(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112040967 A
(43)申请公布日 2020.12.04

(21)申请号 201880071150.8

(22)申请日 2018.09.04

(30)优先权数据
62/554,825 2017.09.06 US
62/614,758 2018.01.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/049391 2018.09.04

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/050857 EN 2019.03.14

(83)生物保藏信息
DSM-ACC2606 2003.08.14
DSM-ACC3340 2018.09.04
DSM-ACC2856 2007.08.08
DSM-ACC2806 2006.09.15

(71)申请人 气道治疗公司
地址 美国俄亥俄州
申请人 格莱克托佩有限公司

(72)发明人 简·苏珊·罗森鲍姆
弗雷德里克·加彭·夸斯特
马提亚·考珀 拉尔斯·斯托克尔

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
A61K 38/00(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
C07K 14/00(2006.01)
C07K 14/435(2006.01)
C07K 14/785(2006.01)
C12N 15/07(2006.01)

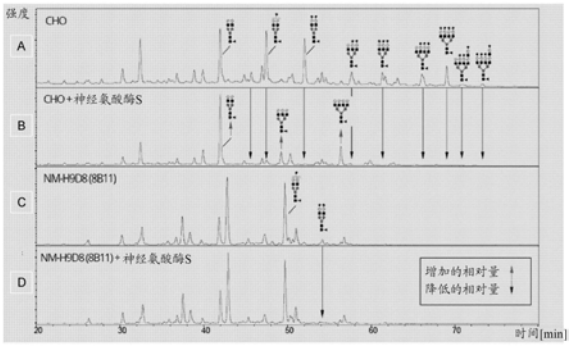
权利要求书3页 说明书26页
序列表7页 附图12页

(54)发明名称

用于制备表面活性蛋白D(SP-D)的方法、组合物和细胞

(57)摘要

本文中提供的方法和组合物的一些实施方案涉及表面活性蛋白D(SP-D)的制备。一些实施方包括人SP-D在某些细胞系中的表达,以及从此类细胞系中纯化人SP-D。一些实施方案包括某些寡聚体形式的人SP-D的制备。



CN 112040967 A

1.用于产生人表面活性蛋白D(SP-D)多肽组合物的方法,所述方法包括:

(a)将编码所述SP-D多肽的多核苷酸引入人哺乳动物细胞中;

(b)在其中表达所述SP-D多肽的条件下培养所述细胞;和

(c)从所述细胞中分离所表达的SP-D多肽。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述细胞来源于人骨髓性白血病细胞。

3.如权利要求2所述的方法,其中所述细胞选自:NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12和NM-F9。

4.如权利要求3所述的方法,其中所述细胞是NM-H9D8细胞。

5.如权利要求1所述的方法,其中所述多核苷酸编码野生型SP-D多肽前导序列。

6.如权利要求5所述的方法,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:03。

7.如权利要求5所述的方法,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:02。

8.如权利要求5所述的方法,其中所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的多肽。

9.如权利要求5所述的方法,其中所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的多肽。

10.如权利要求1所述的方法,其中所述多核苷酸编码野生型T细胞受体(TCR)多肽前导序列。

11.如权利要求10所述的方法,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:08。

12.如权利要求10所述的方法,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:07。

13.如权利要求10所述的方法,其中所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的多肽。

14.如权利要求10所述的方法,其中所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:09的氨基酸序列的多肽。

15.如权利要求1所述的方法,其中所述SP-D多肽包含在多态性位置处的残基,其中所述残基选自:Met11/31、Thr160/180、Ser270/290和Ala286/306。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述SP-D多肽包含Met11/31。

17.如权利要求15所述的方法,其中所述SP-D多肽包含Met11/31、Thr160/180、Ser270/290和Ala286/306。

18.如权利要求1所述的方法,其还包括分离所表达的SP-D多肽的群体,每个所表达的SP-D多肽包含在N-糖基化位点处连接的复合型碳水化合物,其中所述群体具有包含以下特征的糖基化模式:

(i)至少70%的所述复合型碳水化合物包括核心岩藻糖;

(ii)至少10%的所述复合型碳水化合物包括至少一个唾液酸残基;

(iii)至少50%的所述复合型碳水化合物包括至少双触角碳水化合物结构;

(iv)至少10%的所述复合型碳水化合物包括等分的N-乙酰葡糖胺;

(v)少于10%的所述碳水化合物为高甘露糖型结构;和

(vi)可检测量的α2,6-偶联的唾液酸残基。

19.如权利要求18所述的方法,其中所述群体具有包含以下特征中的一个或多个的糖基化模式:

(i)至少20%的所述复合型碳水化合物包括等分的N-乙酰葡糖胺;和

(iii)至少85％的所述复合型碳水化合物包括核心岩藻糖。

20.如权利要求1所述的方法,其中所述多核苷酸编码二氢叶酸还原酶多肽。

21.如权利要求1所述的方法,其中培养所述细胞包括使所述细胞与抗叶酸剂接触。

22.如权利要求21所述的方法,其中通过增加所述抗叶酸剂的浓度来增加所述SP-D多肽的表达。

23.如权利要求21所述的方法,其中所述抗叶酸剂包括甲氨蝶呤。

24.如权利要求1所述的方法,其中在灌注生物反应器中培养所述细胞。

25.如权利要求1所述的方法,其中在连续培养中培养所述细胞。

26.如权利要求1所述的方法,其中培养所述细胞包括维持具有pH7.2、40％和/或20％的溶解氧以及37℃的温度的生长培养基。

27.如权利要求26所述的方法,其中所述溶解氧低于35％,优选30％。

28.如权利要求1所述的方法,其中从所述细胞中分离所表达的SP-D多肽包括从含有所述细胞的培养基中制备细胞上清液。

29.表达载体,其编码前导多肽、人表面活性蛋白D(SP-D)多肽和二氢叶酸还原酶。

30.如权利要求29所述的载体,其中所述前导多肽是野生型SP-D多肽前导序列。

31.如权利要求30所述的载体,其中所述前导多肽包含SEQ ID NO:05。

32.如权利要求30所述的载体,其中所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的多肽。

33.如权利要求29所述的载体,其中所述前导多肽是野生型T细胞受体(TCR)多肽前导序列。

34.如权利要求33所述的载体,其中所述前导多肽包含SEQ ID NO:10。

35.如权利要求29所述的载体,其包含具有选自SEQ ID NO:02和07的序列的多核苷酸。

36.如权利要求29所述的载体,其编码具有选自SEQ ID NO:04和09的氨基酸序列的多肽。

37.永生化的人细胞,其包含权利要求29-36中任一项所述的表达载体。

38.如权利要求37所述的细胞,其中所述细胞来源于人骨髓性白血病细胞。

39.如权利要求38所述的细胞,其中所述细胞选自NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12和NM-F9。

40.如权利要求39所述的细胞,其中所述细胞是NM-H9D8细胞。

41.如权利要求39所述的细胞,其中所述细胞是NM-H9D8(8B11)细胞。

42.永生化的人细胞,其包含编码人表面活性蛋白D(SP-D)多肽的表达载体,其中所述细胞来源于人骨髓性白血病细胞。

43.如权利要求42所述的细胞,其中所述表达载体还编码前导多肽。

44.如权利要求43所述的细胞,其中所述前导多肽是野生型SP-D多肽前导序列。

45.如权利要求44所述的细胞,其中所述多肽包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列。

46.如权利要求43所述的细胞,其中所述前导多肽是野生型T细胞受体(TCR)多肽前导序列。

47.如权利要求46所述的细胞,其中所述前导多肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

48.如权利要求42所述的细胞,其中所述人表面活性蛋白D(SP-D)多肽包含SEQ ID NO:04的第22至376位的氨基酸序列。

49.如权利要求42所述的细胞,其中所述表达载体还编码二氢叶酸还原酶。

50.如权利要求42所述的细胞,其中所述细胞选自NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12和NM-F9。

51.如权利要求50所述的细胞,其中所述细胞是NM-H9D8细胞。

52.如权利要求50所述的细胞,其中所述细胞是NM-H9D8(8B11)细胞。

用于制备表面活性蛋白D(SP-D)的方法、组合物和细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年1月8日提交的题为“用于制备表面活性蛋白D(SP-D)的方法、组合物和细胞(METHODS,COMPOSITIONS AND CELLS FOR PREPARING SURFACTANT PROTEIN D(SP-D))”的第62/614758号美国临时申请,以及2017年9月6日提交的题为“用于制备表面活性蛋白D(SP-D)的方法、组合物和细胞(METHODS,COMPOSITIONS AND CELLS FOR PREPARING SURFACTANT PROTEIN D(SP-D))”的第62/554825号美国临时申请的优先权,它们各自通过引用整体并入。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表作为名为AIRWY007WOSEQ的文件提供,创建于2018年8月31日,其大小大约为13Kb。序列表的电子格式中的信息通过引入整体并入本文中。

发明领域

[0005] 本文所提供的方法和组合物的一些实施方案涉及表面活性蛋白D(SP-D)的制备。一些实施方案包括人SP-D在某些细胞系中的表达,以及从此类细胞系中纯化人SP-D。一些实施方案包括某些寡聚体形式的人SP-D的制备。

[0006] 发明背景

[0007] 哺乳动物肺表面活性物质是蛋白质(10%)和脂质(90%)的混合物,其包括主要的脂质成分二棕榈酰磷脂酰胆碱(Zuo YY等人,Biochim Biophys Acta(2008)1778:1947-77)。肺表面活性物质的主要功能是确保肺内最小的表面张力以避免在呼吸过程中萎陷。此外,通过与吸入的病原体相互作用,肺表面活性物质还参与宿主防御(Clements JA.AM Rev Respir Dis(1977)115:67-71)。因此,肺表面活性物质缺乏与肺疾病(如哮喘、细支气管炎、呼吸窘迫综合征(RDS)、囊肿性纤维化和肺炎)相关(Griese M.Eur Respir J(1999)13:1455-76)。表面活性物质制剂被用于治疗RDS,其每年在全球影响～150万早产的婴儿。呼吸窘迫综合征是早产儿肺结构不成熟引起的一种主要的肺表面活性物质缺乏疾病,这使得其难以呼吸,抑制气体交换并促进肺泡萎陷(Notter RH.,肺表面活性物质(Lung Surfactants),基础科学和临床应用(Basic Science and Clinical Applications),纽约,NY:Marcel Dekker Inc.)。然而,如果肺部被感染或如果存在炎性或氧化性并发症,则治疗将变得更加困难,因为目前的表面活性物质制剂缺乏表面活性蛋白D(SP-D)。因此,对复杂肺部疾病的成功治疗需要产生其组成尽可能接近地与天然肺表面活性物质匹配的表面活性物质制剂(Robertson B等人,Biochim Biophys Acta(1998)1408:346-61)。

