

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

(21)(22) Заявка: 2017145002, 20.05.2016

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
22.05.2015 EP 15168934.6

(43) Дата публикации заявки: 24.06.2019 Бюл. № 18

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.12.2017(86) Заявка РСТ:
EP 2016/061440 (20.05.2016)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/188905 (01.12.2016)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

ЦСЛ БЕРИНГ ЛЕНГНАУ АГ (CH)

(72) Автор(ы):

ШУЛЬТЕ Штефан (DE),
БЕЛЬТЦ Ханс-Вильгельм (DE),
ПЕСТЕЛЬ Забине (DE),
ВАЙМЕР Томас (DE),
ПЕЛЬЦИНГ Маттиас (AU)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА

(57) Формула изобретения

1. Способ продуцирования гликопротеина, содержащего N-гликаны с увеличенным сиалилированием, при этом способ включает (i) обеспечение клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий усеченный фактор фон Виллебранда (VWF), и (ii) культивирование указанных клеток при температуре меньшей, чем 36,0°C.

2. Способ продуцирования димера гликопротеина, содержащего усеченный фактор фон Виллебранда (VWF), или увеличения димеризации указанного гликопротеина, при этом способ включает (i) обеспечение клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность гликопротеина, и (ii) культивирование указанных клеток при температуре меньшей, чем 36,0°C.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором клетки дополнительно содержат рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую сиалилтрансферазу, предпочтительно α -2,6-сиалилтрансферазу или α -2,3-сиалилтрансферазу.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором перед стадией (ii) клетки культивируют при температуре 37,0 $\pm$ 1,0°C, и стадия (ii) включает культивирование клеток при температуре 34,0 $\pm$ 2,0°C.

5. Способ продуцирования гликопротеина, содержащего N-гликаны с увеличенным сиалилированием, который включает (i) обеспечение клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий усеченный фактор фон Виллебранда

(VWF), и рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую α -2,6-сиалилтрансферазу, и (ii) культивирование клеток в условиях, которые обеспечивают экспрессию гликопротеина и α -2,6-сиалилтрансферазы.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий (i) подвергание гликопротеина, полученного в любом одном из предшествующих пунктов, ионообменной хроматографии, посредством которой гликопротеин с высокой степенью сиалилирования отделяют от гликопротеина с низкой степенью сиалилирования; и сбор фракций, элюируемых из ионообменной колонки, имеющих высокую степень сиалилирования; или (ii) контактирование гликопротеина, полученного в любом одном из предшествующих пунктов, с сиалилтрансферазой и донорной сиаловой кислотой *in vitro*.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где, в среднем, по меньшей мере 75% N-гликанов полученного гликопротеина содержат по меньшей мере один фрагмент сиаловой кислоты.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где, в среднем, по меньшей мере 50% полученного гликопротеина присутствуют в виде димера.

9. Гликопротеин, получаемый способом по любому из предшествующих пунктов

10. Гликопротеин, содержащий усеченный фактор фон Виллебранда (VWF), в котором указанный усеченный VWF обладает способностью к связыванию с Фактором VIII (FVIII), и где указанный гликопротеин содержит N-гликаны

i) где по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85% указанных N-гликанов содержат, в среднем, по меньшей мере один фрагмент сиаловой кислоты и/или

ii) где менее чем 35% указанных N-гликанов содержат, в среднем, два или более концевых и несиалилированных остатков галактозы и/или

iii) где менее чем 6% указанных N-гликанов содержат, в среднем, три или более концевых и несиалилированных остатков галактозы.

11. Гликопротеин по п. 10, в котором по меньшей мере 70% указанных N-гликанов содержат, в среднем, по меньшей мере один фрагмент α -2,6-сиаловой кислоты или по меньшей мере один фрагмент α -2,3-сиаловой кислоты.

12. Гликопротеин по любому из пп. 9-11, в котором усеченный VWF содержит (a) аминокислоты от 776 до 805 из SEQ ID NO:9 или (b) аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере с 90% аминокислот от 776 до 805 из SEQ ID NO:9.

13. Гликопротеин по любому из пп. 9-12, в котором усеченный VWF содержит (a) аминокислоты от 764 до 1242 из SEQ ID NO:9, (b) аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере с 90% аминокислот от 764 до 1242 из SEQ ID NO:9, или (c) фрагмент (a) или (b).

14. Гликопротеин по любому из пп. 9-13, дополнительно содержащий продлевающий время полужизни гетерологичный полипептид, гибридизированный с VWF, и/или продлевающий время полужизни фрагмент, конъюгированный с гликопротеином.

15. Гликопротеин по любому из пунктов 9-14, в котором гликопротеин является димером.

16. Димерный гликопротеин по п. 15, в котором аффинность указанного димерного гликопротеина к FVIII является более высокой, чем аффинность мономерного гликопротеина к указанному FVIII, в котором указанный мономерный гликопротеин имеет такую же аминокислотную последовательность как димерный гликопротеин.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая гликопротеин по любому из пп. 9-16 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, в которой по меньшей мере 50%

гликопротеинов в композиции присутствуют в виде димеров.

19. Гликопротеин по любому из пп. 9-16 для применения при лечении расстройства свертывания крови, указанное лечение включает введение субъекту эффективного количества указанного гликопротеина и эффективного количества FVIII, где гликопротеин вводят внутривенно или подкожно, и FVIII вводят внутривенно или подкожно.

20. Гликопротеин для применения по п. 19, где среднее время удержания (MRT) FVIII увеличивается и/или выведение FVIII уменьшается посредством совместного введения гликопротеина, в сравнении с лечением с использованием одного FVIII; и/или, где частота введения FVIII снижается в сравнении с лечением с использованием одного FVIII.

21. Фармацевтический набор, содержащий (i) FVIII и (ii) гликопротеин по любому из пп. 9-16, для одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении расстройства свертывания крови.

RU 2017145002 A

RU 2017145002 A