент этанерцепта содержит константный тяжелый домен 2 (CH2), константный тяжелый домен 3 (CH3) и шарнирный участок, но не константный тяжелый домен 1 (CH1) человеческого IgG1. Fc-домен может содержать один или все домены, описанные выше. Этанерцепт, как правило, получают с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе экспрессии на основе млекопитающей клетки яичника китайского хомячка (CHO).

Перфузионный способ по настоящему изобретению также хорошо подходит для изготовления антитела к TNF, известного как адалимумаб. Адалимумаб (продукт под наименованием Humira®) представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело IgG1 человека, специфичное к TNF человека. Адалимумаб также известен как D2E7. Адалимумаб имеет две легкие цепи, каждая из которых обладает молекулярной массой приблизительно 24 килодальтон (кДа), и две тяжелые цепи IgG1, каждая с молекулярной массой приблизительно 49 кДа. Каждая легкая цепь состоит из 214 аминокислотных остатков, и каждая тяжелая цепь состоит из 451 аминокислотных остатков. Таким образом, адалимумаб состоит из 1330 аминокислотных остатков и имеет общую молекулярную массу приблизительно 148 кДа. Термин адалимумаб также предназначается для охвата так называемых являющихся биоподобными или лучших биовариантов адалимумаба, используемых в коммерчески доступном Humira®.

Питательная среда, используемая в настоящем изобретении, предпочтительно, содержит базовую среду, такую как под торговым наименованием BalanCD® и под торговым наименованием HyCell®, дополненную дексаметазоном. Клетки, продуцирующие белок (например, этанерцепт или являющиеся биоподобными или лучшими биовариантами), присутствуют в перфузионном сосуде при плотности по меньшей мере 10,000,000 клеток/мл, и предпочтительно при плотности по меньшей мере 5,000,000 и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10,000,000 клеток/мл. Перед стадией (а) во время фазы роста для клеток, способных экспрессировать требуемый белок (до существенного инициирования производства), такие клетки, способные к экспрессии белка, могут быть выращены при температуре, выбранной из: (i) от приблизительно 28 до приблизительно 37°C; и (ii) предпочтительно от приблизительно 35 до приблизительно 36°C. На последующей стадии производства, включая перфузионный процесс, производство этанерцепта протекает при температуре, выбранной из (i) выше чем приблизительно 32°C; (ii) больше чем приблизительно 34°C; (iii) больше чем приблизительно 35°C; (iv) в диапазоне приблизительно от 33 до приблизительно 36°C; (v) в диапазоне приблизительно от 35 до приблизительно 36°C; (vi) 32,5°C; (vii) 33,5°C; (viii) 34,5°C и (ix) 35,5°C. Способ по настоящему изобретению предпочтительно включает непрерывный или периодический, но предпочтительно непрерывный сбор этанерцепта в ходе производственной фазы перфузионного способа. Более того, удаление отработанной среды и замены свежей культуральной средой происходит предпочтительно непрерывно. Сбор требуемого белка, присутствующего в непрерывно отбираемой культуральной среде, предпочтительно осуществляют непрерывно.

Перфузионный способ по настоящему изобретению может быть использован для получения любого терапевтического белка, в том числе, например, слитых белков и моноклональных антител. Примеры белков, пригодных для производства в перфузионном способе по изобретению, включают этанерцепт, адалимумаб, трастузумаб, ритуксимаб, бевацизумаб, инфликсимаб, экулизумаб и натализумаб, а также являющиеся биоподобными или лучшими биовариантами таких белков. Следует понимать, однако, что перфузионный способ по настоящему изобретению не ограничивается каким-либо конкретным белком.

Объемная производительность описанного способа и качество производимого этанерцепта может быть оценено с использованием нескольких методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Эти методы включают, но не ограничиваются, анализы, в которых количественно оценивают общий и активный белок (титры), квалифицируют уровень сиаилирования белка, такие как изоэлектрофокусирование (ИЭФ) в гелях, гидрофобная хроматография и другие.

Перфузионный способ по настоящему изобретению позволяет производить правильно свернутые белки с превосходными выходами, и предпочтительно, при производственных температурах, превышающих ранее считавшиеся необходимыми или желательными в данной области техники.

Примеры

Нижеследующие материалы использованы в примерах.