[0008] SP-D通过提供抗炎和抗微生物活性而在肺先天免疫系统中起作用,所述抗炎症和抗微生物活性治疗慢性肺部疾病,诸如哮喘、囊肿性纤维化和吸烟诱导的肺气肿(Clark H等人,Immunobiology(2002)205:619-31)。基于早产新生羔羊的数据表明,施用～2-3mg/kg重组人SP-D与100mg/kg Survanta®(可在美国获得的天然表面活性物质)的组合比单独施用Survanta®用于预防内毒素休克和减少由通气引起的肺部炎症更有效(Ikegami M等

人,Am J Respir Crit Care Med(2006)173:1342-7;Sato A等人,Am J Respir Crit Care Med(2010)181:1098-105)。

[0009] 传统上,已经从支气管肺泡灌洗液或羊水的上清液中分离出SP-D,但大部分SP-D在纯化过程中损失,部分是由于SP-D的亲水性质(Dodagatta-Marri E等人,Methods Mol Biol(2014)100:273-90)。使用天然SP-D来补充肺表面活性物质制剂可以确保治疗效率,因为内源性表面活性物质中的更高级多聚化增加了SP-D与病原体表面上碳水化合物配体的结合位点的数量,从而实现了有效的细菌和病毒凝集效果(White M等人,J Immunol(2008)181:7936-43)。受体识别和受体介导的信号转导也需要适当的寡聚化状态,以调节宿主的免疫应答(Yamoze M等人,J Biol Chem(2008)283:35878-35888)以及用于维持表面活性物质体内平衡(Zhang L等人,J Biol Chem(2001)276:19214-19219)。

[0010] 低的SP-D产率和可变的寡聚化状态使得难以使用天然来源来生产药物SP-D(Strong P等人,J Immunol Methods(1998)220:139-49)。为了克服这些限制中的一些,可以将重组SP-D在微生物或哺乳动物细胞系中产生,潜在地提供了用于产生同质重组SP-D制剂的大规模平台。然而,将重组人SP-D(rhSP-D)表达至足以在通常使用的哺乳动物细胞系中进行商业活动的水平是有挑战性的,因为蛋白质没有被有效地合成并且产量通常<2mg纯化的蛋白质/升。尽管在非哺乳动物系统中产量趋向于更高,但是已经尝试在诸如酵母或细菌的系统中仅表达SP-D的截短变体,其缺点是不产生蛋白质的糖基化形式或不产生具有人糖基化模式的蛋白质(Salgado D等人,Front Immunol(2014)5:623,doi:10.3389/fimmu.2014.00623)。此外,迄今为止还不可能控制重组和天然人SP-D所见的寡聚化状态的可变性。除非表达系统能够可重复地产生在天然SP-D中所观察到的具有一致稳定水平的更高级多聚化状态的rhSP-D,否则此类制剂的功效可能会降低。

[0011] 发明概述

[0012] 本文所提供的方法和组合物的一些实施方案包括用于产生人表面活性蛋白D(SP-D)多肽组合物的方法,所述方法包括:(a)将编码所述SP-D多肽的多核苷酸引入人哺乳动物细胞中;(b)在其中表达所述SP-D多肽的条件下培养所述细胞;和(c)从所述细胞中分离所表达的SP-D多肽。

[0013] 在一些实施方案中,所述细胞来源于人骨髓性白血病细胞。在一些实施方案中,所述细胞选自NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12和NM-F9。在一些实施方案中,所述细胞是NM-H9D8细胞。

[0014] 在一些实施方案中,所述多核苷酸编码野生型SP-D多肽前导序列。

[0015] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:03。

[0016] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:02。

[0017] 在一些实施方案中,所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的多肽。

[0018] 在一些实施方案中,所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的多肽。

[0019] 在一些实施方案中,所述多核苷酸编码野生型T细胞受体(TCR)多肽前导序列。

[0020] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:08。

[0021] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:07。

[0022] 在一些实施方案中,所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的多肽。

[0023] 在一些实施方案中,所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:09的氨基酸序列的多肽。

[0024] 在一些实施方案中,所述SP-D多肽包含在多态性位置处的残基,其中所述残基选自Met11/31、Thr160/180、Ser270/290和Ala286/306。在一些实施方案中,所述SP-D多肽包含Met11/31。在一些实施方案中,所述SP-D多肽包含Met11/31、Thr160/180、Ser270/290和Ala286/306。

[0025] 一些实施方案还包括分离所表达的SP-D多肽的群体,每个所表达的SP-D多肽包含在N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物,其中所述群体具有包含以下特征的糖基化模式:(i)至少70%的所述复合型碳水化合物包括核心岩藻糖;(ii)至少10%的所述复合型碳水化合物包括至少一个唾液酸残基;(iii)至少50%的所述复合型碳水化合物包括至少双触角碳水化合物结构;(iv)至少10%的所述复合型碳水化合物包括等分的N-乙酰葡糖胺;(v)少于10%的所述碳水化合物为高甘露糖型结构;和(vi)可检测量的α2,6-偶联的唾液酸残基。

[0026] 在一些实施方案中,所述群体具有包含以下特征中的一个或多个的糖基化模式:(i)至少20%的所述复合型碳水化合物包括等分的N-乙酰葡糖胺;和(ii)至少85%的所述复合型碳水化合物包括核心岩藻糖。

[0027] 在一些实施方案中,所述多核苷酸编码二氢叶酸还原酶多肽。在一些实施方案中,培养所述细胞包括使细胞与抗叶酸剂接触。在一些实施方案中,通过增加所述抗叶酸剂的浓度来增加所述SP-D多肽的表达。在一些实施方案中,所述抗叶酸剂包括甲氨蝶呤。

[0028] 在一些实施方案中,在灌注生物反应器中培养所述细胞。

[0029] 在一些实施方案中,在连续培养中培养所述细胞。

[0030] 在一些实施方案中,培养所述细胞包括维持具有pH 7.2、40%和/或20%的溶解氧以及37℃的温度的生长培养基。在一些实施方案中,所述溶解氧低于35%,优选30%。

[0031] 在一些实施方案中,从所述细胞中分离所表达的SP-D多肽包括从含有所述细胞的培养基中制备细胞上清液。

[0032] 本文所提供的方法和组合物的一些实施方案包括表达载体,其编码前导多肽、人表面活性蛋白D(SP-D)多肽和二氢叶酸还原酶。

[0033] 在一些实施方案中,所述前导多肽是野生型SP-D多肽前导序列。在一些实施方案中,所述前导多肽包含SEQ ID NO:05。

[0034] 在一些实施方案中,所述多核苷酸编码具有包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的多肽。

[0035] 在一些实施方案中,所述前导多肽是野生型T细胞受体(TCR)多肽前导序列。在一些实施方案中,所述前导多肽包含SEQ ID NO:10。

[0036] 在一些实施方案中,所述载体包括具有选自SEQ ID NO:02和07的序列的多核苷酸。

[0037] 在一些实施方案中,所述载体包括编码具有选自SEQ ID NO:04和09的氨基酸序列的多肽。

[0038] 本文所提供的方法和组合物的一些实施方案包括永生化的人细胞，其包含与表达载体相关的前述实施方案中的任一个的表达载体。在一些实施方案中，所述细胞来源于人骨髓性白血病细胞。在一些实施方案中，细胞选自NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12和NM-F9。在一些实施方案中，所述细胞是NM-H9D8细胞。在一些实施方案中，所述细胞是NM-H9D8(8B11)细胞。

[0039] 本文所提供的方法和组合物的一些实施方案包括永生化的人细胞，其包含编码人表面活性蛋白D(SP-D)多肽的表达载体，其中所述细胞来源于人骨髓白血病细胞。

[0040] 在一些实施方案中，所述表达载体还编码前导多肽。在一些实施方案中，所述前导多肽是野生型SP-D多肽前导序列。在一些实施方案中，所述多肽包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述前导多肽是野生型T细胞受体(TCR)多肽前导序列。在一些实施方案中，所述前导多肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0041] 在一些实施方案中，所述人表面活性蛋白D(SP-D)多肽包含SEQ ID NO:04的第22至376位的氨基酸序列。

[0042] 在一些实施方案中，所述表达载体还编码二氢叶酸还原酶。

[0043] 在一些实施方案中，所述细胞选自NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12和NM-F9。在一些实施方案中，所述细胞是NM-H9D8细胞。在一些实施方案中，所述细胞是NM-H9D8(8B11)细胞。

[0044] 附图简述

[0045] 图1是描绘SP-D三聚体的形成和SP-D三聚体的结构特征的示意图。

[0046] 图2A是表达载体pHBG1Ddhfr_WT_SP-D(7228bp)的图谱，其含有编码人SP-D、人SP-D前导序列和二氢叶酸还原酶(DHFR)的多核苷酸。

[0047] 图2B是表达载体pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D(7231bp)的图谱，其含有编码人SP-D、人T细胞受体(TCR)前导序列和二氢叶酸还原酶(DHFR)的多核苷酸。

[0048] 图2C是表达载体pHBG1Ddhfr_SFTPD(7228bp)的图谱，其含有编码人SP-D、人SP-D前导序列和二氢叶酸还原酶(DHFR)的多核苷酸。

[0049] 图3是显示用各种甲氨蝶呤(MTX)浓度所培养的库的比生产率的条形图。细胞系库包括‘rhSP-D-F9’、‘rhSP-D-Fuc(-)’、‘rhSP-D-H9D8’(它们是各自用含有人SP-D前导序列的人SP-D表达载体转染的F9细胞、H9D8-E6Q12细胞和H9D8细胞)；和‘rhSP-D-TCR-H9D8’(其是用含有人TCR前导序列的人SP-D表达载体转染的H9D8细胞)。

