(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-534814
(P2020-534814A)
(43)公表日　令和2年12月3日(2020.12.3)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	ZNAC	4B064
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		
C12N 15/12	(2006.01)	C12N	15/12		
C12N 15/53	(2006.01)	C12N	15/53		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 40 頁）

(21)出願番号　特願2020-514526 (P2020-514526)
(86)(22)出願日　平成30年9月4日(2018.9.4)
(85)翻訳文提出日　令和2年4月30日(2020.4.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/049391
(87)国際公開番号　WO2019/050857
(87)国際公開日　平成31年3月14日(2019.3.14)
(31)優先権主張番号　62/554,825
(32)優先日　平成29年9月6日(2017.9.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/614,758
(32)優先日　平成30年1月8日(2018.1.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71)出願人　520077827
エアウェイ・セラピューティクス・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国・オハイオ・４５２４９・シンシナティ・コンリー・ロード・１１８０４・スイート・＃１７５
(71)出願人　506274888
グリコトープ　ゲーエムベーハー
ドイツ連邦共和国　１３１２５　ベルリン，ロベルト－レースル－シュトラーセ　１０
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】サーファクタントタンパク質Ｄ（ＳＰ－Ｄ）を調製するための方法、組成物、及び細胞

(57)【要約】
本明細書で提供される方法及び組成物の一部の実施形態は、サーファクタントタンパク質D(SP-D)の調製に関する。一部の実施形態は、ある特定の細胞株におけるヒトSP-Dの発現、及びそのような細胞株からのヒトSP-Dの精製を含む。一部の実施形態は、ヒトSP-Dのある特定のオリゴマー形態の調製を含む。

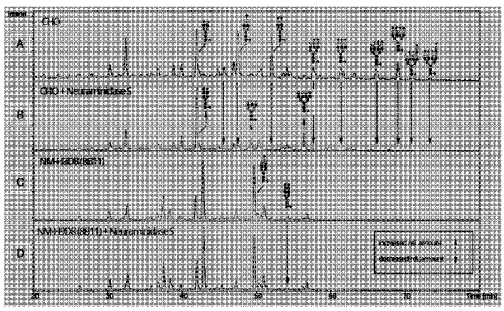


FIG. 10

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトサーファクタントタンパク質D(SP-D)ポリペプチド組成物を生成するための方法であって、
(a)SP-Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをヒト哺乳動物細胞に導入する工程、
(b)SP-Dポリペプチドが発現する条件下で細胞を培養する工程、及び
(c)発現したSP-Dポリペプチドを細胞から単離する工程
を含む方法。
【請求項２】
細胞がヒト骨髄性白血病細胞に由来する、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
細胞が、NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12、及びNM-F9からなる群から選択される、請求項2に記載の方法。
【請求項４】
細胞がNM-H9D8細胞である、請求項3に記載の方法。
【請求項５】
ポリヌクレオチドが野生型SP-Dポリペプチドリーダー配列をコードする、請求項1に記載の方法。
【請求項６】
ポリヌクレオチドが配列番号03を含む、請求項5に記載の方法。
【請求項７】
ポリヌクレオチドが配列番号02を含む、請求項5に記載の方法。
【請求項８】
ポリヌクレオチドが、配列番号05を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項5に記載の方法。
【請求項９】
ポリヌクレオチドが、配列番号04を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項5に記載の方法。
【請求項１０】
ポリヌクレオチドが、野生型T細胞受容体(TCR)ポリペプチドリーダー配列をコードする、請求項1に記載の方法。
【請求項１１】
ポリヌクレオチドが配列番号08を含む、請求項10に記載の方法。
【請求項１２】
ポリヌクレオチドが配列番号07を含む、請求項10に記載の方法。
【請求項１３】
ポリヌクレオチドが、配列番号10を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項10に記載の方法。
【請求項１４】
ポリヌクレオチドが、配列番号09を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項10に記載の方法。
【請求項１５】
SP-Dポリペプチドが多型位置に残基を含み、前記残基が、Met11/31、Thr160/180、Ser270/290、及びAla286/306からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
【請求項１６】
SP-DポリペプチドがMet11/31を含む、請求項15に記載の方法。
【請求項１７】
SP-Dポリペプチドが、Met11/31、Thr160/180、Ser270/290、及びAla286/306を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項１８】
発現したSP-Dポリペプチドの集団を単離する工程を更に含み、各発現したSP-Dポリペプチドがn-グリコシル化部位で結合した複合型炭水化物を含み、集団が以下の特徴:
(i)少なくとも70%の複合型炭水化物がコアフコースを含む、
(ii)少なくとも10%の複合型炭水化物が少なくとも1つのシアル酸残基を含む、
(iii)少なくとも50%の複合型炭水化物が少なくとも二分岐炭水化物構造を含む、
(iv)少なくとも10%の複合型炭水化物が二分枝N-アセチルグルコサミンを含む、
(v)10%未満の炭水化物が高マンノース型構造である、及び
(vi)検出可能な量のα2,6-結合シアル酸残基
を含むグリコシル化パターンを有する、請求項1に記載の方法。
【請求項１９】
集団が以下の特徴:
(i)少なくとも20%の複合型炭水化物が二分枝N-アセチルグルコサミンを含む、及び
(iii)少なくとも85%の複合型炭水化物がコアフコースを含む、
のうちの1つ又は複数を含むグリコシル化パターンを有する、請求項18に記載の方法。
【請求項２０】
ポリヌクレオチドがジヒドロ葉酸レダクターゼポリペプチドをコードする、請求項1に記載の方法。
【請求項２１】
細胞を培養する工程が、細胞を葉酸代謝拮抗薬と接触させることを含む、請求項1に記載の方法。
【請求項２２】
SP-Dポリペプチドの発現が、葉酸代謝拮抗薬の濃度を増加させることによって増加する、請求項21に記載の方法。
【請求項２３】
葉酸代謝拮抗薬がメトトレキセートを含む、請求項21に記載の方法。
【請求項２４】
細胞が灌流バイオリアクターで培養される、請求項1に記載の方法。
【請求項２５】
細胞が連続培養で培養される、請求項1に記載の方法。
【請求項２６】
細胞を培養する工程が、pH7.2、40%及び/又は20%の溶存酸素、温度37℃を有する増殖培地を維持することを含む、請求項1に記載の方法。
【請求項２７】
溶存酸素が35%未満、好ましくは30%である、請求項26に記載の方法。
【請求項２８】
発現したSP-Dポリペプチドを細胞から単離する工程が、細胞を含有する培養培地から細胞上清を調製することを含む、請求項1に記載の方法。
【請求項２９】
リーダーポリペプチド、ヒトサーファクタントタンパク質D(SP-D)ポリペプチド、及びジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする発現ベクター。
【請求項３０】
リーダーポリペプチドが野生型SP-Dポリペプチドリーダー配列である、請求項29に記載のベクター。
【請求項３１】
リーダーポリペプチドが配列番号05を含む、請求項30に記載のベクター。
【請求項３２】
ポリヌクレオチドが、配列番号04を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項30に記載のベクター。
【請求項３３】

リーダーポリペプチドが野生型T細胞受容体(TCR)ポリペプチドリーダー配列である、請求項29に記載のベクター。
【請求項３４】
リーダーポリペプチドが配列番号10を含む、請求項33に記載のベクター。
【請求項３５】
配列番号02及び配列番号07からなる群から選択される配列を有するポリヌクレオチドを含む、請求項29に記載のベクター。
【請求項３６】
配列番号04及び配列番号09からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項29に記載のベクター。
【請求項３７】
請求項29から36のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む不死化ヒト細胞。
【請求項３８】
ヒト骨髄性白血病細胞に由来する、請求項37に記載の細胞。
【請求項３９】
NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12、及びNM-F9からなる群から選択される、請求項38に記載の細胞。
【請求項４０】
NM-H9D8細胞である、請求項39に記載の細胞。
【請求項４１】
NM-H9D8(8B11)細胞である、請求項39に記載の細胞。
【請求項４２】
ヒトサーファクタントタンパク質D(SP-D)ポリペプチドをコードする発現ベクターを含む不死化ヒト細胞であって、ヒト骨髄性白血病細胞に由来する不死化ヒト細胞。
【請求項４３】
発現ベクターがリーダーポリペプチドを更にコードする、請求項42に記載の細胞。
【請求項４４】
リーダーポリペプチドが野生型SP-Dポリペプチドリーダー配列である、請求項43に記載の細胞。
【請求項４５】
ポリペプチドが配列番号05のアミノ酸配列を含む、請求項44に記載の細胞。
【請求項４６】
リーダーポリペプチドが野生型T細胞受容体(TCR)ポリペプチドリーダー配列である、請求項43に記載の細胞。
【請求項４７】
リーダーポリペプチドが配列番号10のアミノ酸配列を含む、請求項46に記載の細胞。
【請求項４８】
ヒトサーファクタントタンパク質D(SP-D)ポリペプチドが、配列番号04の22から376位のアミノ酸配列を含む、請求項42に記載の細胞。
【請求項４９】
発現ベクターがジヒドロ葉酸レダクターゼを更にコードする、請求項42に記載の細胞。
【請求項５０】
NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12、及びNM-F9からなる群から選択される、請求項42に記載の細胞。
【請求項５１】
NM-H9D8細胞である、請求項50に記載の細胞。
【請求項５２】
NM-H9D8(8B11)細胞である、請求項50に記載の細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、それぞれその全体が参照によって組み込まれる、2018年1月8日に出願した「METHODS, COMPOSITIONS AND CELLS FOR PREPARING SURFACTANT PROTEIN D (SP-D)」という名称の米国仮出願第62/614758号、及び2017年9月6日に出願した「METHODS, COMPOSITIONS AND CELLS FOR PREPARING SURFACTANT PROTEIN D (SP-D)」という名称の米国仮出願第62/554825号の優先権を主張する。
【０００２】
配列表の参照
本出願は電子形式の配列表と共に出願されている。配列表は、2018年8月31日に作成されたおよそ13KbのサイズのAIRWY007WOSEQという名称のファイルとして提供される。電子形式での配列表の情報は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【０００３】
本明細書で提供される方法及び組成物の一部の実施形態は、サーファクタントタンパク質D(SP-D)の調製に関する。一部の実施形態は、ある特定の細胞株におけるヒトSP-Dの発現、及びそのような細胞株からのヒトSP-Dの精製を含む。一部の実施形態は、ヒトSP-Dのある特定のオリゴマー形態の調製を含む。
【背景技術】
【０００４】
哺乳動物の肺サーファクタントは、タンパク質(10%)と、主要な脂質成分であるジパルミトイルホスファチジルコリンを含む脂質(90%)との混合物である(Zuo YY等、Biochim Biophys Acta (2008) 1778:1947～77頁)。肺サーファクタントの主な機能は、肺内の最小の表面張力を確保して、呼吸中の虚脱を回避することである。更に、吸入された病原体と相互作用することによって、肺サーファクタントは宿主防御にも関与する(Clements JA. Am Rev Respir Dis (1977) 115:67～71頁)。したがって、肺サーファクタント欠損は、喘息、細気管支炎、呼吸窮迫症候群(RDS)、嚢胞性線維症、及び肺炎等の肺疾患と関連する(Griese M. Eur Respir J (1999) 13:1455～76頁)。サーファクタント製剤は、毎年世界で約150万人の早産児に影響を与えるRDSの治療に適応される。呼吸窮迫症候群は、未熟児の肺の構造が未発達であることによって引き起こされる主要な肺サーファクタント欠損症であり、これにより、呼吸が困難となり、ガス交換が阻害され、肺胞虚脱が促進される(Notter RH. Lung Surfactants. Basic Science and Clinical Applications. New York、NY: Marcel Dekker Inc.社)。しかしながら、現在のサーファクタント調製物はサーファクタントタンパク質D(SP-D)を欠くため、肺が感染している場合、又は炎症性若しくは酸化的合併症が存在する場合は、治療がより困難となる。したがって、複合的な肺疾患の上首尾の治療には、組成物が天然の肺サーファクタントに可能な限り厳密に一致しているサーファクタント製剤の生成が必要である(Robertson B等、Biochim Biophys Acta (1998) 1408:346～61頁)。
【０００５】
SP-Dは、喘息、嚢胞性線維症、及び喫煙誘発性肺気腫等の慢性肺疾患に対処する抗炎症活性及び抗菌活性を提供することによって、肺の自然免疫系における役割を有している(Clark H等、Immunobiology (2002) 205:619～31頁)。未熟新生仔ヒツジに基づくデータは、100mg/kgのSurvanta(登録商標)(米国で利用可能な天然のサーファクタント)と組み合わせた約2～3mg/kgの組換えヒトSP-Dの投与が、Survanta(登録商標)単独よりもエンドトキシンショックの予防、及び換気によって引き起こされる肺炎症の軽減に効果的であることを示唆している(Ikegami M等、Am J Respir Crit Care Med (2006) 173:1342～7頁、Sato A等、Am J Respir Crit Care Med (2010) 181:1098～105頁)。
【０００６】
従来、SP-Dは気管支肺胞洗浄液又は羊水の上清から単離されるが、大半のSP-Dは、SP-Dの親水性特性のためもあり、精製中に失われる(Dodagatta-Marri E等、Methods Mol Biol (2014) 100:273～90頁)。肺サーファクタント製剤を補うために天然のSP-Dを使用すると

、内在性サーファクタントのより高次の多量体化により、病原体の表面の炭水化物リガンドへのSP-D結合部位の数が増加し、強力な細菌及びウイルス凝集効果が達成されるため、治療効率を確保することができる(White M等、J Immunol (2008) 181:7936～43頁)。適切なオリゴマー化状態はまた、宿主免疫応答の調節のための受容体認識及び受容体介在シグナル伝達(Yamoze M等、J Biol Chem (2008) 283:35878～35888頁)、並びにサーファクタント恒常性の維持(Zhang L等、J Biol Chem (2001) 276:19214～19219頁)にも必要である。

