

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012157307/10, 26.05.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
28.05.2010 US 61/349,727

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2014 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 28.12.2012(86) Заявка РСТ:
US 2011/038191 (26.05.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/150241 (01.12.2011)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(72) Автор(ы):

**ЧЖОУ Мэйся (US),
СНЕДЕКОР Брэдли Ричард (US),
НГ Чи Кин Домингос (US),
ШЭНЬ Эми (US)**(54) **СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ ЛАКТАТА И УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ПОЛИПЕПТИДА ПУТЕМ
ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И КИНАЗЫ
ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

(57) Формула изобретения

1. Способ снижения продукции лактата в культивируемых клетках, причем способ содержит культивирование клеток, содержащих последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую малую интерферирующую РНК (siRNA), специфичную для лактатдегидрогеназы (LDH), и последовательность второй гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для пируватдегидрогеназкиназы (PDHK), где последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с первым промотором и последовательность второй гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана со вторым промотором.

2. Способ по п.1, в котором LDH представляет собой LDHa.

3. Способ по п.1, в котором культивируемые клетки дополнительно содержат последовательность третьей гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для второй PDHK, и последовательность третьей гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с третьим промотором.

4. Способ по п.3, в котором культивируемые клетки дополнительно содержат последовательность четвертой гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для третьей PDHK, и последовательность четвертой гетерологичной

нуклеиновой кислоты функционально связана с четвертым промотором.

5. Способ по п.4, в котором культивируемые клетки дополнительно содержат последовательность пятой гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для пятой PDHK, и последовательность пятой гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с пятым промотором.

6. Способ по какому-либо из п.п.1, 3, 4 и 5, в котором PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1, PDHK2, PDHK3 и PDHK4.

7. Способ по какому-либо из п.п.1, 3 и 4, в котором PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1, PDHK2 и PDHK3.

8. Способ по п.1 или 3, в котором PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1 и PDHK2.

9. Способ по п.1 или 3, в котором PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1 и PDHK3.

10. Способ по п.1 или 3, в котором PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK2 и PDHK3.

11. Способ по п.4, в котором LDH представляет собой LDH α , первая PDHK представляет собой PDHK1, вторая PDHK представляет собой PDHK2 и третья PDHK представляет собой PDHK3.

12. Способ по какому-либо из п.п.1, 3, 4 и 5, в котором культивируемые клетки вырабатывают гетерологичный полипептид.

13. Способ по п.12, в котором гетерологичный полипептид представляет собой антитело.

14. Способ по п.4, в котором средняя скорость продукции лактата у культивируемых клеток меньше, чем около 0,02 мг/10⁶ клеток/день со знаком минус.

15. Способ по п.4, в котором культивируемые клетки обладают специфической выработкой по меньшей мере на около 75% выше, чем культивируемые клетки в отсутствие последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты, содержащей PDHK и LDH.

16. Способ по п.4, в котором культивируемые клетки обладают осмолярностью меньше, чем около 300 мОсм.

17. Способ по п.4, в котором культивируемые клетки обладают выработкой полипептида по меньшей мере на около 68% выше, чем культивируемые клетки в отсутствие последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты, содержащей PDHK и LDH.

18. Способ по п.12 или 13, в котором культивируемые клетки представляют собой клетки млекопитающих.

19. Способ сайленсинга или снижения в культивируемой клетке транскрипции лактатдегидрогеназы (LDH) и киназы пируватдегидрогеназы (PDHK), содержащий: введение в клетку вектора, содержащего последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую малую интерферирующую РНК (siRNA), специфичную для LDH, и последовательность второй гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для PDHK, где последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с первым промотором, и последовательность второй гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана со вторым промотором, причем siRNA экспрессируются, таким образом, приводя к сайленсингу или снижению транскрипции генов LDH и PDHK.

20. Способ создания клетки, в культуре которой наблюдается сниженная продукция лактата, содержащий введение в клетку вектора, содержащего последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую малую интерферирующую РНК (siRNA), специфичную для LDH, и последовательность второй гетерологичной

нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для PDHK, где последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с первым промотором, и последовательность второй гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана со вторым промотором.