[0050] 图4是显示来自克隆H9D8-P1315-2A5的生物反应器运行的培养条件随时间变化的一系列图，其包括：活细胞浓度(图A)；葡萄糖浓度(图B)；细胞存活率(图C)；乳酸盐浓度(图D)。

[0051] 图5是用考马斯蓝染色的SDS-PAGE凝胶的照片，其显示了在来自表达细胞的rhSP-D纯化的各个阶段中的蛋白质。

[0052] 图6是细菌聚集测定的线图，其中用从克隆H9D8-P1315-2A5纯化的各种浓度的rhSP-D处理细菌以显示SP-D处理如何随时间影响细菌聚集。

[0053] 图7是显示在TLR4受体通路测定中从克隆H9D8-P1315-2A5纯化的增加浓度的rhSP-D的抑制活性的线图。

[0054] 图8是从不同来源的纯化的rhSP-D释放并经过具有荧光检测的亲水相互作用超高效色谱分析的荧光标记的N-聚糖的色谱图。

[0055] 图9是从不同来源的SP-D释放并经过具有荧光检测的亲水相互作用超高效色谱分析的荧光标记的O-聚糖的色谱图。

[0056] 图10是在未进行(图A和图C)和进行(图B和图D)神经氨酸酶S处理的情况下从CHO(图A和图B)和NM-H9D8(8B11)(图C和图D)中产生的SP-D释放的并经过具有荧光检测的亲水相互作用超高效色谱分析的荧光标记的N-聚糖的色谱图。

[0057] 详述

[0058] 表面活性蛋白D(SP-D)是C-型(Ca^{2+}依赖性)凝集素,其包含以下四个结构域:形成分子间二硫键所需的半胱氨酸连接的N-末端区、三螺旋胶原蛋白区、α-螺旋卷曲螺旋三聚化颈肽和C-末端钙依赖性碳水化合物识别结构域(CRD)(Crouch E.等人,(1994)J Biol Chem,269:17311-9)。单体通过将胶原区折叠成三股螺旋并在颈部区域中组装α-螺旋的卷曲螺旋束而形成三聚体(图1)。这些三聚体通过富含半胱氨酸的N-末端结构域中的两个二硫键被稳定。SP-D三聚体具有129kDa的总分子量,其包含三条相同的43-kDa的多肽链。SP-D三聚体可以形成随着大小和构象而变化的更高级的寡聚化状态。更高级寡聚化状态对于SP-D功能可能是重要的(Hakansson K等人,Protein Sci(2000)9:1607-17;Crouch E.Respir Res(2000)1:93-108;Crouch E.等人,(2006)J Biol Chem,281:18008-14)。SP-D三聚体缔合成更高级寡聚化状态对纯化和储存过程中的环境因素和条件敏感。先前还没有阐明在SP-D的大寡聚体的形成中涉及的相互作用的途径和类型。本文所提供的方法和组合物的一些实施方案涉及某些形式的SP-D寡聚体的制备和纯化。

[0059] 已经通过原子力显微镜(AFM)和电泳表征了在哺乳动物中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中产生的人SP-D。rhSP-D的溶液可以包括不同SP-D寡聚体形式的不同群体,其包括:三聚体、六聚体、十二聚体和包含多于4个三聚体的被鉴定为“毛球(fuzzy balls)”的较大寡聚体种类。在本发明的一些实施方案中证明了,与CHO细胞中SP-D的产生相比,本文所述的SP-D的产生(特别是使用本文所述的载体和/或宿主细胞和/或纯化方法)产生了更高产率的SP-D蛋白和更高量的SP-D十二聚体以及更低量的更大寡聚体种类。在本发明的一些实施方案中证明了,与CHO细胞中rhSP-D的产生相比,本文所述的SP-D的产生(特别是使用本文所述的载体和/或宿主细胞和/或纯化方法)产生更高产率的SP-D蛋白和更高相对量的SP-D十二聚体以及更低相对量的更大寡聚体种类。例如,产率可以增加至多达约5-15倍,借助于SEC HPLC所测量的纯化的rhSP-D组合物中SP-D十二聚体的相对量可以提高约30%或更多,并且较大寡聚体种类的相对量可以降低约30%或更多。经由Q-琼脂糖凝胶和Superdex 75柱纯化细胞培养物上清液不改变十二聚体与较大寡聚体种类(如毛球)的比例。因此,在纯化的SP-D组合物中十二聚体和较大寡聚体种类的相对量代表细胞培养物上清液中的那些。

[0060] 某些表达载体和细胞

[0061] 在一方面,提供了包含编码人SP-D多肽的多核苷酸的表达载体。一些实施方案包括制备包含编码人SP-D多肽的多核苷酸的表达载体。人SP-D多肽中的多态性可包括:残基11,ATG(Met)->ACG(Thr);残基25,AGT(Ser)->AGC(Ser);残基160,ACA(Thr)->GCA(Ala);残基270,TCT(Ser)->ACT(Thr);以及残基286,GCT(Ala)->GCC(Ala),其中位置与成熟SP-D多肽中的位置相关。在一些实施方案中,SP-D多肽包含在多态性位置处的某一残基,其中残基选自Met11/31、Thr160/180、Ser270/290和Ala286/306,其中残基位置与成熟SP-D多肽中的位置相关,并且与具有它的前导多肽的SP-D多肽中的位置相关。在一些实施方案中,SP-D多

肽包含Met11/31。在一些实施方案中，SP-D多肽包含Met11/31、Thr160/180、Ser270/290和Ala286/306。表1中提供了此类序列的实例。在一些实施方案中，SP-D由核酸编码，所述核酸在所述多核苷酸的整个长度上与选自SEQ ID NO:02和SEQ ID NO:07的多核苷酸具有至少约80％、90％、95％、99％和100％，或任何前述数字之间的任何范围的同一性。在一些实施方案中，SP-D多肽在多核苷酸的整个长度上与选自SEQ ID NO:04和SEQ ID NO:09的多肽具有至少约80％、90％、95％、99％和100％，或任何前述数字之间的任何范围的同源性。在一些实施方案中，SP-D多肽包含SEQ ID NO:04的第22至376位的氨基酸序列或在参考序列的整个长度上与其至少80％、至少90％、至少95％或至少99％相同的氨基酸序列。

[0062] 在一些实施方案中，表达载体编码位于编码SP-D多肽的核苷酸序列的5'的前导多肽。在一些实施方案中，前导序列是野生型T细胞受体(TCR)前导序列或野生型SP-D前导序列。表1中提供了此类序列的实例。在一些实施方案中，前导多肽由核酸编码，所述核酸在所述多核苷酸的整个长度上与选自SEQ ID NO:03和SEQ ID NO:08的多核苷酸具有至少约80％、90％、95％、99％和100％，或任何前述数字之间的任何范围的同一性。在一些实施方案中，前导多肽在多核苷酸的整个长度上与选自SEQ ID NO:05和SEQ ID NO:10的多肽具有至少约80％、90％、95％、99％和100％，或任何前述数字之间的任何范围的同源性。

[0063] 在一些实施方案中，表达载体包括用于选择具有所述选择基因的哺乳动物细胞的选择基因。此类基因的实例包括编码蛋白质(如提供抗抗叶酸剂化合物(如甲氨蝶呤)的抗性的二氢叶酸还原酶)的那些基因。

[0064] 在一方面，提供了包含一种或多种表达载体的细胞，所述表达载体包含编码人SP-D多肽的多核苷酸。一些实施方案包括含有一种或多种本文所述的表达载体的细胞。此类细胞的实例包括可以用增强所表达的SP-D多肽的活性和/或稳定性的糖基化模式修饰所表达的SP-D多肽的哺乳动物细胞。此类细胞包括永生化的人血液细胞，如来源于人骨髓性白血病的细胞。此类细胞的实例包括NM-H9D8(DSM ACC 2806)；NM-H9D8-E6Q12(DSM ACC 2856)；以及NM-F9(DSM ACC 2606)，它们已经按照规定的ACC编码被保藏在布伦瑞克(德国)“DSMZ-德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)”。NM-F9由Nemod Biotherapeutics GmbH&Co.KG,Robert-Rössle-Str.10,13125柏林(DE)于2003年8月14日保藏，NM-H9D8由Glycotope GmbH,Robert-Rössle-Str.10,13125柏林(DE)于2006年9月15日保藏，和NM-H9D8-E6Q12由Glycotope GmbH,Robert-Rössle-Str.10,13125柏林(DE)于2007年8月8日保藏。有用细胞系的更多实例可在美国专利第9,051,356号中找到，其通过引用整体并入本文中。在一些实施方案中，包含含有编码人SP-D多肽的多核苷酸的一种或多种表达载体的细胞是细胞系NM-H9D8的细胞。

[0065] 用于产生人SP-D的某些方法

[0066] 在一方面，提供了产生人SP-D多肽组合物的方法。一些实施方案包括通过以下产生人SP-D多肽组合物的方法：(a)将编码人SP-D多肽的多核苷酸引入到哺乳动物细胞中；(b)在其中表达SP-D多肽的条件下培养细胞；(c)从细胞中分离所表达的SP-D多肽。将编码SP-D多肽的多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域熟知的，并且包括电穿孔，使用阳离子脂质、磷酸钙、DEAE-葡聚糖的转染，或通过病毒颗粒(如腺病毒或逆转录病毒或它们的组合)的感染。一些此类方法包括将本文所提供的表达载体线性化，并将线性化的载体转染到细胞中。在一些实施方案中，本文所述的细胞和/或表达载体被用于产生人SP-D多肽组合

物的方法中。在一些实施方案中，SP-D多肽由哺乳动物细胞分泌。在这些实施方案中，可以从用于培养细胞的细胞培养基中分离所表达的SP-D多肽。在一些实施方案中，如本文所述完成分离所表达的SP-D多肽。

[0067] 在一些实施方案中，所述细胞来源于人骨髓性白血病细胞，如NM-H9D8、NM-H9D8-E6Q12和NM-F9细胞系。

[0068] 一些实施方案包括选择包含表达载体的细胞的方法。一些此类实施方案可以包括用抗叶酸剂(如甲氨蝶呤)培养细胞。转染子可以通过诸如亚克隆的方法分离，并且表达SP-D的细胞可以通过本领域熟知的方法容易地鉴定，如使用针对SP-D的抗体结合ELISA、蛋白印迹和斑点印迹的免疫学方法。