【０００７】

低いSP-D収率及び可変的なオリゴマー化状態のために、医薬用SP-Dの産生に天然源を使用することは困難である(Strong P等、J Immunol Methods (1998) 220:139～49頁)。これらの限定のうちの一部を克服するために、組換えSP-Dが、均一な組換えSP-D製剤の生成のための大規模プラットフォームを潜在的に提供する微生物又は哺乳動物細胞株中で産生可能である。しかしながら、組換えヒトSP-D(rhSP-D)を一般的に使用される哺乳動物細胞株中で商業活動に十分なレベルまで発現させることは困難である。それは、該タンパク質が効率的に合成されず、収率が典型的には1リットル当たり精製タンパク質2mg未満であるためである。収率は非哺乳動物系における方が高い傾向にあるが、タンパク質のグリコシル化形態も産生せず、ヒトグリコシル化パターンを有するタンパク質も産生しないという短所を有する酵母又は細菌等の系では、SP-Dの切断型バリアントのみの発現が試みられている(Salgado D等、Front Immunol (2014) 5:623、doi: 10.3389/fimmu.2014.00623)。更に今日までのところ、組換え及び天然のヒトSP-Dで見られるオリゴマー化状態の可変性を制御することは可能ではない。発現系が、一貫して安定なレベルの、天然のSP-Dにおいて観察されるより高次の多量体化状態を有するrhSP-Dを再現可能に産生することができない限り、そのような調製物の有効性が低下する可能性が存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】米国特許第9,051,356号

【特許文献２】米国特許第9,359,427号

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Zuo YY等、Biochim Biophys Acta (2008) 1778:1947～77頁

【非特許文献２】Clements JA. Am Rev Respir Dis (1977) 115:67～71頁

【非特許文献３】Griese M. Eur Respir J (1999) 13:1455～76頁

【非特許文献４】Notter RH. Lung Surfactants. Basic Science and Clinical Applications. New York、NY: Marcel Dekker Inc.社

【非特許文献５】Robertson B等、Biochim Biophys Acta (1998) 1408:346～61頁

【非特許文献６】Clark H等、Immunobiology (2002) 205:619～31頁

【非特許文献７】Ikegami M等、Am J Respir Crit Care Med (2006) 173:1342～7頁

【非特許文献８】Sato A等、Am J Respir Crit Care Med (2010) 181:1098～105頁

【非特許文献９】Dodagatta-Marri E等、Methods Mol Biol (2014) 100:273～90頁

【非特許文献１０】White M等、J Immunol (2008) 181:7936～43頁

【非特許文献１１】Yamoze M等、J Biol Chem (2008) 283:35878～35888頁

【非特許文献１２】Zhang L等、J Biol Chem (2001) 276:19214～19219頁

【非特許文献１３】Strong P等、J Immunol Methods (1998) 220:139～49頁

【非特許文献１４】Salgado D等、Front Immunol (2014) 5:623、doi: 10.3389/fimmu.2014.00623

【非特許文献１５】Crouch E.等(1994) J Biol Chem、269:17311～9頁

【非特許文献１６】Hakansson K等、Protein Sci (2000) 9:1607～17頁

【非特許文献１７】Crouch E. Respir Res (2000) 1:93～108頁

【非特許文献１８】Crouch E.等(2006) J Biol Chem、281:18008～14頁

【非特許文献１９】R. Arroyo等、J Mol Biol (2018) 430: 1495～1509頁
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本明細書で提供される方法及び組成物の一部の実施形態は、ヒトサーファクタントタンパク質D(SP-D)ポリペプチド組成物を生成するための方法であって、(a)SP-Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをヒト哺乳動物細胞に導入する工程、(b)SP-Dポリペプチドが発現する条件下で細胞を培養する工程、及び(c)発現したSP-Dポリペプチドを細胞から単離する工程を含む方法を含む。
【００１１】
一部の実施形態では、細胞はヒト骨髄性白血病細胞に由来する。一部の実施形態では、細胞は、NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12、及びNM-F9からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞はNM-H9D8細胞である。
【００１２】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは野生型SP-Dポリペプチドリーダー配列をコードする。
【００１３】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは配列番号03を含む。
【００１４】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは配列番号02を含む。
【００１５】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号05を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。
【００１６】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号04を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。
【００１７】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、野生型T細胞受容体(TCR)ポリペプチドリーダー配列をコードする。
【００１８】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは配列番号08を含む。
【００１９】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは配列番号07を含む。
【００２０】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号10を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。
【００２１】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号09を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。
【００２２】
一部の実施形態では、SP-Dポリペプチドは多型位置に残基を含み、残基は、Met11/31、Thr160/180、Ser270/290、及びAla286/306からなる群から選択される。一部の実施形態では、SP-DポリペプチドはMet11/31を含む。一部の実施形態では、SP-Dポリペプチドは、Met11/31、Thr160/180、Ser270/290、及びAla286/306を含む。
【００２３】
一部の実施形態はまた、発現したSP-Dポリペプチドの集団を単離する工程も含み、各発現したSP-DポリペプチドはN-グリコシル化部位で結合した複合型炭水化物を含み、集団は以下の特徴:(i)少なくとも70%の複合型炭水化物はコアフコースを含む、(ii)少なくとも10%の複合型炭水化物は少なくとも1つのシアル酸残基を含む、(iii)少なくとも50%の複合型炭水化物は少なくとも二分岐(biantennary)炭水化物構造を含む、(iv)少なくとも10%の

複合型炭水化物は二分枝(bisecting)N-アセチルグルコサミンを含む、(v)10%未満の炭水化物は高マンノース型構造である、及び(vi)検出可能な量のα2,6-結合シアル酸残基、を含むグリコシル化パターンを有する。

【００２４】

一部の実施形態では、集団は以下の特徴:(i)少なくとも20%の複合型炭水化物は二分枝N-アセチルグルコサミンを含む、及び(ii)少なくとも85%の複合型炭水化物はコアフコースを含む、のうちの1つ又は複数を含むグリコシル化パターンを有する。

【００２５】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはジヒドロ葉酸レダクターゼポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、細胞を培養する工程は、細胞を葉酸代謝拮抗薬と接触させることを含む。一部の実施形態では、SP-Dポリペプチドの発現は、葉酸代謝拮抗薬の濃度を増加させることによって増加する。一部の実施形態では、葉酸代謝拮抗薬はメトトレキセートを含む。

【００２６】

一部の実施形態では、細胞は灌流バイオリアクターで培養される。

【００２７】

一部の実施形態では、細胞は連続培養で培養される。

【００２８】

一部の実施形態では、細胞を培養する工程は、pH7.2、40%及び/又は20%の溶存酸素、温度37℃を有する増殖培地を維持することを含む。一部の実施形態では、溶存酸素は35%未満、好ましくは30%である。

【００２９】

一部の実施形態では、発現したSP-Dポリペプチドを細胞から単離する工程は、細胞を含有する培養培地から細胞上清を調製することを含む。

【００３０】

本明細書で提供される方法及び組成物の一部の実施形態は、リーダーポリペプチド、ヒトサーファクタントタンパク質D(SP-D)ポリペプチド、及びジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする発現ベクターを含む。

【００３１】

一部の実施形態では、リーダーポリペプチドは野生型SP-Dポリペプチドリーダー配列である。一部の実施形態では、リーダーポリペプチドは配列番号05を含む。

【００３２】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号04を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。

【００３３】

一部の実施形態では、リーダーポリペプチドは野生型T細胞受容体(TCR)ポリペプチドリーダー配列である。一部の実施形態では、リーダーポリペプチドは配列番号10を含む。

【００３４】

一部の実施形態では、ベクターは、配列番号02及び配列番号07からなる群から選択される配列を有するポリヌクレオチドを含む。

【００３５】

一部の実施形態では、ベクターは、配列番号04及び配列番号09からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。

【００３６】

本明細書で提供される方法及び組成物の一部の実施形態は、発現ベクターに関する前述の実施形態のいずれか1つの発現ベクターを含む不死化ヒト細胞を含む。一部の実施形態では、細胞はヒト骨髄性白血病細胞に由来する。一部の実施形態では、細胞は、NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12、及びNM-F9からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞はNM-H9D8細胞である。一部の実施形態では、細胞はNM-H9D8(8B11)細胞である。

【００３７】

本明細書で提供される方法及び組成物の一部の実施形態は、ヒトサーファクタントタンパク質D(SP-D)ポリペプチドをコードする発現ベクターを含む不死化ヒト細胞であって、ヒト骨髄性白血病細胞に由来する不死化ヒト細胞を含む。

【００３８】

一部の実施形態では、発現ベクターはリーダーポリペプチドを更にコードする。一部の実施形態では、リーダーポリペプチドは野生型SP-Dポリペプチドリーダー配列である。一部の実施形態では、ポリペプチドは配列番号05のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リーダーポリペプチドは野生型T細胞受容体(TCR)ポリペプチドリーダー配列である。一部の実施形態では、リーダーポリペプチドは配列番号10のアミノ酸配列を含む。

【００３９】

一部の実施形態では、ヒトサーファクタントタンパク質D(SP-D)ポリペプチドは、配列番号04の22から376位のアミノ酸配列を含む。

【００４０】

一部の実施形態では、発現ベクターはジヒドロ葉酸レダクターゼを更にコードする。

【００４１】

一部の実施形態では、細胞は、NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12、及びNM-F9からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞はNM-H9D8細胞である。一部の実施形態では、細胞はNM-H9D8(8B11)細胞である。

【図面の簡単な説明】

【００４２】

【図１】図1は、SP-D三量体の形成、及びSP-D三量体の構造的特色を示す概略図である。

【図２Ａ】図2Aは、ヒトSP-D、ヒトSP-Dリーダー配列、及びジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターpHBG1Ddhfr_WT_SP-D(7228bp)のマップである。

【図２Ｂ】図2Bは、ヒトSP-D、ヒトT細胞受容体(TCR)リーダー配列、及びジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターpHBG1Ddhfr_TCR_SP-D(7231bp)のマップである。

【図２Ｃ】図2Cは、ヒトSP-D、ヒトSP-Dリーダー配列、及びジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターpHBG1Ddhfr_SFTPD(7228bp)のマップである。

【図３】図3は、様々なメトトレキセート(MTX)濃度で培養されたプールの比生産速度を示す棒グラフである。細胞株プールには、それぞれヒトSP-Dリーダー配列を含有するヒトSP-D発現ベクターをトランスフェクトしたF9細胞、H9D8-E6Q12細胞、及びH9D8細胞である「rhSP-D-F9」、「rhSP-D-Fuc(-)」、「rhSP-D-H9D8」、並びにヒトTCRリーダー配列を含有するヒトSP-D発現ベクターをトランスフェクトしたH9D8細胞である「rhSP-D-TCR-H9D8」が含まれた。

【図４】図4は、生細胞濃度(パネルA)、グルコース濃度(パネルB)、細胞生存率(パネルC)、乳酸濃度(パネルD)を含む、クローンH9D8-P1315-2A5に関して実行したバイオリアクターの培養条件の経時的な変化を示す一連のグラフである。

【図５】図5は、発現細胞からのrhSP-D精製の様々な段階におけるタンパク質を示す、クーマシーブルーを用いて染色したSDS-PAGEゲルの写真である。

【図６】図6は、クローンH9D8-P1315-2A5から精製された様々な濃度のrhSP-Dを用いて細菌が処理された細菌凝集アッセイに関する折れ線グラフであり、SP-D処理が細菌凝集にどのように影響を与えたかを経時的に示す。

【図７】図7は、TLR4受容体経路アッセイにおける、クローンH9D8-P1315-2A5から精製された増加する濃度のrhSP-Dの阻害活性を示す折れ線グラフである。

【図８】図8は、異なる起源の精製されたrhSP-Dから放出され、蛍光検出親水性相互作用超高速クロマトグラフィーに供された蛍光タグ付きN-グリカンのクロマトグラムである。

【図９】図9は、異なる起源のSP-Dから放出され、蛍光検出親水性相互作用超高速クロマトグラフィーに供された蛍光タグ付きO-グリカンのクロマトグラムである。

【図１０】図10は、CHO(パネルA及びパネルB)並びにNM-H9D8(8B11)(パネルC及びパネルD)中で産生された、ノイラミニダーゼS処理されていない(パネルA及びパネルC)並びに処理されている(パネルB及びパネルD)SP-Dから放出され、蛍光検出親水性相互作用超高速クロマトグラフィーに供された蛍光タグ付きN-グリカンのクロマトグラムである。

【発明を実施するための形態】

【００４３】

サーファクタントタンパク質D(SP-D)は、4つのドメイン:分子間ジスルフィド結合の形成に必要とされるシステイン連結N末端領域、三重螺旋コラーゲン領域、αヘリックスコイルドコイル三量体化ネックペプチド、及びC末端カルシウム依存性炭水化物認識ドメイン(CRD)を含むC型(Ca^{2+}依存性)レクチンである(Crouch E.等(1994) J Biol Chem、269:17311～9頁)。単量体は、コラーゲン性領域の三重螺旋へのフォールディング、及びネック領域におけるαヘリックスのコイルドコイルバンドルの集合により三量体を形成する(図1)。これらの三量体は、システインリッチN末端ドメインにおける2つのジスルフィド結合によって安定化する。SP-D三量体は、3本の同一な43kDaのポリペプチド鎖を含む129kDaの総分子量を有する。SP-D三量体は、サイズ及び立体構造によって変化するより高次のオリゴマー化状態を形成することができる。より高次のオリゴマー化状態は、SP-D機能にとって重要であり得る(Hakansson K等、Protein Sci (2000) 9:1607～17頁; Crouch E. Respir Res (2000) 1:93～108頁; Crouch E.等(2006) J Biol Chem、281:18008～14頁)。SP-D三量体のより高次のオリゴマー化状態への会合は、精製及び保存中の環境要因及び条件の影響を受けやすい。SP-Dの大きなオリゴマーの形成に関わる相互作用の経路及び種類はこれまで解明されていない。本明細書で提供される方法及び組成物の一部の実施形態は、ある特定の形態のSP-Dオリゴマーの調製及び精製に関する。