Описание исходного материала	Фирма-производитель	Номер в каталоге фирмы-производителя	Категория	Применимый диапазон	Отметки об использовании
Продукт под торговым наименованием BalanCD™ CHO Growth A	Irvine Scientific	94120-10L	Базовая среда	нет данных	базовая среда
Продукт под торговым наименованием HyClone™ HyCell CHO	Thermo Scientific	SH30933	Базовая среда	нет данных	базовая среда
Продукт под торговым наименованием HyClone™ SFM4CHO	Thermo Scientific	SH30518.04	Базовая среда	нет данных	используется в системе посевных ферментеров;
D-(+)-Галактоза	SAFC	G5388	Гликановая питательная среда	≤10	используется при конечной концентрации 10 mM; для оптимизации качества продукта
Дексаметазон	SAFC	D4902	Гликановая питательная среда	≤1 мкМ	используется при 0,8-1,0 мкМ; для оптимизации качества продукта
ManNAc (N-ацетилманнозамин)	SAFC	A8176	Гликановая питательная среда	≤ 20	используется при конечной концентрации 10 mM; для оптимизации качества продукта
Продукт под торговым наименованием BalanCD™ CHO Добавка 1	Irvine Scientific	94119-10L	Питательная среда для титрования	10% (об.)	Активирует титр при добавлении в качестве самостоятельного компонента или с другой титровальной средой
Продукт под торговым наименованием HyClone™ Cell Boost 5	Thermo Scientific	SH30865.04	Питательная среда для титрования	10-20% (об.)	Используется в контрольном опыте
Гидролизат хлопковых семян («ГХС»)	FrieslandCampina Domo	CNE50M-UF	Питательная среда для титрования	15% (об.)	Повышает удельную продуктивность
Продукт под торговым наименованием EX-Cell CHOZN Platform Feed	SAFC	24331C-10L	Питательная среда для титрования	10-20% (об.)	Сложная питательная среда для периодического способа
Среда Роста	SAFC	87509CP	Базовая среда	нет данных	Базовая среда для начального роста в производственном биореакторе
Производственная среда	SAFC	87496CP	Сложная среда	нет данных	Базовая среда для фазы производства в производственном биореакторе
Производственная среда	SAFC	87612CP	Базовая среда	нет данных	Базовая среда для фазы производства в производственном биореакторе

Пример 1.

В этом эксперименте нами использована питательная среда, состоящие из смеси 1:1 продукта под торговым наименованием BalanCD™ CHO Growth A и HyClone™HyCell, дополненной продуктом под торговым наименованием EX-CELL CHOZN и Добавкой 1, гидролизатом хлопковых семян, галактозой, L-глутамином и глюкозой. Некоторые условия включают дополнительные добавки с витаминами, аминокислотами и более высокие концентрации CHOZN и Питательной Среды 1, что делает среду значительно богаче (см. прогоны SF5, SF6 и SF7 ниже). Перед добавлением питательной среды посевная плот-

ность составляет 40 млн клеток на миллилитр культуры. Перфузионный способ моделировали в этой культуре с получением полной замены среды за 24 ч после пассирования и культивирование затем продолжают в течение 96 ч (без дополнительной подпитки или замены среды). Производительность культуры контролируют в отношении к жизнеспособной плотности клеток, жизнеспособности, метаболического профиля (производство аммиака и лактата, поглощение L-глутамина и глюкозы, уровни pH, производство глутамата) и производительности. Как показано на данных, представленных ниже, культуры с большим содержанием витаминных добавок и аминокислот (см. прогоны SF5 и SF6, ниже) производят очень высокий уровень аммиака (>40 мМ), что приводит к преждевременному снижению жизнеспособности. Мы не наблюдали каких-либо других изменений метаболизма, по сравнению с данными, полученными для оставшихся в живых клеток, отличных от исключительно высоких уровней аммиака. На титры, полученные в питательных средах с более высокой питательной ценностью, также сказалось отрицательное влияние даже в течение времени, когда жизнеспособность является сопоставимой для всех культур. Меньшие по питательной ценности культуры без дополнительных витаминов и аминокислот (прогоны SF3 и SF4) сохраняют высокую жизнеспособность при хорошей производительности и дают материал хорошего качества (смотри раздел Данных ниже).

В этом примере 1 с использованием одной замены питательной среды через 24 ч с последующей 96-часовой фазой производства (без дальнейшей замены среды в течение 96-часового периода) показано, что среда, предназначенная для использования в перфузии (в которой среду непрерывно или периодически заменяют), обязательно требует пониженных уровней питательных веществ до уровней ниже, чем при использовании питательной среды в прогонах SF3 и SF4. Соответственно, как следует из примеров 2 и 3 ниже, в питательной среде, используемой в перфузионном способе, следует применять суммарное содержание аминокислот менее 70 мМ и предпочтительно, суммарное содержание аминокислот в пределах от приблизительно 15 до приблизительно 30 мМ также приводит к превосходной плотности клеток, жизнеспособности клеток и продукции титра. Под суммарным содержанием аминокислот в данном описании следует понимать суммарное устойчивое состояние концентрации аминокислот на основании объема реакционного перфузионного сосуда.

Результаты примера 1.

В табл. 1 ниже приведены питательные среды, используемые в пяти экспериментах (прогоны от SF3 до SF7), в которых, как описано выше, происходит замена среды после пассирования в течение 24 ч и затем процесс продолжают (без какой-либо дальнейшей замены среды) в течение еще 96 ч. В этом эксперименте сравнивают низкие по питательной ценности среды (прогоны SF3, SF4) с более высокими по питательной ценности средами (прогоны SF5, SF6, SF6 и SF7). Питательные среды, показанные в таблице, использованы для дополнения базовой среды, состоящей из продуктов BalanCD и Nucell (как указано в перечисленных выше материалах). Витамины (наименование Invitrogen, номер по каталогу Cat # 11120-052) и аминокислоты (наименование Invitrogen, номер по каталогу Cat # 11130-036) добавляют в концентрации от 1 × из стока 100 ×.