[0069] 在一些实施方案中，可以通过增加培养基中抗叶酸剂(如甲氨蝶呤)的浓度来选择以增加的浓度表达SP-D的转染细胞。

[0070] 一些实施方案包括在灌注生物反应器中培养表达SP-D的细胞。一些此类实施方案可以包括通过连续发酵培养细胞。在灌注模式中，可以连续供应新鲜的培养基，并且可以从生物反应器中取出无细胞的上清液，同时将细胞保留在发酵罐中。可以通过应用不同的技术保留将细胞。例如，可以使用过滤、离心或沉淀。示例性方法可在美国专利第9,359,427号中找到，其通过引用整体并入本文。

[0071] 用于从培养基中分离SP-D的某些方法

[0072] 在一方面，提供了分离人SP-D多肽的方法。一些实施方案包括从培养基中分离所表达的SP-D多肽。在一个实施方案中，通过使用色谱分析进行分离。色谱分析方法的实例包括使用亲和材料的亲和色谱分析法，所述亲和材料诸如蛋白A、蛋白G、抗SP-D抗体、凝集素色谱分析法，针对导入SP-D多肽的某一标签(如HIS标签或myc标签)或抗原的抗体，或通过其它色谱分析法介质，诸如离子交换色谱分析法、疏水相互作用色谱分析法、混合模式色谱分析法或尺寸排阻色谱分析法。

[0073] 在一些实施方案中，从包含表达SP-D细胞的培养基制备细胞上清液。可以将上清液过滤灭菌。在一些实施方案中，可将包含SP-D多肽的细胞上清液施加到柱上，并可将所得洗脱液施加到第二柱上。在一些实施方案中，使用阴离子交换色谱分析法，然后通过亲和色谱分析法分离SP-D多肽。在一些实施方案中，强阴离子交换色谱分析法基质(如Q-琼脂糖凝胶)被用于阴离子交换色谱分析法。在一些实施方案中，凝胶过滤色谱分析法基质(如Superdex 75基质)被用于亲和色谱分析法。在一些实施方案中，将细胞上清液施加到具有平衡和运行缓冲液的Q-琼脂糖凝胶柱上，所述平衡和运行缓冲液包含20mM TRIS、50mM NaCl，pH7.4。可以使用包含20mM Tris、600mM NaCl，pH7.4的洗脱缓冲液从柱中洗脱SP-D。在一些此类实施方案中，Q-琼脂糖凝胶柱洗脱液包含约0.2至约0.8mg/ml的SP-D。

[0074] 一些实施方案包括将包含SP-D的Q-琼脂糖凝胶柱洗脱液的级分施加到第二柱(如Superdex75柱)。在一些实施方案中，用相同体积的含有10mM $CaCl_2$的20mM Tris缓冲液(pH7.4)稀释Q-琼脂糖凝胶柱洗脱液，并将其施加到具有平衡和运行缓冲液的Superdex75柱上，所述平衡和运行缓冲液包含20mM Tris、300mM NaCl、5mM $CaCl_2$，pH7.4。可以使用包含20mM Tris、10mM EDTA、300mM NaCl，pH7.4的洗脱缓冲液从柱中洗脱SP-D。在一些此类实施方案中，洗脱液包含约0.5至约2mg/mL的SP-D。在一些此类实施方案中，洗脱液包含具有大于约90％纯度的SP-D。一些实施方案还包括在储存和分析之前将洗脱液透析到含有

200mM NaCl、1mM EDTA,pH7.0的5mM组氨酸缓冲液中。

[0075] SP-D的翻译后修饰

[0076] 一个实施方案包括具有特定翻译后修饰模式的人SP-D多肽。一些实施方案包括含有糖基化的(特别是N-糖基化的)人SP-D多肽的组合物。在一些实施方案中,糖基化的人SP-D多肽在对应于SEQ ID NO:4或9的Asn90的天冬酰胺处携带碳水化合物结构。在N-糖基化位点的碳水化合物结构可以包含两个N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)残基和三个甘露糖残基的核心结构,其中第一个GlcNAc连接到多肽骨架,第二个GlcNAc连接到第一个GlcNAc,第一个甘露糖连接到第二个GlcNAc,并且第二个和第三个甘露糖各自连接到第一个甘露糖。其它的单糖单元可以连接到该核心结构上。在一些实施方案中,组合物中SP-D的N-糖基化位点处的碳水化合物结构的至少60%,特别是至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或特别是至少90%是复合型碳水化合物结构。复合型碳水化合物结构包含与第二或第三甘露糖残基连接的至少一个其它的GlcNAc残基,但不包含任何其它的甘露糖残基。

[0077] 在一些实施方案中,组合物中的人SP-D多肽在N-糖基化位点处具有糖基化模式,其包含以下特征中的一个或多个:

[0078] (i)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少70%的携带核心岩藻糖的碳水化合物结构的相对量;和/或

[0079] (ii)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少10%的携带至少一个唾液酸残基的碳水化合物结构的相对量;和/或

[0080] (iii)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构总量的至少50%的至少双触角碳水化合物结构的相对量。

[0081] 在一些实施方案中,组合物中携带核心岩藻糖的碳水化合物结构的相对量为与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少75%或至少80%。核心岩藻糖残基与核心结构的第一个GlcNAc残基连接。根据本发明的“碳水化合物结构的相对量”是指组合物中与SP-D连接的碳水化合物结构的特定百分比或百分比范围。具体地,组合物中碳水化合物结构的相对量是指与SP-D多肽链连接的所有碳水化合物结构的特定百分比或百分比范围。在一些实施方案中,仅考虑与SP-D的N-糖基化位点连接的碳水化合物结构。

[0082] 在一些实施方案中,组合物中携带至少一个唾液酸残基的碳水化合物结构的相对量是与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少15%、至少20%或至少25%。携带至少一个唾液酸残基的碳水化合物结构的相对量可以在10%至80%、15%至75%、或20%至70%的范围内。在一些实施方案中,组合物中人SP-D多肽的糖基化模式包含组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少0.5%(例如至少1%或至少2%)的携带两个唾液酸残基的碳水化合物结构的相对量。携带至少两个唾液酸残基的碳水化合物结构的相对量可以在0.5%至30%、1%至20%、或1.5%至15%的范围内。术语“唾液酸”具体指神经氨酸的任何N-或O-取代的衍生物。它可以指5-N-乙酰基神经氨酸和5-N-羟乙酰基神经氨酸,但优选仅指5-N-乙酰基神经氨酸。唾液酸,具体是5-N-乙酰基神经氨酸优选经由2,3-或2,6-键与碳水化合物链连接。优选地,在本文所述的SP-D的糖基化模式中,存在2,3-以及2,6-偶联的唾液酸。

[0083] 在一些实施方案中,组合物中至少双触角碳水化合物结构的相对量为与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少60%或至少70%。在一些实施方案

中,组合物中人SP-D多肽的糖基化模式包含组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少2%(例如至少3%或至少4%)的至少三触角碳水化合物结构的相对量。触角是与核心结构的末端(即第二个或第三个)甘露糖残基连接的分支或一个或多个单糖单元。在复合型碳水化合物结构中,触角通常包含GlcNAc残基,其还可以携带半乳糖残基和任选地唾液酸残基。双触角复合型碳水化合物结构包含两个触角,即至少一个GlcNAc残基与核心结构的两个末端甘露糖残基中的每一个连接。在三触角复合型碳水化合物结构中,一个末端甘露糖携带有两个触角,并且另一个末端甘露糖携带有一个触角。在四触角复合型碳水化合物结构中,两个末端甘露糖各自携带两个触角。术语"至少双触角"包括双触角、三触角和四触角碳水化合物结构,而术语"至少三触角"包括三触角和四触角碳水化合物结构。

[0084] 糖基化中的A数是糖基化模式中聚糖结构的触角的参考数。通过将特定触角的相对量与其触角的数量相乘,并将所获得的每个触角的数量相加来计算A数。具体地,单触角聚糖的相对量乘以1,双触角聚糖的相对量乘以2,三触角聚糖的相对量乘以3,以及四触角聚糖的相对量乘以4。这些数字之和产生A数。在一些实施方案中,组合物中的人SP-D多肽在A数为至少185(例如至少190)的N-糖基化位点处具有糖基化模式。

[0085] 在一些实施方案中,组合物中的人SP-D多肽在N-糖基化位点具有糖基化模式,其包含以下特征中的一个或多个:

[0086] (i)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少2%(例如至少5%或至少8%)的携带等分N-乙酰葡糖胺(双GlcNAc)的碳水化合物结构的相对量;和/或

[0087] (ii)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少40%(例如至少45%或至少50%)的携带至少一个半乳糖残基的碳水化合物结构的相对量;和/或

[0088] (iii)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少15%(例如至少20%或至少25%)的携带至少两个半乳糖残基的碳水化合物结构的相对量;和/或

[0089] (iv)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的30%或更少(例如20%或更少、或15%或更少)的携带N-乙酰半乳糖残基的碳水化合物结构的相对量;和/或

[0090] (v)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的碳水化合物结构的总量的30%或更少(例如25%或更少、或20%或更少)的杂合型碳水化合物结构的相对量;和/或

[0091] (vi)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的碳水化合物结构总量的25%或更少(例如20%或更少、或15%或更少)的高甘露糖型碳水化合物结构的相对量。

[0092] 等分的N-乙酰葡糖胺或双GlcNAc残基是与碳水化合物结构的核心结构的中心(即第一个)甘露糖残基连接的GlcNAc残基。在一些实施方案中,组合物中携带双GlcNAc的碳水化合物结构的相对量为与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的2%至50%(例如5%至40%、或8%至35%)的范围内。"高甘露糖型碳水化合物结构"仅包含与核心结构的末端甘露糖连接的甘露糖残基。"杂合型碳水化合物结构"包含与核心结构的一个末端甘露糖连接的甘露糖残基和与核心结构的另一个末端甘露糖连接的复合型碳水化