【００４４】

哺乳動物チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞中で産生されるヒトSP-Dは、原子間力顕微鏡観察(AFM)及び電気泳動法によって特性決定される。rhSP-Dの溶液は、三量体、六量体、十二量体、及び4個超の三量体を含む「ファジーボール(fuzzy ball)」として同定されるより大きなオリゴマー種を含む、異なるSP-Dオリゴマー形態の多様な集団を含むことができる。本発明の一部の実施形態では、とりわけ本明細書に記載されるベクター及び/又は宿主細胞及び/又は精製方法を使用した、本明細書に記載されるSP-Dの産生は、結果としてCHO細胞中でのSP-Dの産生と比較して、より高い収率のSP-Dタンパク質、及びより多い量のSP-D十二量体、及びより少ない量のより大きなオリゴマー種を生じさせるということが実証された。本発明の一部の実施形態では、とりわけ本明細書に記載されるベクター及び/又は宿主細胞及び/又は精製方法を使用した、本明細書に記載されるSP-Dの産生は、結果としてCHO細胞中でのrhSP-Dの産生と比較して、より高い収率のSP-Dタンパク質、及びより多い相対量のSP-D十二量体、及びより少ない相対量のより大きなオリゴマー種を生じさせるということが実証された。例えば、収率は最大約5～15倍増加させることができ、SEC HPLCによって測定される精製されたrhSP-D組成物中のSP-D十二量体の相対量は約30%以上増大させることができ、より大きなオリゴマー種の相対量は約30%以上低減させることができた。Q-セファロース及びSuperdex 75カラムを介した細胞培養上清の精製は、十二量体のより大きなオリゴマー種(例えばファジーボール)に対する比を変更しない。したがって、精製されたSP-D組成物中の十二量体及びより大きなオリゴマー種の相対量は、細胞培養上清中のそれらの相対量を表す。

【００４５】

ある特定の発現ベクター及び細胞

一態様では、ヒトSP-Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが提供される。一部の実施形態は、ヒトSP-Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの調製を含む。ヒトSP-Dポリペプチドの多型としては、残基11のATG(Met)→ACG(Thr)、残基25のAGT(Ser)→AGC(Ser)、残基160のACA(Thr)→GCA(Ala)、残基270のTCT(Ser)→ACT(Thr)、及び残基286のGCT(Ala)→GCC(Ala)を挙げることができ、これらの位置は成熟SP-Dポリペプチドにおける位置に関する。一部の実施形態では、SP-Dポリペ

プチドは多型位置においてある特定の残基を含み、残基はMet11/31、Thr160/180、Ser270/290、及びAla286/306から選択され、残基の位置は、成熟SP-Dポリペプチドにおける位置、及びリーダーポリペプチドを有するSP-Dポリペプチドにおける位置に関する。一部の実施形態では、SP-DポリペプチドはMet11/31を含む。一部の実施形態では、SP-Dポリペプチドは、Met11/31、Thr160/180、Ser270/290、及びAla286/306を含む。そのような配列の例はTABLE 1(表1)に提供される。一部の実施形態では、SP-Dは、配列番号02及び配列番号07から選択されるポリヌクレオチドと、そのポリヌクレオチドの全体長に対して少なくとも約80%、90%、95%、99%及び100%、又は前述の数字のいずれかの間の任意の範囲の同一性を有する核酸によってコードされる。一部の実施形態では、SP-Dポリペプチドは、配列番号04及び配列番号09から選択されるポリペプチドと、そのポリヌクレオチドの全体長に対して少なくとも約80%、90%、95%、99%及び100%、又は前述の数字のいずれかの間の任意の範囲の相同性を有する。一部の実施形態では、SP-Dポリペプチドは、配列番号04の22から376位のアミノ酸配列、又はそれと、その参照配列の全体長に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。

【００４６】

一部の実施形態では、発現ベクターは、SP-Dポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の5'に位置するリーダーポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、リーダー配列は野生型T細胞受容体(TCR)リーダー配列又は野生型SP-Dリーダー配列である。そのような配列の例はTABLE 1(表1)に提供される。一部の実施形態では、リーダーポリペプチドは、配列番号03及び配列番号08から選択されるポリヌクレオチドと、そのポリヌクレオチドの全体長に対して少なくとも約80%、90%、95%、99%及び100%、又は前述の数字のいずれかの間の任意の範囲の同一性を有する核酸によってコードされる。一部の実施形態では、リーダーポリペプチドは、配列番号05及び配列番号10から選択されるポリペプチドと、そのポリヌクレオチドの全体長に対して少なくとも約80%、90%、95%、99%及び100%、又は前述の数字のいずれかの間の任意の範囲の相同性を有する。

【００４７】

一部の実施形態では、発現ベクターは、選択遺伝子を有する哺乳動物細胞を選択するのに有用な選択遺伝子を含む。そのような遺伝子の例としては、メトトレキセート等の葉酸代謝拮抗化合物に対する耐性を実現するジヒドロ葉酸レダクターゼ等のタンパク質をコードするものが挙げられる。

【００４８】

一態様では、ヒトSP-Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む1つ又は複数の発現ベクターを含む細胞が提供される。一部の実施形態は、本明細書に記載される1つ又は複数の発現ベクターを含む細胞を含む。そのような細胞の例としては、発現したSP-Dポリペプチドの活性及び/又は安定性を増強するグリコシル化パターンを用いて、発現したSP-Dポリペプチドを修飾することができる哺乳動物細胞が挙げられる。そのような細胞としては、不死化ヒト血液細胞、例えばヒト骨髄性白血病に由来する細胞が挙げられる。そのような細胞の例としては、規定のACCコードの下、ブラウンシュヴァイク(ドイツ)の「DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH社」に寄託されたNM-H9D8(DSM ACC 2806)、NM-H9D8-E6Q12(DSM ACC 2856)、及びNM-F9(DSM ACC 2606)が挙げられる。NM-F9はNemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG社、Robert-Roessle-Str. 10、13125 Berlin (DE)によって2003年8月14日に寄託され、NM-H9D8はGlycotope GmbH社、Robert-Roessle-Str. 10、13125 Berlin (DE)によって2006年9月15日に寄託され、NM-H9D8-E6Q12はGlycotope GmbH社、Robert-Roessle-Str. 10、13125 Berlin (DE)によって2007年8月8日に寄託された。有用な細胞株の更なる例は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第9,051,356号に見出すことができる。一部の実施形態では、ヒトSP-Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む1つ又は複数の発現ベクターを含む細胞は、細胞株NM-H9D8の細胞である。

【００４９】

ヒトSP-Dを産生するためのある特定の方法

一態様では、ヒトSP-Dポリペプチド組成物を生成する方法が提供される。一部の実施形態は、(a)ヒトSP-Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入する工程、(b)SP-Dポリペプチドが発現する条件下で細胞を培養する工程、及び(c)発現したSP-Dポリペプチドを細胞から単離する工程によってヒトSP-Dポリペプチド組成物を生成する方法を含む。SP-Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入する方法は、当技術分野で周知であり、電気穿孔法、陽イオン性脂質、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランを使用するトランスフェクション、或いはアデノウイルス若しくはレトロウイルス、又はそれらの組合せ等のウイルス粒子による感染が挙げられる。一部のそのような方法は、本明細書で提供される発現ベクターを直線化する工程、及び直線化したベクターを細胞にトランスフェクトする工程を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される細胞及び/又は発現ベクターは、ヒトSP-Dポリペプチド組成物を生成する方法に使用される。一部の実施形態では、SP-Dポリペプチドは哺乳動物細胞によって分泌される。これらの実施形態では、発現したSP-Dポリペプチドは、細胞を培養するために使用される細胞培養培地から単離することができる。一部の実施形態では、発現したSP-Dポリペプチドを単離する工程は本明細書に記載されるように行われる。

【００５０】

一部の実施形態では、細胞はヒト骨髄性白血病細胞、例えばNM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12、及びNM-F9細胞株に由来する。

【００５１】

一部の実施形態は、発現ベクターを含む細胞を選択する方法を含む。一部のそのような実施形態は、葉酸代謝拮抗薬、例えばメトトレキセートを用いて細胞を培養する工程を含むことができる。トランスフェクタントはサブクローニング等の方法によって単離することができ、SP-Dを発現する細胞は、当技術分野で周知の方法、例えばELISA、ウェスタンブロット、及びドットブロットと組み合わせた、SP-Dに対する抗体を使用する免疫学的方法によって容易に同定することができる。

【００５２】

一部の実施形態では、増加した濃度でSP-Dを発現するトランスフェクトされた細胞は、培養培地中の葉酸代謝拮抗薬、例えばメトトレキセートの濃度を増加させることによって選択することができる。

【００５３】

一部の実施形態は、SP-Dを発現する細胞を灌流バイオリアクターで培養する工程を含む。一部のそのような実施形態は、細胞を連続発酵によって培養する工程を含むことができる。灌流様式では、新鮮な培地が連続的に供給してもよく、細胞を発酵槽に保持しつつ、無細胞上清をバイオリアクターから取り除いてもよい。細胞を保持するために、異なる諸技法を適用することができる。例えば、ろ過、遠心分離、又は沈降が使用され得る。方法の例は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第9,359,427号に見出すことができる。

【００５４】

SP-Dを培養培地から単離するためのある特定の方法

一態様では、ヒトSP-Dポリペプチドを単離する方法が提供される。一部の実施形態は、発現したSP-Dポリペプチドを培養培地から単離する工程を含む。一実施形態では、単離はクロマトグラフィーを使用することによるものである。クロマトグラフ法の例としては、親和性材料、例えばプロテインA、プロテインG、抗SP-D抗体、レクチンクロマトグラフィー、HISタグ若しくはmycタグ等のSP-Dポリペプチドに導入されるある特定のタグ又は抗原に対する抗体を使用するアフィニティークロマトグラフィー、或いは他のクロマトグラフィー媒体による方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、又はサイズ排除クロマトグラフィーが挙げられる。

【００５５】

一部の実施形態では、細胞上清は、SP-D発現細胞を含む培養培地から調製される。上清

はろ過滅菌されてもよい。一部の実施形態では、SP-Dポリペプチドを含む細胞上清はカラムにかけることができ、結果として得られる溶出液は第2のカラムにかけることができる。一部の実施形態では、SP-Dポリペプチドは、陰イオン交換クロマトグラフィーとそれに続くアフィニティークロマトグラフィーとを使用して単離される。一部の実施形態では、Q-セファロース等の強陰イオン交換クロマトグラフィーマトリックスが陰イオン交換クロマトグラフィーのために使用される。一部の実施形態では、Superdex 75マトリックス等のゲルろ過クロマトグラフィーマトリックスがアフィニティークロマトグラフィーのために使用される。一部の実施形態では、細胞上清は、20mMトリス、50mM NaCl、pH7.4を含む平衡化及び泳動用緩衝液を有するQ-セファロースカラムにかけられる。SP-Dは、20mMトリス、600mM NaCl、pH7.4を含む溶出緩衝液を使用してカラムから溶出させてもよい。一部のそのような実施形態では、Q-セファロースカラム溶出液は約0.2から約0.8mg/mlのSP-Dを含む。

【００５６】

一部の実施形態は、SP-Dを含むQ-セファロースカラム溶出液の画分を第2のカラム、例えばSuperdex75カラムにかける工程を含む。一部の実施形態では、Q-セファロースカラム溶出液は、10mM $CaCl_2$を含有する同じ容量のpH7.4の20mMトリス緩衝液を用いて希釈され、20mMトリス、300mM NaCl、5mM $CaCl_2$、pH7.4を含む平衡化及び泳動用緩衝液を有するSuperdex75カラムにかけられる。SP-Dは、20mMトリス、10mM EDTA、300mM NaCl、pH7.4を含む溶出緩衝液を使用してカラムから溶出させてもよい。一部のそのような実施形態では、溶出液は約0.5から約2mg/mLのSP-Dを含む。一部のそのような実施形態では、溶出液は約90%超の純度を有するSP-Dを含む。一部の実施形態はまた、溶出液を、保存及び分析の前に、200mM NaCl、1mM EDTA、pH7.0を含有する5mMヒスチジン緩衝液に透析する工程も含む。

【００５７】

SP-Dの翻訳後修飾

一実施形態は、特定のパターンの翻訳後修飾を有するヒトSP-Dポリペプチドを含む。一部の実施形態は、グリコシル化、特にN-グリコシル化されるヒトSP-Dポリペプチドを含む組成物を含む。一部の実施形態では、グリコシル化ヒトSP-Dポリペプチドは、配列番号4又は配列番号9のAsn90に対応するアスパラギンに炭水化物構造を保有する。N-グリコシル化部位における炭水化物構造は、2つのN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基及び3つのマンノース残基の中核構造を含んでもよく、ここで第1のGlcNAcはポリペプチド骨格に結合し、第2のGlcNAcは第1のGlcNAcに結合し、第1のマンノースは第2のGlcNAcに結合し、第2及び第3のマンノースはそれぞれ第1のマンノースに結合する。更なる単糖単位がこの中核構造に結合してもよい。一部の実施形態では、組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位における少なくとも60%、とりわけ少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、又は特に少なくとも90%の炭水化物構造は複合型炭水化物構造である。複合型炭水化物構造は、第2又は第3のマンノース残基に結合した少なくとも1つの更なるGlcNAc残基を含むが、更なるマンノース残基を一切含まない。

【００５８】

一部の実施形態では、組成物中のヒトSP-Dポリペプチドは、N-グリコシル化部位において、以下の特徴:

(i)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも70%の、コアフコースを保有する炭水化物構造の相対量、及び/又は

(ii)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも10%の、少なくとも1つのシアル酸残基を保有する炭水化物構造の相対量、及び/又は

(iii)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも50%の、少なくとも二分岐炭水化物構造の相対量

のうちの1つ又は複数を含むグリコシル化パターンを有する。

【００５９】

一部の実施形態では、コアフコースを保有する炭水化物構造の相対量は、組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも75%、又は少

なくとも80%である。コアフコース残基は、中核構造の第1のGlcNAc残基に結合する。本発明による「炭水化物構造の相対量」は、組成物中のSP-Dに結合した炭水化物構造の具体的な百分率又は百分率範囲を指す。特に、炭水化物構造の相対量は、組成物中のSP-Dポリペプチド鎖に結合した全ての炭水化物構造の具体的な百分率又は百分率範囲を指す。一部の実施形態では、SP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造のみが考慮される。

【００６０】

一部の実施形態では、少なくとも1つのシアル酸残基を保有する炭水化物構造の相対量は、組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも15%、少なくとも20%、又は少なくとも25%である。少なくとも1つのシアル酸残基を保有する炭水化物構造の相対量は、10%から80%まで、15%から75%まで、又は20%から70%までの範囲であってもよい。一部の実施形態では、組成物中のヒトSP-Dポリペプチドのグリコシル化パターンは、組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも0.5%、例えば少なくとも1%又は少なくとも2%の、2つのシアル酸残基を保有する炭水化物構造の相対量を含む。少なくとも2つのシアル酸残基を保有する炭水化物構造の相対量は、0.5%から30%まで、1%から20%まで、又は1.5%から15%までの範囲であってもよい。「シアル酸」という用語は、特に、ノイラミン酸の任意のN-又はO-置換誘導体を指す。シアル酸は、5-N-アセチルノイラミン酸と5-N-グリコリルノイラミン酸の両方を指すことができるが、好ましくは5-N-アセチルノイラミン酸のみを指す。シアル酸、特に5-N-アセチルノイラミン酸は、好ましくは、2,3-又は2,6-連結を介して炭水化物鎖に結合する。好ましくは、本明細書に記載されるSP-Dのグリコシル化パターンでは、2,3-及び2,6-結合シアル酸の両方が存在する。