Таблица 1. Перфузионные питательные среды

Добавки	SF3 Питательная среда с более низкой питательной ценностью	SF4 Питательная среда с более низкой питательной ценностью	SF5 Питательная среда с более высокой питательной ценностью	SF6 Питательная среда с более высокой питательной ценностью	SF7 Питательная среда с более высокой питательной ценностью
CHOZN	10%	10%	10%	10%	20%
ГХХ		7,5%	7,5%	7,5%	
Добавка 1	10%	10%	10%	10%	20%
L-Глутамин	8 мМ	8 мМ	8 мМ	8 мМ	8 мМ
Витамины			1 ×	1 ×	
АК				1 ×	
Гал	10 мМ	10 мМ	10 мМ	10 мМ	10 мМ

На фиг. 1 приведены данные по плотности жизнеспособных клеток (ПЖК) культур, содержащих низкие концентрации питательной среды (прогоны SF3 и SF4) в соответствии с настоящим изобретением. Следует отметить, что получают очень высокие плотности культур. Относительно менее насыщенная среда (10% CHOZN+7,5% гидролизата хлопковых семян (ГХХ) и 10% Добавки 1 и без дополнительных добавок витаминов или аминокислот) (прогоны SF3 и SF4) при условии достаточной питательной поддержки клеток для поддержания высокой жизнеспособности по меньшей мере в течение 96 ч.

На фиг. 2 показано (в случае прогонов SF5, SF6 и SF7), что более обогащенные питательные среды (в результате добавок витаминов и аминокислот или сложных питательных сред) приводят в результате к снижению продолжительности жизни культуры. В частности, нами обнаружено, что добавление аминокислот в концентрациях, которые, предположительно, превышают требования метаболизма культуры, приводит к быстрому снижению жизнеспособности. Также отмечено, что все культуры с более короткой

продолжительностью жизни (например, прогоны SF6 и SF7) производят высокие уровни аммиака (см. фиг. 3).

На фиг. 3 показано, что культуры (см. прогоны SF6 и SF7 в табл. 1 выше) с использованием более обогащенных питательных сред проявляют неприемлемо высокую производительность по аммиаку, которая, как мы полагаем, может вызывать или приводить к преждевременному снижению жизнеспособности.

На фиг. 4 показано, что производство белка в среде с более высокой питательной ценностью (например, прогоны SF5, SF6 и SF7) претерпевает отрицательное влияние, что показано сокращением титра. Сравните производство культур в среде с использованием питательных сред с пониженной питательной ценностью SF3 и SF4 согласно изобретению с производством в культуральной среде с использованием питательных сред с повышенной питательной ценностью SF5, SF6 и SF7.

Пример 2.

На основании данных, полученных в примере 1, и в соответствии с нашим изобретением нами обнаружено, что среда с пониженной питательной ценностью, такая как применяемая в прогонах SF3 и SF4 в примере 1 выше, может быть модифицирована для дальнейшего существенного снижения суммарной концентрации аминокислот при использовании в перфузионном способе, подвергающемся непрерывной или периодической замене среды. В частности, в таком перфузионном способе при общей концентрации аминокислот менее 70 мМ и предпочтительно в диапазоне от приблизительно 15 до приблизительно 65 мМ и наиболее предпочтительно в диапазоне от приблизительно 20 до приблизительно 30 мМ поддерживаются метаболические потребности клеточной культуры в перфузионном способе производства терапевтических белков, таких как, например, слитый белок TNFR-Fc, или моноклональные антитела к TNF. Соответственно в перфузионном способе с периодической заменой среды используют перфузионный процесс согласно изобретению, в котором питательную среду, имеющую суммарную концентрацию аминокислот менее 70 мМ, и предпочтительно, в интервале от приблизительно 15 до приблизительно 65 мМ, и наиболее предпочтительно, от приблизительно 20 до приблизительно 30 мМ, заменяют через каждые 24 часа свежей средой. Такой способ, в котором имитируют перфузию, эквивалентен скорости перфузии 1 объема биореактора в день. Клетки инокулируют при плотности предпочтительно 50 млн клеток на миллилитр и среду заменяют через каждые 24 ч в течение в общей сложности 3 замен. Культивирование завершают на 4-й день (всего 96 ч). Жизнеспособную плотность клеток и жизнеспособность регистрируют ежедневно. Титр и профиль изоформы, отражающие качество продукта, определяют для каждого отобранного образца с использованием соответствующих аналитических методов, известных в данной области техники. Клеткам может потребоваться приблизительно 3 дня (72 ч) для постепенного перехода к рабочему режиму метаболизма, что отражается улучшенным титром и качеством продукции (96-часовые образцы). Результатом процесса является превосходная плотность клеток и жизнеспособность клеток, а также превосходный титр, несмотря на использование питательной среды, содержащей существенно более низкие суммарные концентрации аминокислот, по сравнению со средами, обычно используемыми в периодических способах, таких как рекомендовано в патентном документе с номером U.S. Patent 7300773, в котором требуется превышение суммарной концентрации аминокислот уровня 70 мМ.