合物结构的所述的触角。

[0093] 在一些实施方案中，具有在SP-D的N-糖基化位点处连接的复合型碳水化合物的SP-D多肽群体可以具有包含以下特征中的一个或多个的糖基化模式：

[0094] (i)至少20％的复合型碳水化合物包括等分的N-乙酰葡糖胺；

[0095] (ii)至少25％的复合型碳水化合物包括至少一个唾液酸残基；

[0096] (iii)至少85％的复合型碳水化合物包括双触角碳水化合物结构；

[0097] (iv)至少0.5％的复合型碳水化合物包括至少一个GalNAc；

[0098] (v)少于2％的复合型碳水化合物包括3个半乳糖；和

[0099] (vi)少于2％的复合型碳水化合物包括三触角碳水化合物结构。

[0100] 在一些实施方案中，具有在SP-D的N-糖基化位点处连接的复合型碳水化合物的SP-D多肽群体可以具有包括任何以下特征的糖基化模式。在一些实施方案中，与群体SP-D的N-糖基化位点连接的至少15％、18％、19％、20％、25％、30％、35％、38％、40％、45％、或在任何前述百分比之间的范围内的百分比的碳水化合物结构的复合型碳水化合物包括等分N-乙酰葡糖胺。在一些实施方案中，与群体的SP-D的N-糖基化位点连接的至少75％、80％、82％、85％、90％、95％、或在任何前述百分比之间的范围内的百分比的碳水化合物结构的复合型碳水化合物包括双触角碳水化合物结构。在一些实施方案中，与群体SP-D的N-糖基化位点连接的至少1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、15％、或在任何前述百分比之间的范围内的百分比的碳水化合物结构的复合型碳水化合物包括至少一个GalNAc。在一些实施方案中，与群体SP-D的N-糖基化位点连接的少于15％、10％、5％、4％、3％、2％、1％、或在任何前述百分比之间的范围内的百分比的碳水化合物结构的复合型碳水化合物包括3个半乳糖残基。在一些实施方案中，与群体的SP-D的N-糖基化位点连接的少于15％、13％、10％、5％、4％、3％、2％、1％、或在任何前述百分比之间的范围内的百分比的碳水化合物结构的复合型碳水化合物包括三触角碳水化合物结构。

[0101] 在一些实施方案中，组合物中的人SP-D多肽在N-糖基化位点处具有包含以下特征的糖基化模式：

[0102] (i)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少10％的携带等分GlcNAc的碳水化合物结构的相对量；

[0103] (ii)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的碳水化合物结构的总量的10％或更少的高甘露糖型碳水化合物结构的相对量；和

[0104] (iii)携带α2,6-偶联的唾液酸残基的复合型碳水化合物结构的可检测量。

[0105] 在其它的实施方案中，组合物中的人SP-D多肽在N-糖基化位点处具有包含以下特征的糖基化模式：

[0106] (i)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少85％的携带核心岩藻糖的碳水化合物结构的相对量；

[0107] (ii)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的复合型碳水化合物结构的总量的至少20％的携带等分GlcNAc的碳水化合物结构的相对量；

[0108] (iii)组合物中与SP-D的N-糖基化位点连接的碳水化合物结构的总量的10％或更少的高甘露糖型碳水化合物结构的相对量；和

[0109] (iv)携带α2,6-偶联的唾液酸残基的复合型碳水化合物结构的可检测量。

[0110] SP-D的寡聚体种类的鉴定

[0111] 在一方面，提供了鉴定人SP-D多肽的寡聚体种类的方法。一些实施方案包括鉴定SP-D的寡聚体种类(如三聚体、十二聚体和含有多于4个三聚体的寡聚体结构)的方法。此类方法可用于鉴定用于制备具有一定量的某种寡聚体形式(如主要是十二聚体形式)的SP-D制剂的条件和成分。在一些实施方案中，用于鉴定人SP-D多肽的寡聚体种类的方法可包括对SP-D样品进行具有多角度光散射(AF4-MALS)分析的不对称流场-流动分级。在一些实施方案中，方法可包括进行尺寸排阻色谱分析HPLC(SEC HPLC)以鉴定人SP-D多肽的寡聚体种类。SEC HPLC的示例性条件包括:UHPLC:Dionex UltiMate 3000;柱:TSKgel G6000PWXL，相羟基化甲基丙烯酸酯，L×I.D.30cm×7.8mm，13μm的粒度(#0008024,Tosoh);柱烘箱温度:30℃;采样器温度:4℃;压力上限:31巴;UV检测:280nm;洗脱液:TBS、10mM EDTA，pH7.4(来自10×TBS Roti-储液#1060.1,Carl Roth,EDTA#8040.2,Carl Roth);流量:0.25mL/min;样品注射:20μL或30μL固定体积;积分极限:HOO为25.0-30.0min，十二聚体为30.0-34.5min,LOO为34.5-44.0min。

[0112] 在一些实施方案中，鉴定SP-D的寡聚体种类的方法可以包括对SP-D样品进行原子力显微镜(AFM)，鉴定和/或定量AFM图像中SP-D的寡聚体种类。在一些此类实施方案中，方法可以包括通过尺寸分辨SP-D的寡聚体种类的混合物。一些此类方法包括使SP-D的样品与阴离子去污剂(如十二烷基硫酸钠(SDS))接触;使所述样品与交联试剂(如1％戊二醛(GA))接触;并且通过尺寸分辨SP-D的种类，如通过进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。在一些实施方案中，在使样品与交联试剂接触之前，使SP-D的样品与阴离子去污剂接触。在其它实施方案中，在使样品与阴离子去污剂接触之前，使SP-D的样品与交联试剂接触。在一些实施方案中，样品与约1％GA的溶液接触。在一些实施方案中，使样品与交联试剂接触约1分钟至约30分钟的时间。在一些实施方案中，PAGE存在十二烷基硫酸钠(PAGE-SDS)。在其它实施方案中，PAGE是天然PAGE。在一些实施方案中，PAGE包含梯度凝胶。在一些实施方案中，梯度凝胶是4-15％聚丙烯酰胺梯度三甘氨酸凝胶。在一些实施方案中，在不存在还原剂的情况下进行PAGE。在一些实施方案中，还原剂包括β-巯基乙醇。一些实施方案还包括鉴定SP-D的种类，如进行蛋白质印迹。

[0113] 包含SP-D的某些组合物

[0114] 一些实施方案包括含有具有一定分布的SP-D的寡聚体形式的rhSP-D多肽群体的溶液。在一些实施方案中，溶液可包括SP-D的寡聚体形式，其中大于约30％、40％、50％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、70％、或前述数值之间的任何范围的寡聚体形式包括SP-D的十二聚体。在一些实施方案中，可以通过本文所提供的方法(如具有多角度光散射(AF4-MALS)分析的不对称流场-流动分级)测量SP-D的寡聚体形式的分布。在一些实施方案中，通过本文所提供的方法制备rhSP-D多肽的溶液。在一些实施方案中，产生如本文所述的人SP-D多肽组合物的方法产生包含如本文所述的rhSP-D多肽群体的溶液。在一些实施方案中，分离如本文所述的人SP-D多肽的方法产生包含如本文所述的rhSP-D多肽群体的溶液。在产生如本文所述的人SP-D多肽组合物的方法的一些实施方案中，所表达的SP-D多肽主要是十二聚体形式。在分离如本文所述的人SP-D多肽的方法的一些实施方案中，所分离的SP-D多肽主要是十二聚体形式。在这一方面，“主要地”具体可以指组合物中所有SP-D多肽的至少30％的相对量，如组合物中所有SP-D多肽的至少40％、至少45％、至少50％或至少55％的

相对量。在一些实施方案中，“主要地”是指组合物中所有SP-D多肽多于50％的相对量。

实施例

[0115] 实施例1-SP-D表达载体的构建

[0116] 开发了两种表达载体用于在人哺乳动物细胞中表达人SP-D。一种载体包括野生型人SP-D前导序列/信号序列；另一种载体包括人T细胞受体(TCR)前导序列/信号序列。选择TCR前导序列作为表达载体之一，因为蛋白质将在人骨髓性白血病细胞中表达，预期人骨髓性白血病细胞将以高效率分泌具有TCR前导序列的蛋白质。

[0117] 编码人SP-D多肽并包括野生型人SP-D前导序列/信号序列或人T-细胞受体(TCR)前导序列/信号序列的多核苷酸由GENEART(ThermoFisher Scientific)合成。为了克隆的目的，每个多核苷酸包括Xba I(5’端)和Hind III(3’端)限制性位点，以及Kozak共有序列。通过Hind III/Xba I限制从GENEART(ThermoFisher Scientific)递送载体切割每个多核苷酸，并连接到克隆载体pHBG1Ddhfr(Glycotope GmbH，德国)中，以获得表达载体：pHBG1Ddhfr_WT_SP-D(7228bp)和pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D(7231bp)。参见图2A和图2B。图2C中显示了另一个实例表达载体。对表达载体进行测序，并进行限制性作图以确认正确的序列。表1列出了某些序列。

[0118] 表1

[0119]

SEQ ID NO.	序列
SEQ ID NO:01 编码具有内源性 SP-D 前导序列的 SP-D 多肽、kozak 序列(带下划线的)和 Xba I(5'端)和 Hind III(3'端)限制位点的多核苷酸。	aagcttgccaccatgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggctatctggaagccgagatgaagacctacagccaccggaccatgcccagcgcctgtaccctcgtgatgtgcagcagcgtggaaagcggcctgcctggcagagatggcagggatggaagagaggggccccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgcctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggccctaagggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagccaggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcagggaagtgccggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcgtgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccaggcgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagctctccagggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactgttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccgaggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccgaaaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgaccgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacagcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatcttcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaagggtctaga
SEQ ID NO:02 编码具有内源性 SP-D 前导序列的 SP-D 多肽的多核苷酸。	gccaccatgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggctatctggaagccgagatgaagacctacagccaccggaccatgcccagcgcctgtaccctcgtgatgtgcagcagcgtggaaagcggcctgcctggcagagatggcagggatggaagagaggggccccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgcctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggccctaagggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagccaggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcagggaagtgccggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcgtgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccaggcgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagctctccaggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactgttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccgaggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccgaaaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgaccgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacagcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatcttcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaaggg

[0120]