【００６１】

一部の実施形態では、少なくとも二分岐炭水化物構造の相対量は、組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも60%、又は少なくとも70%である。一部の実施形態では、組成物中のヒトSP-Dポリペプチドのグリコシル化パターンは、組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも2%、例えば少なくとも3%又は少なくとも4%の、少なくとも三分岐炭水化物構造の相対量を含む。分岐とは、分枝、又は中核構造の末端(すなわち第2若しくは第3の)マンノース残基に結合した1つ若しくは複数の単糖単位である。複合型炭水化物構造では、分岐は一般にGlcNAc残基を含み、ガラクトース残基、及び任意選択でシアル酸残基を更に保有してもよい。二分岐複合型炭水化物構造は2つの分岐を含む、すなわち、中核構造の2つの末端マンノース残基のそれぞれに少なくともGlcNAc残基が結合する。三分岐複合型炭水化物構造では、一方の末端マンノースが2つの分岐を保有し、他方の末端マンノースが1つの分岐を保有する。四分岐複合型炭水化物構造では、両方の末端マンノースがそれぞれ2つの分岐を保有する。「少なくとも二分岐」という用語は、二、三、及び四分岐炭水化物構造を含み、「少なくとも三分岐」という用語は、三及び四分岐炭水化物構造を含む。

【００６２】

グリコシル化におけるA数は、グリコシル化パターンにおけるグリカン構造の分岐性に関する参考数である。A数は、特定の分岐性の相対量とその分岐の数とを乗じ、各分岐性に関して得られた数を加算することによって計算される。特に、単分岐グリカンの相対量には1を乗じ、二分岐グリカンの相対量には2を乗じ、三分岐グリカンの相対量には3を乗じ、四分岐グリカンの相対量には4を乗じる。これらの数の合計は、結果としてA数を生じる。一部の実施形態では、組成物中のヒトSP-Dポリペプチドは、N-グリコシル化部位において、少なくとも185、例えば少なくとも190のA数を有するグリコシル化パターンを有する。

【００６３】

一部の実施形態では、組成物中のヒトSP-Dポリペプチドは、N-グリコシル化部位において、以下の特徴:

(i)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも2%、例えば少なくとも5%若しくは少なくとも8%の、二分枝N-アセチルグルコサミン(b

isGlcNAc)を保有する炭水化物構造の相対量、及び/又は
(ii)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも40%、例えば少なくとも45%若しくは少なくとも50%の、少なくとも1つのガラクトース残基を保有する炭水化物構造の相対量、及び/又は
(iii)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも15%、例えば少なくとも20%若しくは少なくとも25%の、少なくとも2つのガラクトース残基を保有する炭水化物構造の相対量、及び/又は
(iv)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の30%以下、例えば20%以下若しくは15%以下の、N-アセチルガラクトース残基を保有する炭水化物構造の相対量、及び/又は
(v)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造の総量の30%以下、例えば25%以下若しくは20%以下の、混成型炭水化物構造の相対量、及び/又は
(vi)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造の総量の25%以下、例えば20%以下若しくは15%以下の、高マンノース型炭水化物構造の相対量
のうちの1つ又は複数を含むグリコシル化パターンを有する。

【００６４】

二分枝N-アセチルグルコサミン又はbisGlcNAc残基は、炭水化物構造の中核構造の中心の(すなわち第1の)マンノース残基に結合したGlcNAc残基である。一部の実施形態では、bisGlcNAcを保有する炭水化物構造の相対量は、組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の2%から50%まで、例えば5%から40%まで又は8%から35%までの範囲である。「高マンノース型炭水化物構造」は、中核構造の末端マンノースに結合したマンノース残基のみを含む。「混成型炭水化物構造」は、中核構造の一方の末端マンノースに結合したマンノース残基、及び中核構造の他方の末端マンノースに結合した、複合型炭水化物構造に関して記載した分岐を含む。

【００６５】

一部の実施形態では、SP-DのN-グリコシル化部位で結合した複合型炭水化物を有するSP-Dポリペプチドの集団は、以下の特徴:
(i)少なくとも20%の複合型炭水化物は二分枝N-アセチルグルコサミンを含む、
(ii)少なくとも25%の複合型炭水化物は少なくとも1つのシアル酸残基を含む。
(iii)少なくとも85%の複合型炭水化物は二分岐炭水化物構造を含む、
(iv)少なくとも0.5%の複合型炭水化物は少なくとも1つのGalNAcを含む、
(v)2%未満の複合型炭水化物は3つのガラクトースを含む、及び
(vi)2%未満の複合型炭水化物は三分岐炭水化物構造を含む
のうちの1つ又は複数を含むグリコシル化パターンを有することができる。

【００６６】

一部の実施形態では、SP-DのN-グリコシル化部位で結合した複合型炭水化物を有するSP-Dポリペプチドの集団は、以下の特徴のいずれかを含むグリコシル化パターンを有することができる。一部の実施形態では、集団のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造の少なくとも15%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、38%、40%、45%、又は前述の百分率のいずれかの間の範囲の百分率の複合型炭水化物は、二分枝N-アセチルグルコサミンを含む。一部の実施形態では、集団のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造の少なくとも75%、80%、82%、85%、90%、95%、又は前述の百分率のいずれかの間の範囲の百分率の複合型炭水化物は、二分岐炭水化物構造を含む。一部の実施形態では、集団のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造の少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、15%、又は前述の百分率のいずれかの間の範囲の百分率の複合型炭水化物は、少なくとも1つのGalNAcを含む。一部の実施形態では、集団のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造の15%未満、10%、5%、4%、3%、2%、1%、又は前述の百分率のいずれかの間の範囲の百分率の複合型炭水化物は、3つのガラクトース残基を含む。一部の実施形態では、集団のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造の15%未満、13%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、又は前述の百分率のいずれかの間の範囲の百分率

の複合型炭水化物は、三分岐炭水化物構造を含む。

【００６７】

一部の実施形態では、組成物中のヒトSP-Dポリペプチドは、N-グリコシル化部位において、以下の特徴:

(i)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも10%の、二分枝GlcNAcを保有する炭水化物構造の相対量、

(ii)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造の総量の10%以下の、高マンノース型炭水化物構造の相対量、及び

(iii)検出可能な量の、α2,6-結合シアル酸残基を保有する複合型炭水化物構造

を含むグリコシル化パターンを有する。

【００６８】

更なる実施形態では、組成物中のヒトSP-Dポリペプチドは、N-グリコシル化部位において、以下の特徴:

(i)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも85%の、コアフコースを保有する炭水化物構造の相対量、

(ii)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した複合型炭水化物構造の総量の少なくとも20%の、二分枝GlcNAcを保有する炭水化物構造の相対量、

(iii)組成物中のSP-DのN-グリコシル化部位に結合した炭水化物構造の総量の10%以下の、高マンノース型炭水化物構造の相対量、及び

(iv)検出可能な量の、α2,6-結合シアル酸残基を保有する複合型炭水化物構造

を含むグリコシル化パターンを有する。

【００６９】

SP-Dのオリゴマー種の同定

一態様では、ヒトSP-Dポリペプチドのオリゴマー種を同定する方法が提供される。一部の実施形態は、SP-Dのオリゴマー種、例えば三量体、十二量体、及び4個超の三量体を含有するオリゴマー構造を同定する方法を含む。そのような方法は、ある特定の量のある特定のオリゴマー形態、例えば主に十二量体形態を有するSP-Dの製剤を調製するための条件及び成分を同定するのに有用であり得る。一部の実施形態では、ヒトSP-Dポリペプチドのオリゴマー種を同定するための方法は、SP-Dの試料に関して非対称フローフィールドフローフラクショネーション-多角度光散乱(AF4-MALS)分析を実施する工程を含んでもよい。一部の実施形態では、方法は、ヒトSP-Dポリペプチドのオリゴマー種を同定するためにサイズ排除クロマトグラフHPLC(SEC HPLC)を実施する工程を含んでもよい。SEC HPLCの条件の例としては、UHPLC: Dionex UltiMate 3000、カラム: TSKgel G6000PWXL、相ヒドロキシル化メタクリレート、L×I.D. 30cm×7.8mm、13μm粒径(#0008024、Tosoh社)、カラムオーブン温度:30℃、サンプラー温度:4℃、圧力上限:31bar、UV検出:280nm、溶離液:TBS、10mM EDTA、pH7.4(10×TBS Roti-Stock #1060.1、Carl Roth社製、EDTA #8040.2、Carl Roth社製)、流速:0.25mL/分、試料注入:20μg又は30μL固定容量、積分限界: HOO 25.0～30.0分、十二量体30.0～34.5分、LOO 34.5～44.0分、が挙げられる。

【００７０】

一部の実施形態では、SP-Dのオリゴマー種を同定する方法は、SP-Dの試料に関して原子間力顕微鏡観察(AFM)を実施する工程、すなわちAFM画像におけるSP-Dのオリゴマー種を同定及び/又は定量化する工程を含んでもよい。一部のそのような実施形態では、方法は、SP-Dのオリゴマー種の混合物をサイズごとに分ける工程を含んでもよい。一部のそのような方法は、SP-Dの試料を陰イオン性洗浄剤、例えばドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の洗浄剤と接触させる工程、試料を架橋試薬、例えば1%グルタルジアルデヒド(GA)と接触させる工程、及び例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を実施することによって、SP-Dの種をサイズごとに分ける工程を含む。一部の実施形態では、SP-Dの試料は、陰イオン性洗浄剤と接触させた後に架橋試薬と接触させる。他の実施形態では、SP-Dの試料は、架橋試薬と接触させた後に陰イオン性洗浄剤と接触させる。一部の実施形態では、試料は約1% GAの溶液と接触させる。一部の実施形態では、試料は、約1分から約30分の間の期間、架

橋試薬と接触させる。一部の実施形態では、PAGEはドデシル硫酸ナトリウムの存在下である(PAGE-SDS)。他の実施形態では、PAGEは非変性PAGEである。一部の実施形態では、PAGEは勾配ゲルを含む。一部の実施形態では、勾配ゲルは4～15%ポリアクリルアミド勾配トリス-グリシンゲルである。一部の実施形態では、PAGEは還元剤の非存在下で実施される。一部の実施形態では、還元剤はβ-メルカプトエタノールを含む。一部の実施形態はまた、例えばウェスタンブロットを実施してSP-Dの種を同定する工程も含む。

【００７１】

SP-Dを含むある特定の組成物

一部の実施形態は、SP-Dのオリゴマー形態のある特定の分布を有するrhSP-Dポリペプチドの集団を含む溶液を含む。一部の実施形態では、溶液は、約30%超、40%、50%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、70%、又は前述の数字の間の任意の範囲のオリゴマー形態がSP-Dの十二量体を含む、SP-Dのオリゴマー形態を含むことができる。一部の実施形態では、SP-Dのオリゴマー形態の分布は、本明細書で提供される方法、例えば非対称フローフィールドフローフラクショネーション-多角度光散乱(AF4-MALS)分析によって測定することができる。一部の実施形態では、rhSP-Dポリペプチドの溶液は、本明細書で提供される方法によって調製される。一部の実施形態では、本明細書に記載されるヒトSP-Dポリペプチド組成物を生成する方法は、本明細書に記載されるrhSP-Dポリペプチドの集団を含む溶液を生成する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるヒトSP-Dポリペプチドを単離する方法は、本明細書に記載されるrhSP-Dポリペプチドの集団を含む溶液を生成する。本明細書に記載されるヒトSP-Dポリペプチド組成物を生成する方法の一部の実施形態では、発現したSP-Dポリペプチドは主に十二量体形態である。本明細書に記載されるヒトSP-Dポリペプチドを単離する方法の一部の実施形態では、単離されたSP-Dポリペプチドは主に十二量体形態である。この点において、「主に」は特に、組成物中の全てのSP-Dポリペプチドの少なくとも30%、例えば組成物中の全てのSP-Dポリペプチドの少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、又は少なくとも55%の相対量を指す。一部の実施形態では、「主に」は組成物中の全てのSP-Dポリペプチドの50%超の相対量を指す。

【実施例】

【００７２】

(実施例1)

SP-D発現ベクターの構築

ヒト哺乳動物細胞におけるヒトSP-Dの発現のために2つの発現ベクターを開発した。一方のベクターは野生型ヒトSP-Dリーダー/シグナル配列を含み、他方のベクターはヒトT細胞受容体(TCR)リーダー/シグナル配列を含んだ。タンパク質は、TCRリーダー配列を有するタンパク質を高効率で分泌することが予期されるヒト骨髄性白血病細胞において発現するため、TCRリーダー配列を発現ベクターの一方に選択した。

【００７３】

ヒトSP-Dポリペプチドをコードし、野生型ヒトSP-Dリーダー/シグナル配列又はヒトT細胞受容体(TCR)リーダー/シグナル配列のいずれかを含むポリヌクレオチドをGENEART(ThermoFisher Scientific社)によって合成した。各ポリヌクレオチドは、クローニングのためのXba I(5'末端)及びHind III(3'末端)制限部位、並びにKozakコンセンサス配列を含んだ。各ポリヌクレオチドをHind III/Xba I制限によってGENEART(ThermoFisher Scientific社)送達ベクターから切り出し、クローニングベクターpHBG1Ddhfr(Glycotope GmbH社、ドイツ)にライゲーションして、発現ベクターpHBG1Ddhfr_WT_SP-D(7228bp)及びpHBG1Ddhfr_TCR_SP-D(7231bp)を得た。図2A及び図2Bを参照のこと。発現ベクターの更なる例を図2Cに示す。発現ベクターを配列決定し、制限マッピングして、正確な配列を確認した。TABLE 1(表1)に、ある特定の配列を列挙する。