Пример 3. Перфузия с непрерывной заменой среды

Повторяют пример 2, за исключением того, что используют непрерывный перфузионный процесс, в котором свежую среду непрерывно подают в реактор и отработанную среду непрерывно удаляют способом, хорошо известным в данной области техники, в результате чего в соответствии с настоящим изобретением концентрации в устойчивом состоянии аминокислоты в питательной среде в реакторе составляют менее 70 мМ и предпочтительно в диапазоне от приблизительно 15 до приблизительно 65 мМ, и наиболее предпочтительно в диапазоне от приблизительно 20 до приблизительно 55 мМ. Непрерывный перфузионный способ приводит к превосходной плотности клеток, выживаемости клеток и титру. В дополнение к требованиям по суммарной концентрации аминокислот, питательную среду предпочтительно составляют таким образом, что при концентрации в устойчивом состоянии среды в перфузионном реакторе соблюдается один или более из следующих критериев: (i) суммарное количество в устойчивом состоянии аминокислот на единицу объема меньше чем приблизительно 70 мМ; (ii) мольное соотношение в устойчивом состоянии глутамина и суммарного аспарагина составляет больше чем приблизительно 2; (iii) мольное соотношение в устойчивом состоянии глутамина и суммарной концентрации аминокислот составляет больше чем приблизительно 0,2; (iv) мольное соотношение в устойчивом состоянии неорганических ионов и суммарной аминокислоты больше чем 1 и (v) суммарное количество в устойчивом состоянии глутамина и аспарагина в единице объема составляет менее 16 мМ. Термин в устойчивом состоянии предназначен для обозначения того, что концентрация и соотношение компонентов в питательной среде, выраженное выше, остаются, по существу, постоянными на указанных уровнях в реакционном перфузионном сосуде.

Пример 4.

Нами оценивались различные композиции сред, делающие возможным надежную производительность культуры в условиях перфузии в отношении роста, производительности и качества продукции. В одном из наших экспериментов, в котором достигается плотность клеток 10 млн клеток на миллилитр,

мы тестировали базальную среду SFM4CHO, дополненную двумя различными концентрациями питательной среды Cell Boost 5, и обнаружили, что менее насыщенная (10%-ная питательная среда), приводящая к суммарной концентрации аминокислот приблизительно до 50 мМ, приводит к улучшению качества продукта, в отличие от культуры, которая дополнена 20%-ной питательной средой, приводящей к суммарной концентрации аминокислоты приблизительно 100 мМ. Разница в качестве демонстрируется данными, представленными на фиг. 5. Дорожки 2 и 4 демонстрируют распределение заряженных частиц довольно схожее с коммерческим этанерцептом (продукт под наименованием ENBREL®) (дорожка 6), с преобладанием кислотных полос, мигрирующих далее в гель. В противоположность этому образцы из более богатых питательных сред (дорожки 3 и 5) демонстрируют меньшее содержание кислотных, быстро мигрирующих соединений и в меньшей степени похожи на продукт под наименованием ENBREL®.

В последующем эксперименте испытаны более высокие плотности культуральной среды (25 млн клеток на мл) с использованием точно таких же условий питательной среды. Нами обнаружено, что рецептура среды с более низким содержанием питательной среды Cell Boost 5 не способна к поддержанию жизнеспособности культуральной среды, в конечном счете, приводя в результате к снижению качества продукта. Тем не менее, нами также обнаружено, что в то время, как питательная среда, содержащая более высокую суммарную концентрацию аминокислот (прибл. 100 мМ), поддерживает высокую жизнеспособность, качество продукции несравнимо с наблюдаемым при более низкой плотности клеток. Этот результат показал необходимость дальнейших исследований для нахождения других сред и питательных сред, которые могли бы обеспечивать хорошее качество продукции, поддерживая плотности клеток в диапазоне 25-50 млн клеток на мл. Поэтому мы исследовали несколько базальных сред и комбинаций сред в режиме единовременной загрузки для выявления композиций среды, которая способна поддерживать самую высокую долговечность культуры, пассированной в концентрации от 30 до 50 млн клеток на мл культуры. Это исследование включает эксперимент и открытия, указанные в примере 1 выше.