SEQ ID NO.	序列
SEQ ID NO:03 编码 SEQ ID NO：01 中的内源性前导序列的多核苷酸。	atgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggctatctggaa
SEQ ID NO:04 由 SEQ ID NO：01 编码的 SP-D 多肽，其包括前导序列(带下划线的)和位于以下的多态性(带下划线的)： Met11/31、 Thr160/180、 Ser270/290、 Ala286/306。	MLLFLLSALVLLTQPLLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLV MCSSVESGLPGRDGRDGREGPRGEKGDPGLPGAAGQAG MPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGPPGVPG PAGREGPLGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQG SAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAAGSAGAMGPQ GSPGARGPPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQV EALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGF VKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAAENAALQQLVVAKNE AAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGS EDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF
SEQ ID NO:05 SEQ ID NO:04 中的前导序列。	MLLFLLSALVLLTQPLLGYLE
SEQ ID NO:06 编码具有 TCR 前导序列的 SP-D 多肽、kozak 序列(带下划线的)和 Xba I(5'端)和 Hind III(3'端)限制位点的多核苷酸。	aagcttgccaccatggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaa ttcagcatggccgccgagatgaagacctacagccaccggacaatgcccagcgcctgcacc ctcgtgatgtgcagctctgtggaaagcggcctgcccggcagagatggcagggatggaaga gagggacccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctg gaatgcctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagc ctggccctaaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggac ctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagcca ggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcaggga agtgccggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaa gaggcgtgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggat ctccaggcgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataag ggcgctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagc tctccagggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactg ttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagccct tcaccgaggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgcc gccgaaaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagc atgaccgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtac agcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatct tcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagt tctgaagggtctaga
SEQ ID NO:07	gccaccatggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaattcagc

[0121]

SEQ ID NO.	序列
编码具有 TCR 前导序列的 SP-D 多肽的多核苷酸。	atggccgccgagatgaagacctacagccaccggacaatgcccagcgcctgcaccctcgtg atgtgcagctctgtggaaagcggcctgcccggcagagatggcagggatggaagagaggg acccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgc ctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggcc ctaaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgctgg aagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagccaggacca aagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcagggaagtgcc ggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcg tgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccagg cgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgcta agggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagctctccag ggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactgttcccca acggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccg aggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccga aaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgacc gacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacagcaat tgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatcttcacca acggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaa ggg
SEQ ID NO:08 编码 SEQ ID NO：06 中的前导序列的多核苷酸。	atggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaattcagcatggcc
SEQ ID NO:09 由 SEQ ID NO：06 编码的 SP-D 多肽，其包括 TCR 前导序列(带下划线的)和位于以下的多态性(带下划线的)： Met11/31、 Thr160/180、 Ser270/290、 Ala286/306。	MACPGFLWALVISTCLEFSMAAEMKTYSHRTMPSACTLV MCSSVESGLPGRDGRDGREGPRGEKGDPGLPGAAGQAG MPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGPPGVPG PAGREGPLGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQG SAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAAGSAGAMGPQ GSPGARGPPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQV EALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGF VKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAAENAALQQLVVAKNE AAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGS EDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF
SEQ ID NO:10 SEQ ID NO:09 中的前导序列。	MACPGFLWALVISTCLEFSMA

[0122] 实施例2-SP-D在哺乳动物细胞系中的表达

[0123] 在转染之前，用Pvu I线性化表达载体并用苯酚/氯仿和三氯甲烷/氯仿纯化。根据制造商的说明书(AMAXANUCLEOFECTOR TECHNOLOGY;龙沙，科隆，德国)使用NUCLEOFECTION用7-8μg线性化的表达载体转染细胞系。用表达载体转染以下细胞系:NM-H9D8(DSM ACC 2806);NM-H9D8-E6Q12(DSM ACC 2856);和NM-F9(DSM ACC2606)。

[0124] 使用25nM的甲氨蝶呤(MTX)并将浓度增加至50nM的MTX来选择表达SP-D的细胞库。为了获得具有增加的SP-D表达水平的细胞,将MTX的浓度分步从100nM增加至200nM至400nM的MTX。通过根据制造商的说明书的SP-D特异性ELISA(BioVendor GmbH,德国,Cat# RD194059101),和/或使用SP-D特异性抗体(Seven Hills Bioreagents,Cincinnati OH,Cat#WMAB-2D12A88和Cat#WMAB-1A10A9)的斑点印迹分析来测定产生SP-D的细胞的生产率。使用以下方程式计算比生产率(SPR):

[0125] $$SPR = \frac{\text{总蛋白质量}}{\text{积分细胞面积(ICA)}}$$

[0126] $$ICA = \frac{\text{(最终细胞数-初始细胞数)}\times\text{培养天}}{\log_e\text{(最终细胞数/初始细胞数)}}$$

[0127] 通过以下方程式计算倍增时间:

[0128] g=log 2×(培养小时)/log(最终细胞数/初始细胞数)

[0129] 借助于ClonePix(Molecular Devices)技术从细胞库中分离表达SP-D的克隆并评估生产力。进一步对所选择的克隆进行亚克隆以获得最终克隆。获得产生力>100皮克/细胞/天(pcd)的克隆。图3显示了用不同MTX浓度培养的不同的产生SP-D细胞库的比生产率。细胞库包括各自用含有人SP-D前导序列的人SP-D表达载体转染的H9D8-E6Q12细胞、H9D8细胞和F9细胞,和用含有人TCR前导序列的人SP-D表达载体转染的H9D8细胞。

[0130] 实施例3-培养表达SP-D的细胞系

[0131] 细胞在无血清的化学限定的基因治疗培养基(GTM)(GlycotopeGmbH,德国)中培养。参见,例如,美国专利第9,359,427号,其通过引用整体并入用于GTM培养基的描述。用1×GTM开始灌注过程培养,然后修改为2×GTM。通过在T细颈瓶(25cm^2,3至6mL悬浮液体积,TPP,德国)中每2至3天分成1×10^5至3×10^5个细胞/mL的细胞浓度,将细胞维持在指数生长期,并在37℃、98%湿度和8%CO_2(Integra Biosciences IBS,Biosafe升级版,瑞士或Thermo/黑罗伊斯BBD 6220,德国)下培养。使用T细颈瓶(75cm^2,12至30mL的体积;150cm^2,50至150mL)和旋转细颈瓶(100mL至1000mL,Integra Biosciences IBS,Cellspin,瑞士)进行细胞扩增。

[0132] 一般培养参数:用2.0×10^5个细胞/mL接种培养基。通过以0.5V/d的灌注速率(通常是第4-5天)供给1×GTM,并且根据细胞生长和营养需求,增加到每天两个反应器体积的最大灌注速率,从而使连续操作成为可能。当达到1×GTM的最大灌注时,用修改的2×GTM代替供给培养基。通过加入0.5M NaOH或用CO_2鼓泡将培养基保持在pH7.2。将溶解氧设定为40%并且温度设定为37℃。将溶解氧降低至40%以下至例如20%溶解氧也是可能的。在后一种情况下,与在40%溶解氧下培养相比,十二聚体(docdecamer)的含量可以稍微增加。

[0133] 1L灌注生物反应器:在Sartorius Biostat B-DCU 21Quad系统或2L BBI Quad系统中进行实验室1L规模的培养。通过标准电极(分别为Mettler-Torledo InPro 6800和Mettler-Torledo 405-DPAS-SC-K8S,Mettler Torledo,瑞士)测量溶解氧和pH。通过3叶片

分段叶轮以300至400rpm的搅拌速率进行搅动。使用具有60cm PES膜(0.2μm孔径和0.15m^2膜面积,Spectrum,USA)和0.9L/min的流速的ATF2模块进行灌注。在过程控制中:使用台盼蓝排除原理通过Cedex HiRes(Roche,瑞士)测定细胞浓度和存活率。通过YSI2700或YSI2900选择生化分析仪(Yellow Springs Instruments,美国)测量葡萄糖/乳酸盐和谷氨酰胺/谷氨酸。

[0134] 图4显示来自用于克隆H9D8-P1315-2A5的生物反应器运行的培养条件随时间的变化,包括:活细胞浓度(图A);葡萄糖浓度(图B);细胞存活率(图C);乳酸盐浓度(图D)。

[0135] 实施例4-从哺乳动物细胞系中纯化SP-D

[0136] 发现SP-D从表达细胞中分泌。从生物反应器运行或其它培养物中收集来自产生SP-D细胞的细胞上清液,并使用以结合和洗脱模式的Q-琼脂糖凝胶色谱分析运行(Q-琼脂糖凝胶FF;GE Healthcare),随后以结合和洗脱模式进行的Superdex75色谱分析运行(Superdex75;GE Healthcare)纯化。在来自GE的FPLC系统上进行色谱分析Äkta Explorer,Äkta Avant,Äkta Pure)。

[0137] Q-琼脂糖凝胶色谱分析:将上清液无菌过滤并用相同体积的20mM TRIS、10mM EDTA,pH7.4的溶液稀释,并加载到Q-琼脂糖凝胶柱上,以及用600mM NaCl逐步洗脱来洗脱。用表2中所示的设置进行色谱分析。

[0138] 表2

[0139]

参数	设置
平衡和运行缓冲液	20mM TRIS、50mM NaCl,pH 7.4
洗脱缓冲液	20mM Tris、600mM NaCl,pH 7.4
柱体积/长度	240mL/11.5cm 24000mL
加载量/mL柱体积	100mL
总加载量	24000ml(1:2稀释)
流速(ml/min)	55mL/min
动态流速(cm/min)	2.6cm/min
接触时间	4.4min
洗脱液中SP-D的浓度	0.2-2mg/ml

[0140] Superdex75色谱分析:用相同体积的含有10mM $CaCl_2$的20mM Tris缓冲液(pH7.4)稀释洗脱液,并加载到Superdex75柱上,以及用10mM EDTA逐步洗脱来洗脱。用表3中所示的设置进行色谱分析。

[0141] 表3

[0142]

参数	设置
平衡和运行缓冲液	20 mM Tris、300 mM NaCl、5 mM $CaCl_2$，pH 7.4
洗脱缓冲液	20 mM Tris、10 mM EDTA、300 mM NaCl，pH 7.4
总加载量	2228 mL
柱体积/长度	106 mL/21.5 cm
加载量/mL 柱体积	21 mL (1:2 稀释)
流速(ml/min)	5 mL/min
动态流速(cm/min)	1.01 cm/min

[0143]