【００７４】

【表１Ａ】

TABLE 1

配列番号	配列
配列番号 01 内在性 SP-D リーダー配列、kozak 配列(下線)、並びに Xba I(5'末端)及び Hind III(3'末端)制限部位を有する SP-D ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。	aagcttgccaccatgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggctatctggaagccgagatgaagacctacagccaccggaccatgcccagcgcctgtaccctcgtgatgtgcagcagcgtggaaagcggcctgcctggcagagatggcagggatggaagagaggggccccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgcctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggccctaaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagccaggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcagggaagtgccggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcgtgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccaggcgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagctctccagggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactgttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccgaggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccgaaaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgaccgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacagcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatcttcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaagggtctaga
配列番号 02 内在性 SP-D リーダー配列を有する SP-D ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。	gccaccatgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggctatctggaagccgagatgaagacctacagccaccggaccatgcccagcgcctgtaccctcgtgatgtgcagcagcgtggaaagcggcctgcctggcagagatggcagggatggaagagagggccccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgccttggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggccctaaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagccaggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcagggaagtgccggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcgtgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccaggcgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagctctccaggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactgttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccgaggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccgaaaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgaccgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacagcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatcttcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaagggg

【００７５】

【表１Ｂ】

配列番号 03 配列番号 01 の内在性リーダー配列をコードするポリヌクレオチド。	atgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggctatctggaa
配列番号 04 リーダー配列(下線)及び Met11/31、Thr160/180、Ser270/290、Ala286/306 に多型(下線)を含む配列番号 01 によってコードされる SP-D ポリペプチド。	MLLFLLSALVLLTQPLLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLV MCSSVESGLPGRDGRDGREGPRGEKGDPGLPGAAGQAG MPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGPPGVPG PAGREGPLGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQG SAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAAGSAGAMGPQ GSPGARGPPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQV EALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGF VKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAAENAALQQLVVAKNE AAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGS EDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF
配列番号 05 配列番号 04 のリーダー配列。	MLLFLLSALVLLTQPLLGYLE
配列番号 06 TCR リーダー配列、kozak 配列(下線)、並びに Xba I(5'末端)及び Hind III(3'末端)制限部位を有する SP-D ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。	aagcttgccaccatggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaa ttcagcatggccgccgagatgaagacctacagccaccggacaatgcccagcgcctgcacc ctcgtgatgtgcagctctgtggaaagcggcctgcccggcagagatggcagggatggaaga gagggacccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctg gaatgcctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagc ctggccctaaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggac ctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagcca ggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcaggga agtgccggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaa gaggcgtgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggat ctccaggcgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataag ggcgctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagc tctccagggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactg ttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagccct tcaccgaggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgcc gccgaaaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagc atgaccgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtac agcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatct tcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagt tctgaagggtctaga

【００７６】

【表１Ｃ】

配列番号07 TCRリーダー配列を有するSP-Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。	gccaccatggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaattcagc atggccgccgagatgaagacctacagccaccggacaatgcccagcgcctgcaccctcgtg atgtgcagctctgtggaaagcggcctgcccggcagagatggcagggatggaagagaggg acccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgc ctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggcc ctaaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgctgg aagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagccaggacca aagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcagggaagtgcc ggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcg tgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccagg cgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgcta agggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagctctccag ggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactgttcccca acggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccg aggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccga aaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgacc gacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacagcaat tgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatcttcacca acggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaa ggg
配列番号08 配列番号06の内在性リーダー配列をコードするポリヌクレオチド。	atggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaattcagcatggcc
配列番号09 TCRリーダー配列(下線)及びMet11/31、Thr160/180、Ser270/290、Ala286/306に多型(下線)を含む配列番号06によってコードされるSP-Dポリペプチド。	MACPGFLWALVISTCLEFSMAAEMKTYSHRTMPSACTLV MCSSVESGLPGRDGRDGREGPRGEKGDPGLPGAAGQAG MPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGPPGVPG PAGREGPLGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQG SAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAAGSAGAMGPQ GSPGARGPPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQV EALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGF VKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAAENAALQQLVVAKNE AAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGS EDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF
配列番号10 配列番号09のリーダー配列。	MACPGFLWALVISTCLEFSMA

【００７７】

(実施例2)

哺乳動物細胞株におけるSP-Dの発現

トランスフェクション前に、発現ベクターを、Pvu Iを用いて直線化し、フェノール/クロロホルム及びトリクロロメタン/クロロホルムを用いて精製した。NUCLEOFECTIONを製造

元の説明書に従って使用して(AMAXA NUCLEOFECTOR TECHNOLOGY、Lonza社、ケルン、ドイツ)、細胞株に7～8μgの直線化した発現ベクターをトランスフェクトした。以下の細胞株に発現ベクターをトランスフェクトした:NM-H9D8(DSM ACC 2806)、NM-H9D8-E6Q12(DSM ACC 2856)、及びNM-F9(DSM ACC 2606)。

【００７８】

SP-Dを発現する細胞のプールを、25nMメトトレキセート(MTX)を使用し、濃度を50nM MTXまで増加させて、選択した。増加するレベルのSP-D発現を有する細胞を得るために、MTXの濃度を100nMから200nM、400nM MTXと段階的に増加させた。SP-D産生細胞の生産性を、SP-D特異的抗体(Seven Hills Bioreagents社、シンシナティ OH、Cat# WMAB-2D12A88及びCat# WMAB-1A10A9)を使用して、製造元の説明書に従ったSP-D特異的ELISA(BioVendor GmbH社、ドイツ、Cat# RD194059101)及び/又はドットブロット分析によって決定した。比生産速度(SPR)を以下の等式を使用して計算した。

【００７９】

【数１】

$$SPR = \frac{\text{総タンパク質量}}{\text{積分細胞面積(ICA)}}$$

【００８０】

【数２】

$$ICA = \frac{(\text{最終細胞数}-\text{初期細胞数})\times\text{培養日数}}{\log_e(\text{最終細胞数}/\text{初期細胞数})}$$

【００８１】

倍加時間を以下の等式によって計算した:

g=log2×(培養時間)/log(最終細胞数/初期細胞数)

【００８２】

SP-D発現クローンをClonePix(Molecular Devices社)技術によって細胞プールから単離し、生産性に関して評価した。選択したクローンを更にサブクローニングして、最終クローンを得た。100ピコグラム/細胞/日(pcd)超の生産性を有するクローンを得た。図3は、様々なMTX濃度で培養された異なるSP-D産生細胞プールの比生産速度を示す。細胞プールには、それぞれヒトSP-Dリーダー配列を含有するヒトSP-D発現ベクターをトランスフェクトしたH9D8-E6Q12細胞、H9D8細胞、及びF9細胞、並びにヒトTCRリーダー配列を含有するヒトSP-D発現ベクターをトランスフェクトしたH9D8細胞が含まれた。

【００８３】

(実施例3)

SP-D発現細胞株を培養する工程

細胞を、無血清合成遺伝子療法培地(GTM)(Glycotope GmbH社、ドイツ)で培養した。GTM培養培地の説明に関しては、例えば、その全体が参照によって組み込まれる米国特許第9,359,427号を参照のこと。灌流プロセス培養を1×GTMで開始し、次いで2×GTMに変更した。細胞を、2から3日ごとにTフラスコ(25cm^2、3から6mLの懸濁液容量、TPP社、ドイツ)中1

×10^5から3×10^5細胞/mLの細胞濃度となるように継代することによって指数増殖期に維持し、37℃、98%湿度、及び8% CO_2でインキュベートした(Integra Biosciences IBS社、Biosafe plus、スイス、又はThermo/Heraeus社、BBD 6220、ドイツ)。細胞増殖を、Tフラスコ(75cm^2、12から30mL容量;150cm^2、50から150mL)及びスピナーフラスコ(100mLから1000mL、Integra Biosciences IBS社、Cellspin、スイス)を使用して行った。

【００８４】

一般的な培養パラメータ:培地に2.0×10^5細胞/mLを接種した。1×GTMを0.5V/dの灌流速度で供給することによって連続的操作を可能にし(通常は4～5日目)、細胞増殖及び栄養要件に応じて1日当たり2リアクター容量の最大灌流速度まで増加させた。1×GTMで最大灌流を達成した場合は、供給培地を改変2×GTMに交換した。培地を、0.5M NaOHの添加又はCO_2の注入のいずれかによってpH7.2に維持した。溶存酸素を40%、温度を37℃に設定した。溶存酸素を40%未満、例えば20%の溶存酸素まで下げることも可能である。後者の場合、十二量体の含量は、40%の溶存酸素下で培養する工程と比較してわずかに増加し得る。1L灌流バイオリアクター:実験室1L規模培養を、Sartorius Biostat B-DCU 2l Quadシステム又は2L BBI Quadシステムにおいて行った。溶存酸素及びpHを、標準電極(それぞれMettler Torledo InPro 6800及びMettler-Torledo 405-DPAS-SC-K8S、Mettler Torledo社、スイス)によって測定した。撹拌を、300から400rpmの撹拌速度で3枚羽根インペラによって実施した。灌流を、60cmのPES膜(0.2μm孔径及び0.15m^2膜面積、Spectrum社、USA)並びに0.9L/分の流量を有するATF2モジュールを使用して実施した。プロセス制御において、細胞濃度及び生存率を、トリパンブルー排除原理を使用してCedex HiRes(Roche社、スイス)によって決定した。グルコース/乳酸及びグルタミン/グルタミン酸をYSI2700又はYSI2900 Select生化学分析装置(Yellow Springs Instruments社、USA)によって測定した。

【００８５】

図4は、生細胞濃度(パネルA)、グルコース濃度(パネルB)、細胞生存率(パネルC)、乳酸濃度(パネルD)を含む、クローンH9D8-P1315-2A5に関して実行したバイオリアクターの培養条件の経時的な変化を示す。

【００８６】

(実施例4)

哺乳動物細胞株からのSP-Dの精製

SP-Dは発現細胞から分泌されることが見出された。SP-D産生細胞からの細胞上清を、バイオリアクターの実行により、又は他の培養物から採取し、結合及び溶出モードのQ-セファロースクロマトグラフィーの実行(Q-セファロースFF、GE Healthcare社)と、それに続く結合及び溶出モードで実施されたSuperdex75クロマトグラフィーの実行(Superdex75、GE Healthcare社)とを使用して精製した。クロマトグラフィーはGE社製のFPLCシステム(Akta Explorer、Akta Avant、Akta Pure)で実施した。

【００８７】

Q-セファロースクロマトグラフィー:上清を滅菌ろ過し、同じ容量の20mMトリス、10mM EDTA、pH7.4の溶液を用いて希釈し、Q-セファロースカラムにロードし、600mM NaClを用いて段階溶出によって溶出した。クロマトグラフィーはTABLE 2(表2)に示される設定を用いて実施した。

【００８８】

【表２】

TABLE 2

パラメータ	設定
平衡化及び泳動用緩衝液	20mM トリス、50mM NaCl、pH7.4
溶出緩衝液	20mM トリス、600mM NaCl、pH7.4
カラム容量/長	240 mL / 11.5 cm 24000 mL
カラム容量 1mL 当たりのロード量	100 mL
総ロード量	24000 ml (1:2 希釈)
流量(ml/分)	55mL/分
動的流量(cm/分)	2.6cm/分
接触時間	4.4 分
溶出液中の SP-D 濃度	0.2～2mg/ml

【００８９】

Superdex75クロマトグラフィー:溶出液を、10mM $CaCl_2$を含有する同じ容量のpH7.4の20mMトリス緩衝液を用いて希釈し、Superdex75カラムにロードし、10mM EDTAを用いて段階溶出によって溶出した。クロマトグラフィーはTABLE 3(表3)に示される設定を用いて実施した。

【００９０】

【表３】

TABLE 3

パラメータ	設定
平衡化及び泳動用緩衝液	20mM トリス、300mM NaCl、5mM $CaCl_2$、pH7.4
溶出緩衝液	20mM トリス、10mM EDTA、300mM NaCl、pH7.4
総ロード量	2228 mL
カラム容量/長	106 mL / 21.5 cm
カラム容量 1mL 当たりのロード量	21mL(1:2 希釈)
流量(ml/分)	5mL/分
動的流量(cm/分)	1.01cm/分
接触時間	21.2 分
溶出液濃度	0.5～3mg/mL

【００９１】

Superdex溶出液は、クーマシーブルー染色後の非還元SDS-PAGEによって決定されたように、90%超の純度でSP-Dを含有した(図5)。図5では、150kD超のバンドがSP-Dからのより高次のオリゴマーを含む。Superdexカラムからの溶出液を、保存及び分析の前に、200mM NaCl及び1mM EDTAを含有する5mMヒスチジンpH7.0緩衝液に対して4℃で透析した。

【００９２】

(実施例5)

細菌凝集アッセイにおけるSP-Dの活性

クローンH9D8-P1315-2A5から精製されたSP-Dの活性を細菌凝集アッセイにおいて試験した。細菌凝集アッセイは、以下の方法と実質的に類似した方法によって実施した。大腸菌(E. coli)(ATCC: Y1088)を細菌寒天プレートで画線培養し、37℃で一晩インキュベートした。単一コロニーを選択及び使用して、一晩培養物を接種し、37℃で一晩振盪した。1mLの細菌培養物を4本の1.5mL遠心管にピペッティングし、4,000rpmで5分間遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットを1mLの緩衝液(150mM HEPES、20mM NaCl、pH7.4)に再懸濁した。管を4,000rpmで5分間遠心分離し、ペレットを7mLの緩衝液に再懸濁した。細菌懸濁液の吸光度を分光計において700nmで測定した。細菌懸濁液を調整して、1.0000から1.1000の範囲の吸光度を得た。1M $CaCl_2$を懸濁液に添加して、5mM $CaCl_2$の最終濃度を得た。プラセボ緩衝液中のrhSP-D希釈液(各希釈液は15μlの総容量)を、以下の濃度:5、1、0.5、0.25、0.1、0μg/mlで創製し、それぞれ20μLのHEPES-NaCl緩衝液を含有するキュベットに添加した。600μLの細菌懸濁液を次いでキュベットに添加し、吸光度を、各キュベットに関し700nmで2.5分ごとに、総計120分間測定した。

【００９３】

凝集アッセイでは、活性なSP-Dは細菌細胞を凝集させ、細菌懸濁液の吸光度を低下/透過率を増加させる。図6は、クローンH9D8-P1315-2A5から精製されたrhSP-Dが細菌凝集アッセイにおいて活性を有することが決定されたことを示す。実験を更に2回繰り返し、同様の結果を得た。