Пример 5. Требования к среде в перфузионном производстве слитого белка TNFR-Fc

Нами проведен ряд экспериментов по замене среды, имитирующей перфузию, с использованием культур высокой плотности (25×10^6 клеток/мл) в производстве слитого белка TNFR-Fc на стадии разработки, в качестве биоподобного этанерцепту. В этих экспериментах нами последовательно обнаружено, что высокая жизнеспособность может быть достигнута с использованием питательных сред, которые обеспечивают сокращение концентрации питательных веществ. Наши результаты проиллюстрированы экспериментом, в котором были установлены две культуры с высокой плотностью, каждая из которых содержит 25 млн клеток на миллилитр культуры, причем в обеих культурах использованы те же базальные среды (под наименованиями BalanCD/Hycell, 1:1) и дополнительные добавки 10 мМ галактозы и 10 мМ ManNAc. Различие между обеими культурами состоит в уровне содержания питательной среды CHOZN (10% против 20%) и гидролизата хлопковых семян (7,5% против 15%). Обе питательные среды несут дополнительные источники аминокислот в культуральной среде. Жизнеспособность культуры с более низкой концентрацией питательной среды соответствует культуре, которая получает более насыщенную среду. Этот результат показывает, что понижение концентрации питательной среды с 20% (суммарное содержание аминокислот 98 мМ) до 10% (суммарное содержание аминокислот 78 мМ) не ограничивает потребности в питании этой культуры и четко указывает, что суммарная концентрация аминокислоты может быть снижена далее до уровней, которые мы в настоящее время предписываем в настоящем изобретении. Данные показаны на фиг. 6 и 7.

Проведенный анализ среды в отношении содержания аминокислот показывает, что культура с более низким содержанием питательной среды, даже после 48 ч культивирования, существенным образом не истощает запас любой представленной аминокислоты. Это свидетельствует о том, что содержание аминокислот выше, чем потребности культуры в питании и в соответствии с настоящим изобретением, может быть дополнительно сокращена ниже уровня 78 мМ. Соответственно нами обнаружено, что клетки, подвергаемые перфузии в среде при постоянной скорости требуют гораздо более низкие уровни аминокислот и что для скорости перфузии 1 объем биореактора в день обычно требует суммарной концентрации аминокислот в устойчивом состоянии в диапазоне приблизительно 20-50 мМ.

Одним из основных требований в проектах по разработке продукта является высокий уровень экспрессии титра продукта с желаемым качеством. Большинство белков требуют точной посттрансляционной модификации для их терапевтической активности. Например, слитый белок TNFR-Fc, произведенный в этом примере, требует существенной степени сialiлирования, что приводит к специфическому распределению изоформ на основании профиля молекулярного заряда. Анализ методом изоэлектрической фокусировки, продемонстрированный в ИЭФ геле (фиг. 8), показывает, что снижение содержания питательной среды не приводит к изменению распределения изоформы продукта по сравнению с коммерческим стандартом и эталонными образцами, полученными из культур, питаемых 20%-ной питательной средой.

На фиг. 8 изоэлектрофокусирование (ИЭФ) в геле показывает сравнимое распределение изоформ продукта, выделенного из культур, содержащих более низкую (10%-ную) концентрацию питательной среды (как показано на лунках 1 и 4, первая и вторая замены среды, 3C), по сравнению с изолированными

ми из богатых аминокислотами (20%-ных) питательных сред (как показано на лунках 2 и 5, первая и вторая замены питательной среды, 3С).

Профиль стандарта показан в лунке 3.

Как видно на фиг. 9, титры, полученные для культур, питаемых менее насыщенной (10%-ной) и богатой (20%-ными) питательными средами, показывают, что более высокая концентрация питательных сред может приводить к снижению производительности культуры. Удовлетворяя потребность клеток в питательных веществах для перфузии, указанной в настоящем изобретении, и, таким образом, избегая излишне обогащенной среды, можно достигать состояния метаболизма культуры при перфузионной обработке, которое приводит к повышению производительности и качества продукта, по сравнению с требованиями к среде, рекомендованными до настоящего времени в данной области техники (см., например, патентный документ с номером US 7300773).

Пример 6.

Для получения слитого белка TNFR-Fc в стадии разработки в качестве биоподобного этанерсепта система посевных ферментеров расширена до качалочных колб большого объема при 37°C в среде SFM4CHO. В производственном биореакторе производят инокулирование пассивированием при плотности от 1 до 5×10^6 клеток/мл в среде, где суммарная концентрация аминокислот варьируется в каждом из девяти отдельных повторений этого эксперимента от приблизительно 15 до приблизительно 70 мМ (см. таблицу ниже). В каждом из прогонов температура во время фазы производства (при непрерывной перфузии) составляет от 33,5 до 35°C. Устройство удержания клеток марки ATF™ (Refine Technology) используют для рециркуляции среды (содержащей отходы и желаемый продукт) через полый волоконный фильтр с частотой рециркуляции от 0,05 до 2,0 рабочих объемов культуры в минуту. Культуру сначала расширяют в фазе роста в течение от 0 до 2 дней и затем инициируют перфузию при скорости от 0,2 до 2 объемов культуральной среды в день для облегчения фазы производства. Новую среду добавляют, как только отработанную среду (содержащую продукт) собирают через полый волоконный фильтр с размером пор 0,2 мкм. Собранную жидкость охлаждают до 2-8°C, очищают захватом в среде Protein A Resin. Аликвоты анализируют на титр и параметры качества продукции, такие как распределение N-гликанов и анализ Hi-C (для оценки относительных количеств правильно свернутого этанерсепта, по сравнению с неправильно свернутым/агрегированным (неактивным) материалом). Суммарные концентрации аминокислот, исследованные в этих опытах, показаны ниже:

Суммарная (в устойчивом состоянии) концентрация аминокислот (прим.)