参数	设置
接触时间	21.2 min
洗脱浓度	0.5-3 mg/mL

[0144] 在考马斯蓝染色后通过非还原SDS-PAGE测定，Superdex洗脱液含有纯度>90％的SP-D(图5)。在图5中，大于150kD的条带包括来自SP-D的高级寡聚体。在储存和分析之前，将来自Superdex柱的洗脱液在4℃下对含有200mM NaCl和1mM EDTA的5mM组氨酸pH7.0缓冲液进行透析。

[0145] 实施例5-在细菌聚集测定中SP-D的活性

[0146] 在细菌聚集测定中测试从克隆H9D8-P1315-2A5纯化的SP-D的活性。通过基本上类似于以下方法的方法进行细菌聚集测定。将大肠杆菌(E.coli，ATCC:Y1088)划线到细菌琼脂板上并在37℃下孵育过夜。选择单一菌落并用于接种过夜培养物，在37℃下振荡过夜。将1mL细菌培养物用移液管移至四个1.5mL离心管中并在4,000rpm下离心5分钟。弃去上清液，并将沉淀重悬于1mL缓冲液中(150mM HEPES、20mM NaCl，pH7.4)。将管以4,000rpm离心5分钟，并将沉淀重悬于7mL缓冲液中。在光谱仪中在700nm处测量细菌悬浮液的吸光度。调节细菌悬浮液以获得在1.0000至1.1000范围内的吸光度。向悬浮液中加入1M $CaCl_2$以获得5mM $CaCl_2$的最终浓度。在以下浓度下创建安慰剂缓冲液中的rhSP-D稀释液(每种稀释液的总体积为15μl)：5、1、0.5、0.25、0.1、0μg/ml，并添加到各自含有20μL HEPES-NaCl缓冲液的比色皿中。然后将600μL细菌悬浮液添加到比色皿中，并且每2.5分钟测量每个比色皿在700nm的吸光度，总共120分钟。

[0147] 在聚集测定中，活性SP-D聚集细菌细胞并降低吸光度/增加通过细菌悬浮液的透射。图6显示从克隆H9D8-P1315-2A5纯化的rhSP-D在细菌聚集测定中具有活性。将实验再重复两次，得到类似的结果。

[0148] 还分析了在如上述实施例2所述产生的H9D8的其它克隆中重组表达的人SP-D的活性。来自所有测试的最终选择的克隆的SP-D具有类似的高活性。一个示例性的分离克隆是NM-H9D8(8B11)，其也用于随后的分析。NM-H9D8(8B11)已由Airway Therapeutics LLC，辛辛那提，OH，美国于2018年9月4日以“AT100-rhSP-D-H9D8-P20011-8B11”保藏在布伦瑞克(德国)的“DSMZ-德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)”，可以容易地从中鉴定出所保藏的克隆，并且可以根据登录号容易地获得。

[0149] 实施例6-在TLR4抑制测定中的SP-D的活性

[0150] SP-D的寡聚体形式通过防止LPS结合/激活Toll样受体4(TLR4)来抑制脂多糖(LPS)诱导的炎性细胞应答。参见例如Yamazoe M.等人,(2008)J.Biological Chem.283:35878-35888,其通过引用整体并入。

[0151] 测试从克隆H9D8-P1315-2A5纯化的rhSP-D抑制LPS激活TLR4通路的活性。将HEK-Blue™ hTLR4细胞(Invivogen,圣地亚哥,CA,美国)在384孔板中以～20000个细胞/孔的密度铺板,并与各种浓度的SP-D在37℃、5％CO_2下孵育2小时。将EC_{80}浓度的LPS(大肠杆菌(Escherichia coli)026:B6,L5543 Sigma Aldrich)加入到每个孔中,并将细胞在37℃、5％CO_2下再孵育22小时。通过从孔中分离细胞,洗涤悬浮的细胞,将细胞重悬浮在PBS中并通过轻轻用移液管吸去除任何团块来测量TLR4活性。将洗涤的细胞以$20e10^3$个细胞/孔的密度转移到384孔板中,其中含有HEK蓝检测培养基(Invivogen,圣地亚哥,CA,美国),其在含有5mM $CaCl_2$和1％(v/v)BSA的无内毒素水中制备。将细胞于37℃下在5％CO_2中孵育24小时,并且通过使用分光光度计在655nm下测量分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因的活性来确定TLR4的活性。通过用来自idbs(www.idbs.com)的XLfit将数据拟合到四参数逻辑方程式使用非线性回归分析来确定SP-D的IC_{50}值。图7显示,从克隆H9D8-P1315-2A5中纯化的SP-D被确定具有抑制LPS激活TLR4通路的活性,其中IC_{50}为0.00294mg/ml,并证实SP-D处于此类活性的活性寡聚体形式。因为仅IC_{50}值的对数是正态分布的,所以出于对来自一系列实验的数求平均值的目的,使用pIC_{50}值,定义为$-Log_{10}(IC_{50})$。将实验再重复两次,得到2.33±0.10mg/ml(N＝3)的平均pIC_{50}的类似的结果,其相当于0.00468mg/ml的平均IC_{50}。还在TLR-4测定中分析在如上述实施例2中所述产生的H9D8的其它克隆中重组表达的人SP-D的活性。来自所有测试的最终选择的克隆的SP-D具有类似的高活性。一个示例性的分离克隆是NM-H9D8(8B11),其也用于随后的分析。

[0152] 实施例7-来自各种来源的SP-D的稳定性

[0153] 测定来自各种来源的rhSP-D的稳定性。来源包括在H9D8细胞中用野生型SP-D前导多肽表达的rhSP-D(“rhSP-D:WT”),和在H9D8细胞中用TCR前导多肽表达的rhSP-D(“rhSP-D:TCR”)。将在各种缓冲液(缓冲液:1、2、3或4)中的rhSP-D:WT或rhSP-D:TCR的溶液在5℃孵育数周。通过测量rhSP-D寡聚体形式的相对分布来确定rhSP-D:WT或rhSP-D:TCR在各种缓冲液中的稳定性,所述寡聚体形式包括:rhSP-D三聚体/六聚体、十二聚体、高级寡聚体“毛球”和非常高级寡聚体/聚集体。使用与实施例8中所提供的那些方法基本相同的方法,通过不对称流场-流分级(AF4)用多角度光散射(AF4-MALS)分析测定rhSP-D寡聚体形式的相对分布。由一式三份测定确定平均结果,并测定+/-标准偏差。结果总结在表4中。

[0154] 表4

[0155]

SP-D 来源(缓冲液)	在 5℃下的时间(周)	寡聚体形式的相对分布(%)			
		三聚体/六聚体	十二聚体	转变成'毛球'	非常高级的寡聚体
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

[0156]

SP-D 来源(缓冲液)	在 5℃下的时间(周)	寡聚体形式的相对分布(%)			
		三聚体/六聚体	十二聚体	转变成'毛球'	非常高级的寡聚体
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
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

[0157] 表4示出了在含有rhSP-D:WT和rhSP-D:TCR的不同溶液中各种寡聚体形式的相对稳定性的差异。例如,关于SP-D的非常高级的寡聚体形式,rhSP-D:WT的溶液通常具有比相应的rhSP-D:TCR的溶液更低的此类寡聚体的百分比。此外,与rhSP-D:TCR的相应溶液相比,rhSP-D:WT的溶液的非常高级的寡聚体的百分比在至少0周至2周没有显著增加。关于rhSP-D的十二聚体寡聚体形式,此类寡聚体在rhSP-D:WT的溶液中的百分比通常在第0周至第8周是稳定的;相反;在相应的溶液中,rhSP-D:TCR的溶液中此类寡聚体的百分比在第0周至第8周降低。

[0158] rhSP-D:WT和rhSP-D:TCR的溶液之间的这些差异是显著的,因为两种SP-D多肽具有相同的氨基酸序列并且各自由H9D8细胞产生。rhSP-D:WT最初用与野生型人SP-D蛋白的

前导多肽/信号多肽相对应的前导多肽/信号多肽表达，并且rhSP-D:TCR最初用与人TCR蛋白的前导多肽/信号多肽相对应的前导多肽/信号多肽表达。每个前导序列/信号序列在易位后不久或在易位过程中已经从相应的蛋白上切割下来。该发现对于产生和开发用于治疗各种肺病的稳定的人SP-D溶液(特别是具有更具活性的SP-D的十二聚体寡聚体形式的溶液)是特别有利的。

[0159] 实施例8-AF4-MALS分析

[0160] 使用具有多角度光散射(AF4-MALS)分析的不对称流场-流分级来确定溶液中SP-D的不同寡聚体形式的相对分布。AF4-MALS是与场流分级(FFF)相关的分离技术。与FFF不同，AF4-MALS包括单个可渗透壁，从而仅由载液引起交叉流。通过在通道底部上的半渗透性壁不断流出的载液引起交叉流。

[0161] 使用AF4-MALS系统(Eclipse Dual Tec,Wyatt Technology Corp.,圣巴巴拉市，CA)分析样品，然后使用UV(Ultimate 3000可变波长检测器,Dionex Corporation,森尼维耳市,CA)和MALS分析(Dawn Heleos II检测器,Wyatt Technology Corp.,圣巴巴拉市，CA)。使用Dionex Ultimate 3000HPLC系统(Dionex Corporation,森尼维耳市,CA)注射样品并将流动相递送至AF4系统。AF4配置使用具有350μm厚垫片的短通道(Wyatt Technology Corp.,圣巴巴拉市,CA)。使用变色龙(Chromeleon)(Dionex Corporation,森尼维耳市,CA)和Astra(Wyatt Technology Corp.,圣巴巴拉市,CA)软件进行数据分析和计算。样品包括从用编码rhSP-D和野生型SP-D前导多肽(pHBG1Ddhfr_WT_SP-D)的表达载体转染的H9D8细胞或F9细胞中纯化的rhSP-D;从用编码rhSP-D和野生型TCR前导多肽(pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D)的表达载体转染H9D8细胞中纯化的rhSP-D。使用的样品列于表5中。表6中显示了具有rhSP-D的AF4-MALS系统的参数。

[0162] 表5

[0163]

批次	亲本细胞系	表达构建体	体积(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

[0164] 表6

[0165]