【００９４】

また、上の実施例2に記載したように生成したH9D8の更なるクローンにおいて組換え発現したヒトSP-Dを、その活性に関して分析した。試験した全ての最終選択クローンからのSP-Dは、類似した高い活性を有した。1つの例示的な単離されたクローンは、その後の分析にも使用したNM-H9D8(8B11)である。NM-H9D8(8B11)は、Airway Therapeutics LLC社、シンシナティ、OH、USAによって2018年9月4日にブラウンシュヴァイク(ドイツ)の「DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH社」に「AT100-rhSP-D-H9D8-P20011-8B11」として寄託されており、寄託されたクローンは、そこから容易に同定することができ、受託番号の下で容易に得ることができる。

【００９５】

(実施例6)

TLR4阻害アッセイにおけるSP-Dの活性

SP-Dのオリゴマー形態は、リポ多糖(LPS)誘発性炎症性細胞応答を、LPSがToll様受容体4(TLR4)に結合すること/それを活性化させることを妨げることによって阻害する。例えば、その全体が参照によって組み込まれるYamazoe M.等、(2008) J. Biological Chem. 283:35878～35888頁を参照のこと。

【００９６】

クローンH9D8-P1315-2A5から精製された、LPSによるTLR4経路の活性化を阻害するrhSP-Dの活性を試験した。HEK-Blue(商標)hTLR4細胞(InvivoGen社、サンディエゴ、CA、U.S.A.)を、384ウェルプレートに約20000細胞/ウェルの密度でプレートし、様々な濃度のSP-Dと共に2時間、37℃、5% CO_2でインキュベートした。EC_{80}濃度のLPS(大腸菌O26:B6、L5543 Sigma Aldrich社)を各ウェルに添加し、細胞を更に22時間、37℃、5% CO_2でインキュベートした。細胞をウェルから引き離し、懸濁した細胞を洗浄し、細胞をPBSに再懸濁し、穏やかなピペッティングによりあらゆる塊を除去することによって、TLR4活性を測定した。洗浄した細胞を、5mM $CaCl_2$及び1%(v/v)BSAを含有するエンドトキシンフリー水で作製さ

れたHEK blue検出培地(InvivoGen社、サンディエゴ、CA、U.S.A.)を含有する384ウェルプレートに20e10^{3}細胞/ウェルの密度で移した。細胞を5% CO_2中37℃で24時間インキュベートし、TLR4の活性を、分光光度計を655nmで使用して分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)レポーター遺伝子の活性を測定することによって決定した。SP-DのIC_{50}値を、非線形回帰分析を使用して、idbs社(www.idbs.com)製のXLfitを用いてデータを4パラメータロジスティック方程式に当てはめることによって求めた。図7は、クローンH9D8-P1315-2A5から精製されたSP-DがLPSによるTLR4経路の活性化を阻害する活性を有し、IC_{50}が0.00294mg/mlであることが決定されたこと、及びSP-Dがそのような活性のための活性なオリゴマー形態であることが確認されたことを示す。IC_{50}値の対数のみが正規分布するため、一連の実験からの数字を平均する目的で、$-Log_{10}(IC_{50})$として定義されるpIC_{50}値を使用した。実験を更に2回繰り返し、同様の結果から2.33±0.10mg/ml(N=3)の平均pIC_{50}を得、これは0.00468mg/mlの平均IC_{50}に相当した。また、上の実施例2に記載したように生成したH9D8の更なるクローンにおいて組換え発現したヒトSP-Dを、TLR-4アッセイにおいてその活性に関して分析した。試験した全ての最終選択クローンからのSP-Dは、類似した高い活性を有した。1つの例示的な単離されたクローンは、その後の分析にも使用したNM-H9D8(8B11)である。

【００９７】

(実施例7)

様々な起源からのSP-Dの安定性

様々な起源からのrhSP-Dの安定性を決定した。起源には、H9D8細胞において野生型SP-Dリーダーポリペプチドと共に発現したrhSP-D(「rhSP-D:WT」)及びH9D8細胞においてTCRリーダーポリペプチドと共に発現したrhSP-D(「rhSP-D:TCR」)が含まれた。様々な緩衝液(緩衝液:1、2、3、又は4)中のrhSP-D:WT又はrhSP-D:TCRの溶液を5℃で数週間インキュベートした。様々な緩衝液中のrhSP-D:WT又はrhSP-D:TCRの安定性を、rhSP-D三量体/六量体、十二量体、より高次のオリゴマーである「ファジーボール」、及び非常に高次のオリゴマー/凝集体を含むrhSP-Dオリゴマー形態の相対分布を測定することによって決定した。rhSP-Dオリゴマー形態の相対分布を、実施例8で提供されるものと実質的に同じ方法を使用して、非対称フローフィールドフローフラクショネーション(AF4)-多角度光散乱(AF4-MALS)分析によって決定した。結果の平均を3回の決定から求め、+/-標準偏差を求めた。結果をTABLE 4(表4)にまとめる。

【００９８】

【表４Ａ】

TABLE 4

SP-D 起源 (緩衝液)	5℃の時間 (週)	オリゴマー形態の相対分布(%)			
		三量体/六量体	十二量体	「ファジーボール」へ移行	非常に高次のオリゴマー
rhSP-D: TCR (1)	0	17.30 ± 0.61	53.56 ± 2.23	24.19 ± 1.16	5.06 ± 0.63
	2	15.69 ± 0.75	58.09 ± 0.22	11.83 ± 0.47	14.89 ± 0.54
	4	15.92 ± 3.68	42.82 ± 2.62	14.96 ± 1.13	26.29 ± 1.21
	8	11.45 ± 0.55	51.57 ± 0.27	21.38 ± 1.39	15.79 ± 1.09
rhSP-D: TCR (2)	0	13.71 ± 1.42	58.48 ± 0.90	16.06 ± 1.12	11.75 ± 0.60
	2	14.05 ± 1.99	61.01 ± 1.12	12.05 ± 1.23	12.88 ± 0.76
	4	16.39 ± 1.68	32.28 ± 0.27	24.72 ± 0.35	26.51 ± 1.69
	8	8.04 ± 0.83	47.40 ± 2.19	13.35 ± 1.54	31.21 ± 1.30
rhSP-D: TCR (3)	0	14.46 ± 0.90	64.06 ± 2.30	15.17 ± 0.90	6.31 ± 2.32
	2	13.57 ± 1.81	63.91 ± 0.54	11.11 ± 0.76	11.41 ± 0.68
	4	9.41 ± 0.70	56.74 ± 2.49	15.77 ± 3.56	18.08 ± 2.30
	8	18.22 ± 3.48	59.07 ± 2.45	11.71 ± 1.85	11.06 ± 1.26
rhSP-D: TCR (4)	0	12.49 ± 0.45	60.76 ± 0.58	13.92 ± 0.21	12.83 ± 0.33
	2	6.53 ± 1.16	60.60 ± 0.44	13.48 ± 0.30	19.38 ± 1.16
	4	9.15 ± 0.67	46.93 ± 0.33	12.45 ± 0.31	31.47 ± 0.53
	8	13.48 ± 0.32	52.32 ± 0.70	13.33 ± 0.40	20.87 ± 0.72
rhSP-D: WT (1)	0	10.21 ± 2.34	49.54 ± 7.07	16.75 ± 6.40	23.50 ± 5.60
	2	10.61 ± 0.95	62.05 ± 0.14	21.24 ± 0.84	6.10 ± 0.64
	4	9.50 ± 0.60	60.11 ± 0.29	21.37 ± 0.54	9.01 ± 0.14
	8	13.80 ± 0.48	59.05 ± 1.49	20.15 ± 1.56	7.00 ± 0.38

【００９９】

【表４Ｂ】

rhSP-D: WT (2)	0	9.12 ± 1.72	65.67 ± 5.02	18.25 ± 3.12	6.95 ± 3.58
	2	9.05 ± 0.85	69.20 ± 0.64	16.31 ± 1.00	5.44 ± 0.67
	4	9.79 ± 0.71	62.43 ± 0.88	19.91 ± 0.96	7.87 ± 0.56
	8	9.73 ± 1.23	67.58 ± 1.31	16.58 ± 1.86	5.70 ± 0.51
rhSP-D: WT (3)	0	8.81 ± 2.06	69.36 ± 2.27	17.18 ± 0.23	4.65 ± 0.17
	2	7.62 ± 0.76	69.28 ± 1.54	19.41 ± 1.67	3.69 ± 0.64
	4	9.21 ± 0.58	65.79 ± 1.56	19.96 ± 1.22	5.04 ± 0.93
	8	12.00 ± 0.82	66.32 ± 0.32	17.39 ± 0.92	4.30 ± 0.21
rhSP-D: WT (4)	0	8.58 ± 0.51	63.43 ±1.26	20.48 ± 0.69	7.51 ± 0.07
	2	5.15 ± 0.61	61.56 ± 0.57	22.21 ± 0.48	11.07 ± 0.14
	4	9.57 ± 0.43	62.52 ± 0.58	18.82 ± 0.56	9.13 ± 0.42
	8	13.84 ± 0.02	63.01 ± 0.33	14.16 ± 0.03	9.00 ± 0.32

【０１００】

TABLE 4(表4)は、rhSP-D:WT及びrhSP-D:TCRを含有する異なる溶液中の様々なオリゴマー形態の相対的安定性の相違を例証する。例えば、SP-Dの非常に高次のオリゴマー形態に関しては、rhSP-D:WTの溶液は、一般に、rhSP-D:TCRの対応する溶液よりも低いそのようなオリゴマーの百分率を有した。加えて、rhSP-D:WTの溶液の非常に高次のオリゴマーの百分率は、rhSP-D:TCRの対応する溶液と比較して、少なくとも0週間から2週間の間では実質的に増加しなかった。rhSP-Dの十二量体オリゴマー形態に関しては、rhSP-D:WTの溶液中のそのようなオリゴマーの百分率は、一般に、0から8週目の間で安定であったが、対照的に、rhSP-D:TCRの溶液中のそのようなオリゴマーの百分率は、対応する溶液において0から8週目の間で減少した。

【０１０１】

rhSP-D:WTの溶液とrhSP-D:TCRの溶液との間のこれらの相違は、両者のSP-Dポリペプチドが同じアミノ酸配列を有し、それぞれH9D8細胞によって産生されているので、注目に値するものであった。rhSP-D:WTは初めに、野生型ヒトSP-Dタンパク質のリーダー/シグナルポリペプチドと一致するリーダー/シグナルポリペプチドと共に発現し、rhSP-D:TCRは初めに、ヒトTCRタンパク質のリーダー/シグナルポリペプチドと一致するリーダー/シグナルポリペプチドと共に発現する。各リーダー/シグナル配列は、移行の直後又は最中に対応するタンパク質から切断された可能性がある。この所見は、様々な肺障害の治療のためのヒトSP-Dの安定な溶液、とりわけSP-Dのより活性な十二量体オリゴマー形態を有する溶液の生成及び開発に特に好都合であり得る。

【０１０２】

(実施例8)

AF4-MALS分析

非対称フローフィールドフローフラクショネーション-多角度光散乱(AF4-MALS)分析を使用して、溶液中のSP-Dの異なるオリゴマー形態の相対分布を決定した。AF4-MALSは、フ

ィールドフローフラクショネーション(FFF)に関する分離技法である。FFFと異なり、AF4-MALSは、クロスフローが担体液体によってのみ引き起こされるように、単一の透過壁を含む。クロスフローは、チャンネルの底部の半透過壁を通って絶えず出て行く担体液体によって誘発される。

【０１０３】

試料を、AF4-MALSシステム(Eclipse Dual Tec、Wyatt Technology Corp.社、サンタバーバラ、CA)と、それに続くUV(Ultimate 3000可変波長検出器、Dionex Corporation社、サニーベール、CA)及びMALS分析(Dawn Heleos II検出器、Wyatt Technology Corp.社、サンタバーバラ、CA)とを使用して分析した。Dionex Ultimate 3000 HPLCシステム(Dionex Corporation社、サニーベール、CA)を使用して、試料を注入し、移動相をAF4システムに送液した。AF4構成は、350μm厚のスペーサを有する短いチャンネル(Wyatt Technology Corp.社、サンタバーバラ、CA)を使用した。データの分析及び計算は、Chromeleon(Dionex Corporation社、サニーベール、CA)及びAstra(Wyatt Technology Corp.社、サンタバーバラ、CA)ソフトウェアを使用して実施した。試料には、rhSP-D及び野生型SP-Dリーダーポリペプチドをコードする発現ベクター(pHBG1Ddhfr_WT_SP-D)をトランスフェクトしたH9D8又はF9細胞、並びにrhSP-D及び野生型TCRリーダーポリペプチドをコードする発現ベクター(pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D)をトランスフェクトしたH9D8細胞から精製されたrhSP-Dが含まれた。使用した試料をTABLE 5(表5)に列挙する。rhSP-Dに対するAF4-MALSシステムのパラメータをTABLE 6(表6)に示す。

【０１０４】

【表５】

TABLE 5

バッチ	親細胞株	発現構築物	容量(mL)
S729	H9D8	pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D	0.25
S730	F9	pHBG1Ddhfr_WT_SP-D	0.25
S731	H9D8	pHBG1Ddhfr_WT_SP-D	0.25

【０１０５】

【表６】

TABLE 6

工程	開始時間(分)	終了時間(分)	持続時間(分)	モード	クロスフロー開始(ml/分)	クロスフロー終了(ml/分)
1	0	1	1	フォーカス		
2	1	2	1	フォーカス+注入		
3	2	3.5	1.5	フォーカス		
4	3.5	3.7	0.2	溶出	0.5	3
5	3.7	6.7	3	溶出	3	3
6	6.7	16.7	10	溶出	3	0.18
7	16.7	26.7	10	溶出	0.18	0.18
8	26.7	41.7	15	溶出	0.18	0
9	41.7	51.7	10	溶出	0	0
10	51.7	56.7	5	溶出+注入	0	0
11	56.7	57	0.3	溶出	0	0
検出器流速:0.5ml/分 注入流速:0.2ml/分 フォーカス流速:0.5ml/分 注入量:5μg 移動相:20mM トリス、200mM NaCl、pH7.4 チャンネル:短(145mm) スペーサ:350μM 膜:10kD PES						