ПРОГОН # 1	От 15 до 20 мМ
ПРОГОН # 2	20-25 мМ
ПРОГОН # 3	25-30 мМ
ПРОГОН # 4	30-35 мМ
ПРОГОН # 5	35-40 мМ
ПРОГОН # 6	45-50 мМ
ПРОГОН # 7	55-60 мМ
ПРОГОН # 8	60-65 мМ
ПРОГОН # 9	65-70 мМ

Анализ плотности клеток, жизнеспособности, качества жизнеспособного продукта и титр для каждого из прогонов от 1 до 9 демонстрируют превосходные результаты в отношении этих характеристик при нижнем уровне диапазона суммарной концентрации аминокислот от 15 до 70 мМ, предпочтительно, в диапазоне от приблизительно 15 до приблизительно 30 мМ с усиленным ухудшением этих характеристик при движении в сторону более высокого значения диапазона.

Пример 7.

Для получения слитого белка TNFR-Fc в стадии разработки в качестве биоподобного этанерсепта, система посевных ферментеров расширена до качалочных колб большого объема при 37°C в среде SFM4CHO. В производственном биореакторе производят инокулирование пассивированием при плотности от 0,3 до $0,75 \times 10^6$ клеток/мл в серии перфузионных биореакторов в среде, где суммарная концентрация аминокислот равна от приблизительно 20 до приблизительно 56 мМ. В каждом из прогонов температура во время фазы производства (при непрерывной перфузии) составляет от 35 до 37°C. Устройство удержания клеток марки ATF™ (Refine Technology) используют для рециркуляции среды (содержащей отходы и желаемый продукт) через полый волоконный фильтр с частотой рециркуляции от 0,5 до 2,0 рабочих объемов культуры в день. Культуру сначала расширяют в фазе роста вплоть до 8 дней, с перфузией при клеточно-специфической скорости перфузии от 0,05 до 0,1 нл на клетку в день. Температуру понижают до, например, 33,5°C, чтобы способствовать фазе производства. Новую среду добавляют, как только отработанную среду (содержащую продукт) собирают через полый волоконный фильтр с размером пор 0,2 мкм. Собранную жидкость охлаждают до 2-8°C, очищают захватом в среде Protein A Resin. Аликвоты анализируют на титр и параметры качества продукции, такие как распределение N-гликанов и анализ Hi-C (для оценки относительных количеств правильно свернутого этанерсепта, по сравнению с неправильно

свернутым/агрегированным (неактивным) материалом).

Анализ жизнеспособной плотности клеток, жизнеспособности, качества продукта и титра для каждого прогона демонстрирует превосходные результаты в отношении этих характеристик при нижнем уровне диапазона суммарной концентрации аминокислот от 20 до 56 мМ, предпочтительно в диапазоне от приблизительно 15 до приблизительно 30 мМ. Как показано на фиг. 10, культура, выращенная в соответствии с настоящим описанием, достигает приблизительно 30 млн клеток/мл в течение фазы роста длительностью девять дней и эта концентрация клеток поддерживается при высокой жизнеспособности во время фазы производства, которая продлевается еще на 11 до 12 дней.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ производства белка, включающий стадию получения белка посредством перфузии в присутствии питательной среды с суммарной концентрацией аминокислот от 15 до менее 70 мМ, где в стадии получения белка достигается титр белка, составляющий по меньшей мере 300 мкг/мл, и где указанный белок представляет собой слитый белок TNFR-Fc.

2. Способ по п.1, где питательная среда содержит суммарную концентрацию аминокислот в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из от 15 до 20 мМ; от 20 до 25 мМ; от 25 до 30 мМ; от 30 до 35 мМ; от 35 до 40 мМ; от 40 до 45 мМ; от 45 до 50 мМ; от 50 до 55 мМ; от 55 до 60 мМ; от 60 до 65 мМ и между 65 и 70 мМ.

3. Способ по п.1, где слитый белок TNFR-Fc представляет собой этанерцепт.

4. Способ по п.1, где питательная среда содержит один или более из следующих компонентов: базовая среда SFM4CHO®, базовая среда BalanCD, базовая среда Nucell, гидролизат хлопковых семян, дексаметазон, ManNAc и/или D-(+)-галактоза.

5. Способ по п.1, включающий следующие стадии: (a) подготовка смеси, содержащей клетки, способные экспрессировать требуемый терапевтический белок, и культуральной среды, подходящей для осуществления такой экспрессии; (b) экспрессия указанного терапевтического белка в подходящем сосуде, содержащем указанную смесь, посредством инициирования производства белка клетками и (c) периодическое или непрерывное удаление отработанной культуральной среды из реакционного сосуда и добавление в него свежей культуральной среды.