21. Клетки в культуре, которые обладают средней скоростью продукции лактата меньше, чем около $0,02 \text{ мг}/10^6$ клеток/день со знаком минус.

22. Клетки в культуре, которые обладают специфической выработкой по меньшей мере на около 75% выше, чем культивируемые клетки в отсутствие одной или нескольких последовательностей гетерологичных нуклеиновых кислот, содержащих одну или несколько PDHK и LDH.

23. Клетки в культуре, которые обладают осмолярностью меньше, чем около 300 мОсм.

24. Клетки в культуре, содержащие последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую первую малую интерферирующую РНК (siRNA), специфичную для лактатдегидрогеназы (LDH), и последовательность второй гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую siRNA, специфичную для киназы пируватдегидрогеназы (PDHK), где последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с первым промотором, и последовательность второй гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана со вторым промотором.

25. Клетки по п.24, где клетки дополнительно содержат последовательность третьей гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для второй PDHK, и последовательность третьей гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с третьим промотором.

26. Клетки по п.25, где клетки дополнительно содержат последовательность четвертой гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для третьей PDHK, и последовательность четвертой гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с четвертым промотором.

27. Клетки по п.26, где клетки дополнительно содержат последовательность пятой гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для пятой PDHK, и последовательность пятой гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с пятым промотором.

28. Клетки по какому-либо из пп.24, 25, 26 и 27, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1, PDHK2, PDHK3 и PDHK4.

29. Клетки по какому-либо из пп.24, 25 и 26, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1, PDHK2 и PDHK3.

30. Клетки по п.24 или 25, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1 и PDHK2.

31. Клетки по п.24 или 25, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1 и PDHK3.

32. Клетки по п.24 или 25, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK2 и PDHK3.

33. Клетки по п.26, где LDH представляет собой LDHa, первая PDHK представляет собой PDHK1, вторая PDHK представляет собой PDHK2 и третья PDHK представляет собой PDHK3.

34. Клетки по п.24, где клетки вырабатывают гетерологичный полипептид.

35. Клетки по п.34, где гетерологичный полипептид представляет собой антитело.

36. Клетки по п.26, клетки обладают средней скоростью продукции лактата меньше, чем около $0,02 \text{ мг}/10^6$ клеток/день со знаком минус.

37. Клетки по п.26, где клетки обладают специфической выработкой по меньшей мере на около 75% выше, чем клетки в отсутствие последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты, содержащей LDH и PDHK.

38. Клетки по п.26, где клетки обладают осмолярностью меньше, чем около 300 мОсм.

39. Клетки по п.26, где клетки обладают выработкой полипептида по меньшей мере на около 68% выше, чем клетки в отсутствие последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты, содержащей LDH и PDHK.

40. Клетки по п.34 или 35, где клетки представляют собой клетки млекопитающих.

41. Вектор, содержащий последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую малую интерферирующую РНК (siRNA), специфичную для лактатдегидрогеназы (LDH), и последовательность второй гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую siRNA, специфичную для киназы пируватдегидрогеназы (PDHK), где последовательность первой гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана с первым промотором и последовательность второй гетерологичной нуклеиновой кислоты функционально связана со вторым промотором.

42. Способ снижения продукции лактата в культивируемых клетках, причем способ содержит культивирование клеток, экспрессирующих а) малую интерферирующую РНК (siRNA), специфичную для лактатдегидрогеназы (LDH), и b) siRNA, специфичную для киназы пируватдегидрогеназы (PDHK).

43. Способ по п.42, в котором культивируемые клетки дополнительно экспрессируют siRNA, специфичную для второй PDHK.

44. Способ по п.43, в котором культивируемые клетки дополнительно экспрессируют siRNA, специфичную для третьей PDHK.

45. Способ по п.43, в котором культивируемые клетки дополнительно экспрессируют siRNA, специфичную для четвертой PDHK.

46. Способ по п.44, в котором культивируемые клетки обладают выработкой полипептида по меньшей мере на около 68% выше, чем культивируемые клетки в отсутствие siRNA, специфичных для LDH и PDHK.