【０１０６】

AF4-MALSを使用したデータを、UV検出器及び多角度光散乱検出器を使用して収集し、分析して溶出中のある特定の時間におけるSP-Dの絶対モル質量及びサイズを決定した。サイズの質量に対する比は、SP-Dの形状を指し示した。サイズ対質量比から、溶出の初期段階(0～34分)ではSP-D分子は直鎖又は棒形状を有することが決定された。棒モデルの計算に関して、ソフトウェアは、棒状粒子の厚さはその長さと比較して有意でない(0.0nm)と仮定した。厚さが有意であった場合、そのnmでの厚さ又はおよその厚さを使用する。棒厚さは原子間力顕微鏡観察(AFM)データから推定し、棒長さは、求めたところ、136±8.1nmのAFM測定値と一致した(R. Arroyo等、J Mol Biol (2018) 430: 1495～1509頁)。SP-Dの溶出の後期段階(34～45分)は、より緻密な構造が観察されていたことを指し示した。二次デバ

イモデルを、溶出のこれらの段階の分析のために利用した。二次デバイモデルは、非常に大きなモル質量(約10e6ダルトン又は約50nm RMS半径超)を含む、より広い範囲のモル質量にわたってより良好な結果をもたらした。SP-Dの十二量体オリゴマー形態に関し、分子量を求めたところ、520.09 +/- 4.61kDa(N=72回の決定)であった。

【０１０７】

溶出プロファイルの第1のピーク(ピーク1)は、棒モデルに従った質量計算に基づくと、SP-D三量体及び六量体を含有した。溶出プロファイルの第2のピーク(ピーク2)は、SP-D十二量体を含有した。溶出プロファイルの第3のピーク(ピーク3)は、棒モデルによって決定された中間体MWに基づくと、SP-D十二量体からSP-D「ファジーボール」になる間の中間体種を含有した。溶出プロファイルの第4のピーク(ピーク4)は、約70nmの一定のRMS半径を有するSP-Dオリゴマーの不均一な密集体を含有し、ファジーボール種に関するAFM測定によって観察されたものと一致した。溶出プロファイルにおいて36分を超えるとRMS半径が増加し、凝集体種を指し示す。

【０１０８】

(実施例9)

N-グリカン解析

NM-H9D8細胞中で産生されたSP-D(rhSP-D)及びヒト羊水から得たSP-D(hSP-D)のN-グリコシル化パターンを比較した。精製されたSP-Dタンパク質を変性させ、還元した。N-グリカンを、N-グリカナーゼFの作用によって放出させた。遊離N-グリカンに対し、還元末端においてフルオロフォアをタグ付けし、続いて固相抽出を利用して精製工程を行った。精製された蛍光タグ付きN-グリカンの混合物を、エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間タンデム質量分析(ESI-Q-TOF MS/MS)と合わせた蛍光検出親水性相互作用超高速クロマトグラフィー(HILIC-UPLC-FLD)にかけた。グリカンを蛍光ピーク面積によって定量化し、断片分析を併用して分子質量によって同定した。

【０１０９】

蛍光トレースは、全てのN-グリカンに関して一定の保持時間範囲を示した。全ての試料にわたる一致したシグナルのため、信頼できる構造帰属をMS/MS実験により実施した。比較したSP-Dタンパク質のグリコシル化パターンをTABLE 7(表7)に示す。

【０１１０】

【表７】

TABLE 7

N-グリカン	N-グリカンを含む炭水化物構造の百分率	
	hSP-D	**rhSP-D**
フコシル化グリカン	91	99
二分枝 N-アセチルグルコサミンを有するグリカン	18	38
少なくとも 1 つのシアル酸を有するグリカン	52	58
1 つのシアル酸を有するグリカン	45	50
2 つのシアル酸を有するグリカン	7	8
3 つのシアル酸を有するグリカン	0	0
少なくとも 1 つのガラクトースを有するグリカン	93	92
1 つのガラクトースを有するグリカン	19	22
2 つのガラクトースを有するグリカン	64	66
3 つのガラクトースを有するグリカン	10	4
単分岐グリカン	1	1
二分岐グリカン	82	90
三分岐グリカン	13	5
四分岐グリカン	1	1
少なくとも 1 つの GalNAc を有するグリカン	1	11
混成型グリカン	2	2
高マンノース型グリカン	2	2

【０１１１】

異なる分岐性の量から、式1×単分岐グリカンの割合+2×二分岐グリカンの割合+3×三分岐グリカンの割合+4×四分岐グリカンの割合=A数を使用して、A数を全体の分岐性の尺度として計算することができる。rhSP-D及びhSP-DのA数は非常に近似しており、rhSP-Dが200のA数を有し、hSP-Dが208のA数を有する。

【０１１２】

一部の態様では、hSP-D及びrhSP-DのN-グリコシル化プロファイルは類似していた。例えば、hSP-DとrhSP-Dの両方に関して、3つのシアル酸を有するグリカン、単分岐グリカン

、四分岐グリカン、混成型グリカン、又は高マンノース型グリカンを含む炭水化物構造の百分率は同じであった。しかしながら、一部の態様では、hSP-D及びrhSP-DのN-グリコシル化プロファイルは類似していなかった。例えば、二分枝N-アセチルグルコサミンを有するグリカン、1つのシアル酸を有するグリカン、3つのガラクトースを有するグリカン、三分岐グリカン、又は少なくとも1つのGalNAcを有するグリカンを含む炭水化物構造の百分率は、hSP-DとrhSP-Dとの間で異なっていた。

【０１１３】

更なる分析では、NM-H9D8(8B11)クローンからの2種の異なる精製バッチを含む、NM-H9D8細胞の異なるクローン中で産生された組換えヒトSP-D(rhSP-D)、CHO細胞の異なるクローン中で産生された組換えヒトSP-D(CHO-SP-D)、及びヒト羊水から得た天然のSP-D(hSP-D)の糖プロファイルを比較した。図8に示すように、rhSP-D及びhSP-DのN-グリコシル化プロファイルは極めて同等であるが、CHO-SP-Dは、非ヒト細胞株中での産生であるため、著しい相違を示す。図9は、NM-H9D8由来rhSP-D及びCHO由来CHO-SP-DのO-グリコシル化プロファイルもまた大きく異なることを更に実証する。ヒト羊水から得たSP-DのO-グリコシル化は、この分析に必要とされるタンパク質が多量であるため、決定することができなかった。N-グリコシル化プロファイルはSP-Dのポリペプチド鎖のアスパラギン残基に結合した全てのグリカン構造を含むが、O-グリコシル化プロファイルはセリン、トレオニン、ヒドロキシ-リジン、及びヒドロキシ-プロリン残基に結合したグリカン構造を示す。結論として、NM-H9D8細胞のクローン中で産生されたrhSP-Dは、天然に存在するhSP-Dのグリコシル化と非常に似たヒトグリコシル化パターンを有する。

【０１１４】

加えて、SP-Dのグリカン構造におけるシアル酸(N-アセチルノイラミン酸、NANA)の連結を分析した。NANAは一般に、α2,3又はα2,6立体構造で末端ガラクトース残基に連結し得る。ヒトグリコシル化では、α2,3-及びα2,6-連結NANAの混合物が見出されるが、CHO等のハムスター細胞はα2,6-連結NANAを産生しない。CHO及びNM-H9D8産生ヒトSP-Dを精製し、変性させ、還元した。N-グリカンを、N-グリカナーゼFを用いてインキュベーション中に放出させた。遊離N-グリカンを、フルオロフォア(RapiFluor、Waters社)を用いて標識し、続いてHILIC固相抽出を利用して精製工程を行った。ノイラミニダーゼ 処理に関しては、精製されたN-グリカンを、ノイラミニダーゼS(NEB)を用いて1時間、37℃で温浸した。ノイラミニダーゼSは、α2,3-連結NANAを特異的に除去するが、α2,6-連結NANAを切断しない。酵素を、繰り返しのHILIC固相抽出により除去した。蛍光検出を有するI-classシステム(Waters社)をHILIC-UPLCに使用した。精製された蛍光タグ付きN-グリカンの混合物を、0.5mL/分の流量、60℃のAcquity UPLC BEH Glycanカラム(150×2.1mm、1.7u、Waters社)で分離した。100%アセトニトリル(A)及び100mMギ酸アンモニウム、pH4.5を溶離液系として使用し、82分かけて22%Bから44%Bの勾配をかけた。蛍光波長設定は、λ_{ex}が265nm、λ_{em}が425nmであった。接続されたBruker Impact HD ESI-Q-TOF-MS(MS)を、N-グリカン同定のために陽イオンモードで使用した。N-グリカンを、断片分析を併用して分子質量に従って同定した。

【０１１５】

分析により、CHOからのSP-Dは20から70分の間のRTで不均一なN-グリカンプロファイルを示すことが明らかとなった。0個(S0)、1個(S1)、及び2個(S2)のNANAを有する二分岐N-グリカンを含む3つの主要なピークに加え、最大4個のNANAを有するより多分岐の構造が53～70分の間で検出される。二分岐のS1及びS2構造、並びに56分以降のRTにおける大半のより多分岐の構造は、2,3-連結NANAの存在を証明するノイラミニダーゼS処理の影響を受けている。全体のシアリル化は大幅に低下し、CHO産生SP-Dでは主としてα2,3-連結NANAの存在を指し示した(図10、パネルA及びパネルBを参照のこと)。NM-H9D8(8B11)細胞からのSP-Dでは、N-糖プロファイルのごくわずかな変化がノイラミニダーゼ処理後に検出された。RT 50分におけるモノシアリル化ピークはノイラミニダーゼS処理の影響を受けていない。NM-H9D8からのSP-Dでは、RT 54分においてS2 N-グリカンを含む小ピーク変化が1つのみ観察された。全体のシアリル化はノイラミニダーゼSによってごくわずかに低下し、NM-H9

D8(8B11)中で産生されたSP-Dが主としてα2,6-連結NANA、及びごく少量のα2,3-連結NANAを含むことを指し示した(図10、パネルC及びパネルDを参照のこと)。

【０１１６】

「含む(comprising)」という用語は、本明細書で使用する場合、「含む(including)」、「含有する(containing)」、又は「特徴とする(characterized by)」と同義であり、包括的又は非限定的であり、記載されていない更なる要素又は方法工程を排除しない。

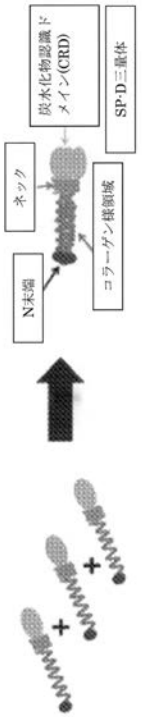
【０１１７】

上の説明は本発明のいくつかの方法及び材料を開示している。本発明は、方法及び材料の修正、並びに製造方法及び装置の変更が可能である。そのような修正は、当業者には、本開示の考慮又は本明細書に開示される発明の実施から明らかとなるだろう。それゆえ、本発明は、本明細書に開示される具体的な実施形態に限定されるのではなく、本発明の真の範囲及び趣旨内にある全ての修正形態及び代替形態を包含する、ということが意図される。

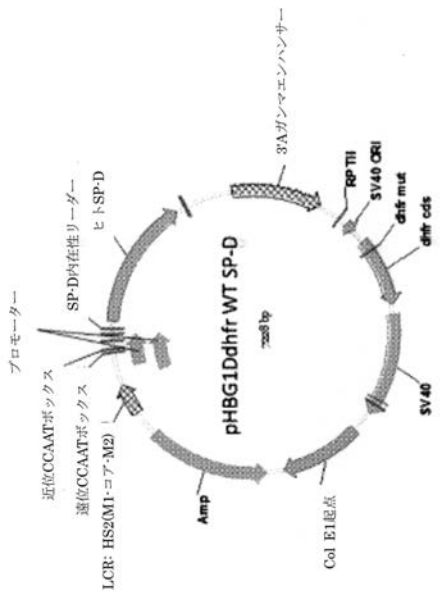
【０１１８】

公開及び未公開出願、特許、並びに文献参照を含むがこれらに限定されない、本明細書に引用された全ての参考文献は、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれ、これによって本明細書の一部をなす。参照によって組み込まれる刊行物、及び特許又は特許出願が本明細書に含有される開示と矛盾する範囲では、本明細書がそのようなあらゆる矛盾する材料にとって代わる及び/又は優先することが意図される。

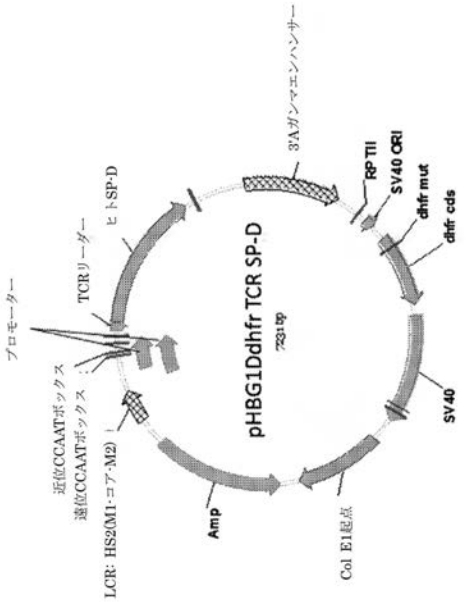
【図１】



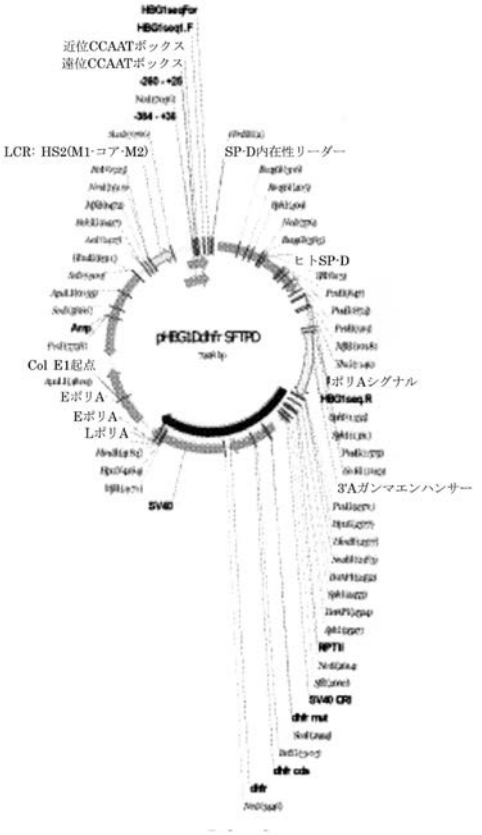
【図２Ａ】



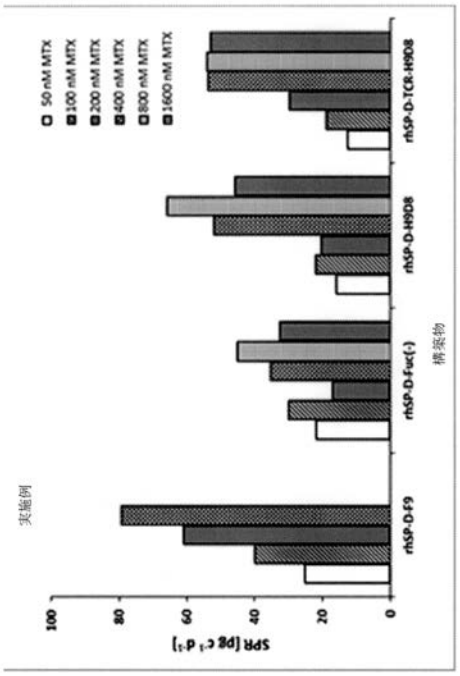
【図２Ｂ】


pHBG1Ddhfr TCR SP-D
7931 bp
プロモーター
TCRリーダー
ヒトSP-D
3'Aガンマエンハンサー
RP TII
SV40 ORI
dhfr mut
dhfr cds
SV40
Amp
Col E1起点
近位CCAATボックス
遠位CCAATボックス
LCR: HS2(M1-コア-M2)