6. Способ по п.5, где клетки являются клетками CHO.

7. Способ по п.5, где перед стадией (a) клетки, способные к экспрессии белка, выращивают в фазе роста при температуре, выбранной из (i) от 28 до 37°C и (ii) от 35 до 36°C.

8. Способ по п.7, где фазу производства, обособленную от фазы роста и следующую за ней, проводят при температуре, выбранной из (i) больше чем 32°C; (ii) больше чем 34°C; (iii) больше чем 35°C; (iv) диапазона от 33 до 36°C; (v) диапазона от 35 до 36°C; (vi) 32,5°C; (vii) 33,5°C; (viii) 34,5°C и (ix) 35,5°C.

9. Способ по п.8, где вырабатываемый белок представляет собой этанерцепт.

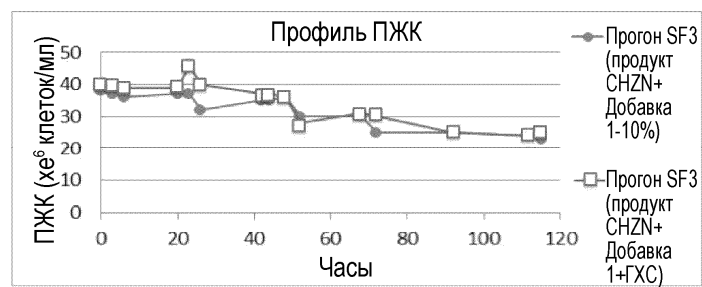
10. Перфузионный способ получения терапевтического белка, включающий следующие стадии: (a) подготовка смеси, содержащей клетки CHO, способные к экспрессии белка, и культуральной среды, подходящей для проведения такой экспрессии; (b) в подходящем сосуде, содержащем указанную смесь, инициирование производства белка клетками и (c) периодическое или непрерывное удаление отработанной культуральной среды из и добавление свежей культуральной среды в реакционный сосуд, где культуральная среда содержит по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из сложной химически определенной питательной среды, дексаметазона, ManNAc, гидролизата хлопковых семян и D-(+)-галактозы, и указанная культуральная среда имеет суммарную концентрацию аминокислот от 15 до 65 мМ, где в стадии получения белка достигается титр белка, составляющий по меньшей мере 300 мкг/мл, и где указанный белок представляет собой слитый белок TNFR-Fc.

11. Способ по п.10, где слитый белок TNFR-Fc представляет собой этанерцепт.

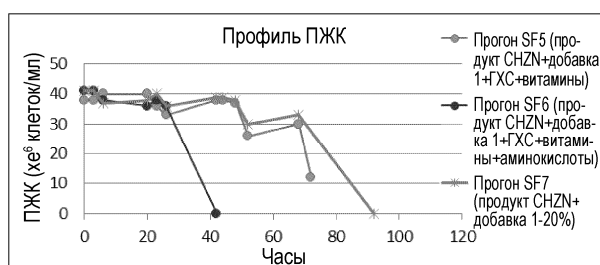
12. Перфузионный способ по п.11, где перед стадией (a) клетки, способные к экспрессии этанерцепта, выращивают в фазе роста при температуре, выбранной из (i) от 28 до 37°C и (ii) от 35 до 36°C.

13. Перфузионный способ по п.12, где во время производства этанерцепта, происходящего на стадиях (b) и (c), в реакционном сосуде поддерживают температуру, выбранную из (i) больше чем 32°C; (ii) больше чем 34°C; (iii) больше чем 35°C; (iv) из диапазона от 33 до 36°C; (v) из диапазона от 35 до 36°C; (vi) 32,5°C; (vii) 33,5°C; (viii) 34,5°C и (ix) 35,5°C.

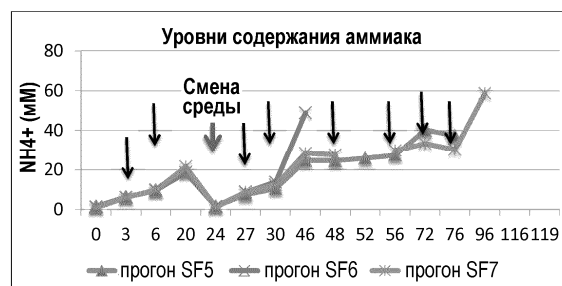
14. Композиция питательной среды для получения терапевтического слитого белка TNFR-Fc в сосуде перфузионной реакции, содержащая суммарную концентрацию аминокислот в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из концентраций от 15 до 20 мМ; от 20 до 25 мМ; от 25 до 30 мМ; от 30 до 35 мМ; от 35 до 40 мМ; от 40 до 45 мМ; от 45 до 50 мМ; от 50 до 55 мМ; от 55 до 60 мМ; от 60 до 65 мМ, и по меньшей мере одно из гидролизата хлопковых семян, дексаметазона, ManNAc и D-(+)-галактозы.