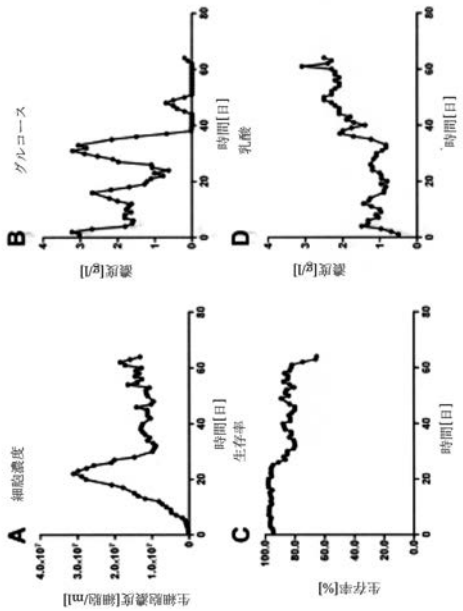
【図２Ｃ】


近位CCAATボックス
遠位CCAATボックス
LCR: HS2(M1-コア-M2)
SP-D内在性リーダー
ヒトSP-D
pHBG1Ddhfr SFTPD
Amp
Col E1起点
EポリA
EポリA
LポリA
SV40
ポリAシグナル
3'Aガンマエンハンサー
NPTII
SV40 ORI
dhfr mut
dhfr cds
dhfr

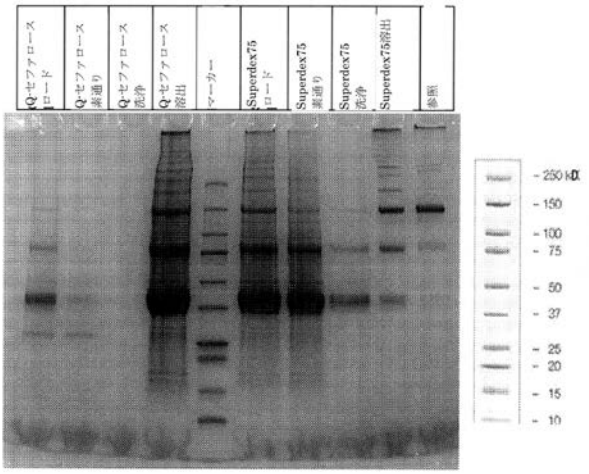
【図３】


50 nM MTX
100 nM MTX
200 nM MTX
400 nM MTX
800 nM MTX
1600 nM MTX
SPR [Pg c-1 d-1]
実施例
構築物
rhSP-D-F9
rhSP-D-Fuc(-)
rhSP-D-H9D8
rhSP-D-TCR-H9D8

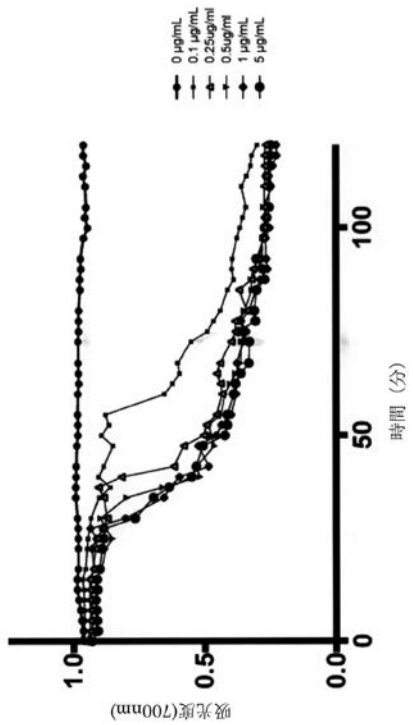
【図４】


A
細胞濃度
生細胞濃度[細胞/ml]
時間[日]
B
グルコース
乳酸
濃度[g/l]
時間[日]
C
生存率
生存率[%]
時間[日]
D
濃度[g/l]
時間[日]

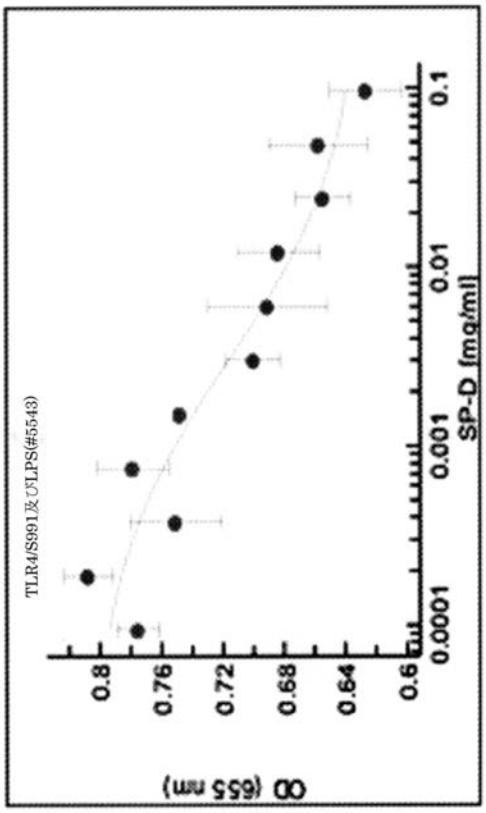
【図５】


Qセファロース ロード
Qセファロース 素通り
Qセファロース 洗浄
Qセファロース 溶出
マーカー
Superdex75 ロード
Superdex75 素通り
Superdex75 洗浄
Superdex75溶出
参照
250 kD
150
100
75
50
37
25
20
15
10

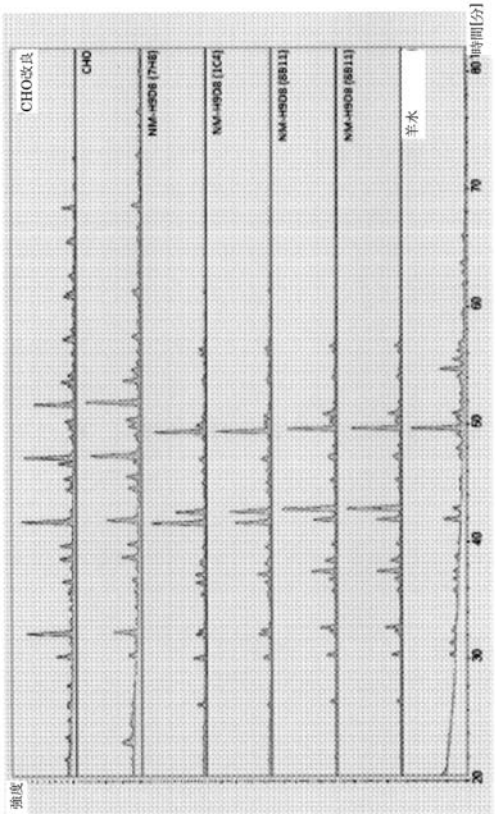
【図６】


0 μg/mL
0.1 μg/mL
0.25ug/ml
0.5ug/ml
1 μg/mL
5 μg/mL
吸光度(700nm)
1.0
0.5
0.0
0
50
100
時間（分）

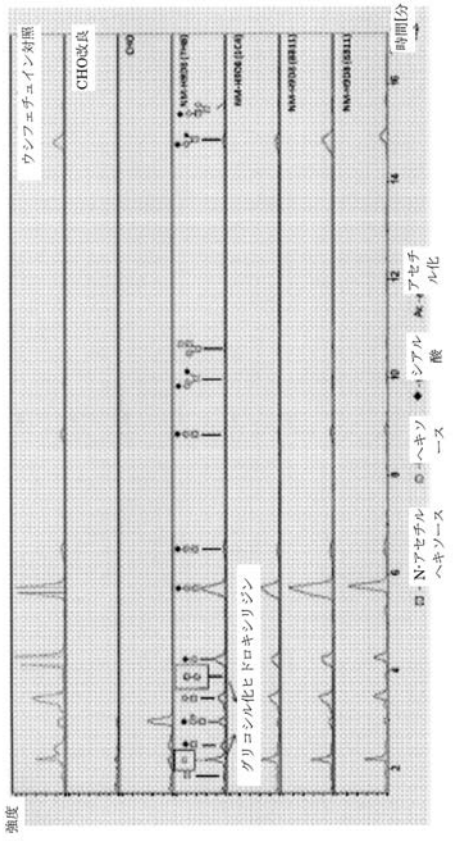
【図７】


TLR4/S991及びLPS(#5543)
OD (655 nm)
0.8
0.76
0.72
0.68
0.64
0.6
0.0001
0.001
0.01
0.1
SP-D (mg/ml)

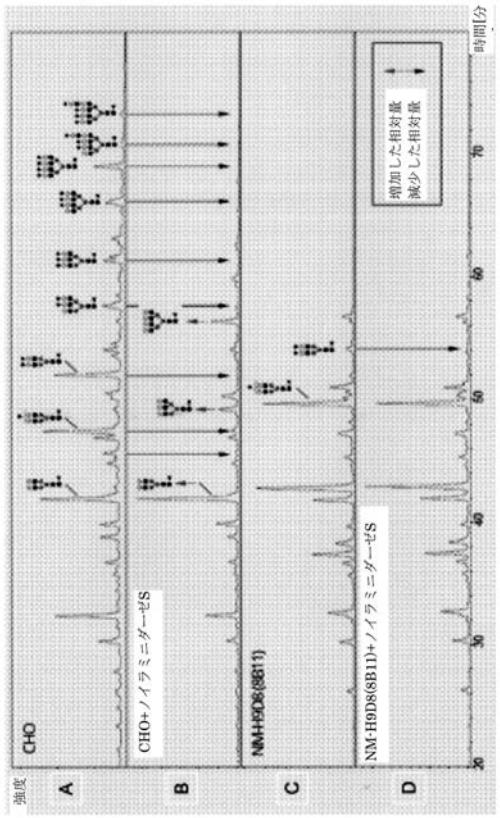
【図８】


CHO改良
CHO
NM-H9D8 (7H8)
NM-H9D8 (1C4)
NM-H9D8 (6B11)
NM-H9D9 (6B11)
羊水
強度
時間[分]
20
30
40
50
60
70
80

【図９】



【図１０】



【配列表】
2020534814000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/049391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/00; A61P 11/00; C07K 14/00; C07K 14/435; C07K 14/785; C12N 15/07 (2018.01)
CPC - A61K 38/00; A61K 38/395; A61P 11/00; C07K 14/00; C07K 14/435; C07K 14/785; C12N 15/79; C12N 2015/8518 (2018.08)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 435/372; 435/69.1; 435/93.7; 514/1.1; 514/15.5; 530/395 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2012/0220531 A1 (WHITSETT et al) 30 August 2012 (30.08.2012) entire document	1, 5, 15-17 --- 2-4, 10, 13, 18-30, 33, 34, 37-40, 42-44, 46-51
Y	US 2015/0368363 A1 (GLYCOTOPE GMBH) 24 December 2015 (24.12.2015) entire document	2-4, 10, 13, 18-25, 28-30, 33, 34, 37-40, 42-44, 46-51
Y	US 2008/0226681 A1 (GOLETZ et al) 18 September 2008 (18.09.2008) entire document	13, 34, 47
Y	US 2013/0330768 A1 (STAHN et al) 12 December 2013 (12.12.2013) entire document	26, 27
P, X	WO 2017/162733 A1 (GLYCOTOPE GMBH) 28 September 2017 (28.09.2017) entire document	1-52
A	US 2012/0277165 A1 (COLLINS et al) 01 November 2012 (01.11.2012) entire document	1-52
A	US 2016/0331844 A1 (CUREVAC AG) 17 November 2016 (17.11.2016) entire document	1-52
A	FERRARA et al. "Unique Carbohydrate–Carbohydrate Interactions are Required for High Affinity Binding Between FcγRIII and Antibodies Lacking Core Fucose," Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 02 August 2011 (02.08.2011), Vol. 108, No. 31, Pgs. 12669-12674. entire document	1-52

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 November 2018	19 NOV 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/049391

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-10 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/049391

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROUWENDAL et al. "A Comparison of Anti-HER2 IgA and IgG1 in Vivo Efficacy is Facilitated by High N-glycan Sialylation of the IgA," mAbs, 02 January 2016 (02.01.2016), Vol. 8, No. 1, Pgs. 74-86. entire document	1-52
A	US 2017/0080103 A1 (SYNTHON BIOPHARMACEUTICAL B.V.) 23 March 2017 (23.03.2017) entire document	1-52

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100133400
弁理士 阿部 達彦
(72)発明者 ジャン・スーザン・ローゼンバウム
アメリカ合衆国・オハイオ・４５２４９・シンシナティ・コンリー・ロード・１１８０４・スイート・＃１７５・エアウェイ・セラピューティクス・エルエルシー内
(72)発明者 フレデリック・ギャポン・クワスト
ドイツ・１３１２５・ベルリン・ロベルト－レスレ－シュトラーセ・１０・グリコトープ・ゲーエムベーハー内
(72)発明者 マティアス・カウプ
ドイツ・１３１２５・ベルリン・ロベルト－レスレ－シュトラーセ・１０・グリコトープ・ゲーエムベーハー内
(72)発明者 ラルス・シュテックル
ドイツ・１３１２５・ベルリン・ロベルト－レスレ－シュトラーセ・１０・グリコトープ・ゲーエムベーハー内

Ｆターム(参考) 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA93X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44