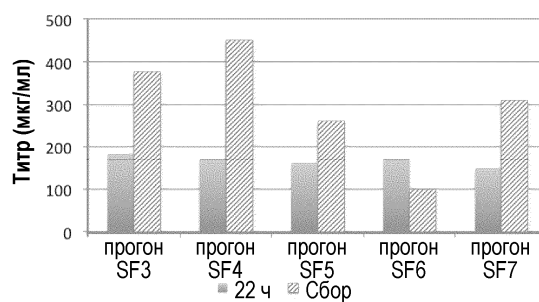
Фиг. 1



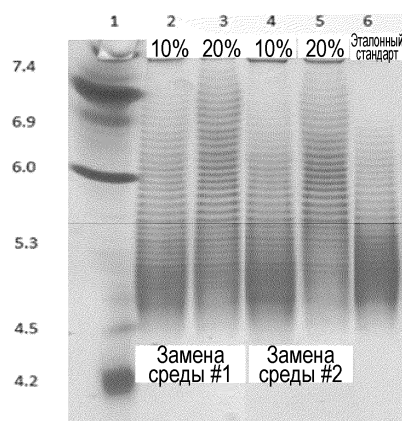
Фиг. 2



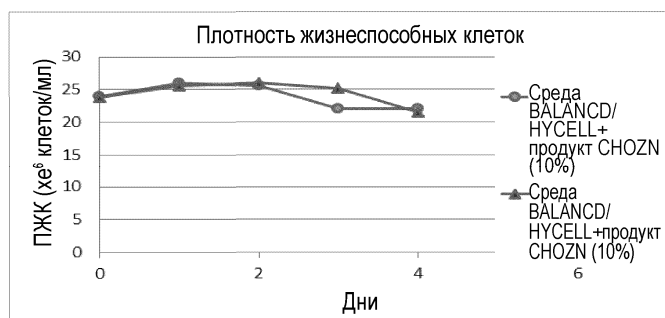
Фиг. 3



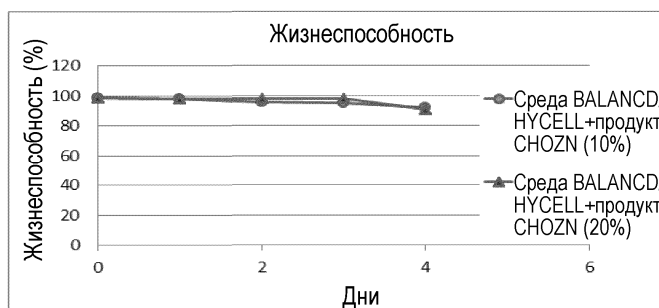
Фиг. 4



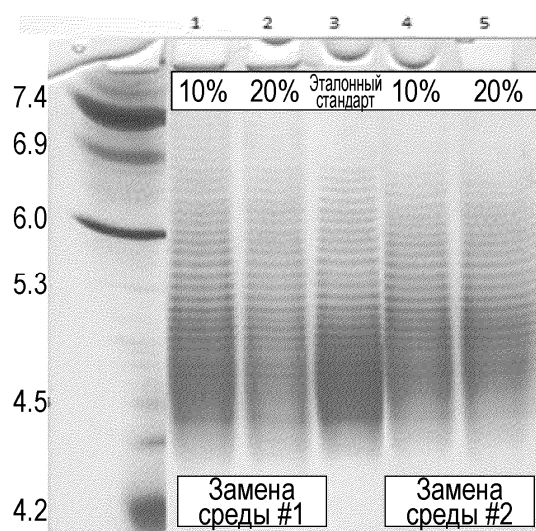
Фиг. 5



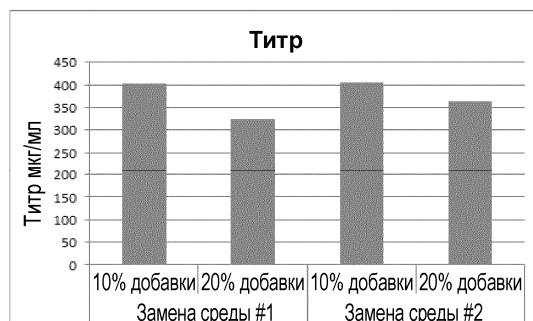
Фиг. 6



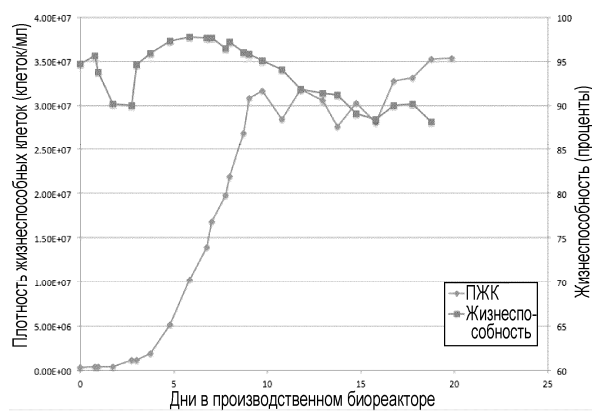
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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