步骤	开始时间 (min)	结束时间 (min)	持续时间 (min)	模式	X 流开始 (ml/min)	X 流结束 (ml/min)
1	0	1	1	聚焦		
2	1	2	1	聚焦+ 注入		
3	2	3.5	1.5	聚焦		
4	3.5	3.7	0.2	洗脱	0.5	3
5	3.7	6.7	3	洗脱	3	3
6	6.7	16.7	10	洗脱	3	0.18
7	16.7	26.7	10	洗脱	0.18	0.18
8	26.7	41.7	15	洗脱	0.18	0
9	41.7	51.7	10	洗脱	0	0
10	51.7	56.7	5	洗脱 + 注入	0	0
11	56.7	57	0.3	洗脱	0	0
检测器流: 0.5 ml/min 注入流: 0.2 ml/min 聚焦流: 0.5 ml/min 注入量 5 µg 流动相: 20 mM Tris、200 mM NaCl，pH 7.4 通道: 短(145 mm) 垫片: 350 µM 膜: 10 kD PES						

[0166] 在洗脱期间使用UV检测器和多角度光散射检测器收集使用AF4-MALS的数据，并分析以确定在某个时间的SP-D的绝对摩尔质量和大小。大小与质量的比率表示SP-D的形状。从大小与质量的比率，确定在洗脱的早期(0-34分钟)，SP-D分子具有线性形状或棒状形状。对于棒模型计算，软件假定棒形颗粒的厚度与其长度相比不显著(0.0nm)。如果厚度是显著的，则使用其厚度或以nm计的近似厚度。从原子力显微镜(AFM)数据估算棒厚度，并且确定棒长度与136±8.1nm的AFM测量一致(R.Arroyo等人，J Mol Biol(2018)430:1495-1509)。SP-D的洗脱后期(34-45分钟)表明观察到更紧密的结构。利用二阶德拜模型来分析洗脱的这些阶段。二阶德拜模型在较宽的摩尔质量范围(包括非常大的(大于～10e6道尔顿或～50nm RMS半径))内提供了更好的结果。对于SP-D的十二聚体寡聚体形式，测定分子量为520.09+/-4.61kDa(N＝72次测定)。

[0167] 基于根据棒模型的质量计算，洗脱谱中的第一峰(峰1)含有SP-D三聚体和六聚体。洗脱谱中的第二个峰(峰2)含有SP-D十二聚体。洗脱谱中的第三个峰(峰3)含有SP-D十二聚体至SP-D‘毛球’的中间种类，其基于通过棒模型测定的中间MW。洗脱谱中的第四个峰(峰4)含有具有约70nm的恒定RMS半径的非均相质量的SP-D寡聚体，这与通过AFM测量对毛球种类所观察到的一致。在洗脱谱中超过36分钟，RMS半径增加，表明聚集体种类。

[0168] 实施例9-N-聚糖谱分析

[0169] 比较在NM-H9D8细胞产生的SP-D(rhSP-D)和从人羊水获得的SP-D(hSP-D)中的N-糖基化模式。纯化的SP-D蛋白被变性和还原。通过N-聚糖酶F的作用释放N-聚糖。在还原端用荧光团标记游离的N-聚糖,随后进行利用固相提取的纯化步骤。将纯化的荧光标记的N-聚糖的混合物应用于亲水相互作用超高效色谱分析,其中荧光检测(HILIC-UPLC-FLD)与电喷雾电离四极飞行时间串联质谱(ESI-Q-TOF MS/MS)偶联。通过荧光峰面积对聚糖进行定量,并通过分子量结合片段分析进行鉴定。

[0170] 荧光示踪显示所有N-聚糖的恒定保留时间范围。通过MS/MS实验进行可靠的结构分配,因为在所有样品中信号一致。表7显示了比较的SP-D蛋白的糖基化模式。

[0171] 表7

[0172]

N-聚糖	碳水化合物结构(包括 N-聚糖)的百分比	
	hSP-D	rhSP-D
岩藻糖基化聚糖	91	99
具有等分 N-乙酰氨基葡糖的聚糖	18	38
具有至少一个唾液酸的聚糖	52	58
具有 1 个唾液酸的聚糖	45	50
具有 2 个唾液酸的聚糖	7	8
具有 3 个唾液酸的聚糖	0	0
具有至少一个半乳糖的聚糖	93	92
具有 1 个半乳糖的聚糖	19	22
具有 2 个半乳糖的聚糖	64	66
具有 3 个半乳糖的聚糖	10	4
单触角聚糖	1	1
双触角聚糖	82	90
三触角聚糖	13	5
四触角聚糖	1	1
具有至少一个 GalNAc 的聚糖	1	11
杂合型聚糖	2	2
高甘露糖型聚糖	2	2

[0173] 从不同触角的量,可以使用公式1×百分比单触角聚糖+2×百分比双触角聚糖+3×百分比三触角聚糖+4×百分比四触角聚糖=A数来计算作为总触角的量度的A数。rhSP-D和hSP-D的A-数与A-数为200的rhSP-D和A-数为208的hSP-D非常类似。

[0174] 在一些方面,hSP-D的N-糖基化谱和rhSP-D的N-糖基化谱是类似的。例如,对于hSP-D和rhSP-D两者,包括具有3个唾液酸的聚糖、单触角聚糖、四触角聚糖、杂合型聚糖或

高甘露糖型聚糖的碳水化合物结构的百分比是相同的。然而，在一些方面，hSP-D的N-糖基化谱和rhSP-D的N-糖基化谱是不同的。例如，包括具有等分N-乙酰葡糖胺的聚糖、具有1个唾液酸的聚糖、具有3个半乳糖的聚糖、三触角聚糖或具有至少一个GalNA的聚糖的碳水化合物结构的百分比在hSP-D和SP-D之间不同。

[0175] 在进一步的分析中，比较在NM-H9D8细胞(rhSP-D)的不同克隆中产生的重组人SP-D的糖谱，其包括来自NM-H9D8(8B11)克隆的两个不同纯化批次，在CHO细胞的不同克隆中产生的重组人SP-D(CHO-SP-D)和从人羊水获得的天然SP-D(hSP-D)。如图8所示，rhSP-D的N-糖基化谱和hSP-D的N-糖基化谱是高度可比较的，而CHO-SP-D由于在非人细胞系中的产生而显示出显著的差异。图9进一步证明NM-H9D8衍生的rhSP-D的O-糖基化谱和CHO衍生的CHO-SP-D的O-糖基化谱也显著不同。获自人羊水的SP-D的O-糖基化不能确定，因为该分析需要大量的蛋白质。N-糖基化谱包括与SP-D的多肽链的天冬酰胺残基连接的所有聚糖结构，而O-糖基化谱显示与丝氨酸、苏氨酸、羟基赖氨酸和羟基脯氨酸残基连接的聚糖结构。总之，在NM-H9D8细胞克隆中产生的rhSP-D具有与天然存在的hSP-D的糖基化非常相似的人糖基化模式。

[0176] 此外，分析SP-D的聚糖结构中的唾液酸(N-乙酰基神经氨酸;NANA)连接。NANA通常可以以α2,3或α2,6构象与末端半乳糖残基连接。在人糖基化中，发现α2,3和α2,6连接的NANA的混合物，而仓鼠细胞(如CHO)不产生α2,6连接的NANA。CHO以及NM-H9D8产生的人SP-D被纯化、变性和还原。N-聚糖在与N-聚糖酶F孵育期间被释放。游离的N-聚糖用荧光团(RapiFluor,Waters)标记，然后使用HILIC固相提取进行纯化步骤。对于神经氨酸酶处理，在37℃下用神经氨酸酶S(NEB)消化纯化的N-聚糖1h。神经氨酸酶S特异性地去除α2,3连接的NANA，而不会切割出α2,6连接的NANA。通过重复HILIC固相提取去除酶。将具有荧光检测的I类系统(Waters)用于HILIC-UPLC。在Acquity UPLC BEH聚糖柱(150×2.1mm，1.7u，Waters)上于60℃下以0.5mL/min的流速分离纯化的荧光标记的N-聚糖的混合物。使用100％的乙腈(A)和100mM甲酸铵(pH4.5)作为洗脱液系统，并且在82min内施加22％B至44％B的梯度。荧光波长设置为：λ_{ex} 265nm和λ_{em}425nm。将偶联的Bruker Impact HD ESI-Q-TOF-MS(MS)用于阳离子模式的N-聚糖鉴定。根据分子量并结合片段分析鉴定N-聚糖。

[0177] 分析揭示来自CHO的SP-D显示在20和70min RT之间的非均相N-聚糖谱。在53-70min内，除三个主要峰包括具有零个(S0)、一个(S1)和两个(S2)NANA的双触角N-聚糖外，还检测到具有多达四个NANA的更高级触角结构。在56min RT后，双触角S1和S2结构以及大部分更高级触角结构受到神经氨酸酶S处理的影响，证明存在2,3连接的NANA。总体唾液酸化被强烈降低，表明CHO产生的SP-D中主要存在α2,3连接的NANA(参见图10，图A和图B)。在来自NM-H9D8(8B11)细胞的SP-D中，在神经氨酸酶处理后仅检测到N-糖谱的轻微变化。在RT 50min的单唾液酸化峰不受神经氨酸酶S处理的影响。在RT 54min，仅观察到在来自NM-H9D8的SP-D中包含S2 N-聚糖的一个小峰变化。总唾液酸化仅被神经氨酸酶S轻微降低，表明NM-H9D8(8B11)中产生的SP-D主要包含α2,6连接的NANA和仅少量的α2,3连接的NANA(参见图10，图C和图D)。

[0178] 如本文所用的术语“包含”与“包括”、“含有”或“特征在于”同义，并且是包含性的或开放式的，并且不排除另外的未列举的要素或方法步骤。

[0179] 以上描述公开了本发明的几种方法和材料。本发明易于改变方法和材料，以及改

变制造方法和设备。考虑到本公开或本文所公开的本发明的实践，此类修改对于本领域技术人员将是显而易见的。因此，并不旨在本发明限于本文所公开的具体实施方案，而是它覆盖了落入本发明的真实范围和精神内的所有修改和替代选择。

[0180] 本文引用的所有参考文献(包括但不限于公开的和未公开的申请、专利和参考文献)通过引用整体并入本文中，并由此构成本说明书的一部分。在通过引用并入的出版物和专利或专利申请与说明书中所含有的公开内容矛盾的程度上，本说明书旨在取代和/或优先于任何此类矛盾的材料。

序列表

<110> 简·苏珊·罗森鲍姆(Jan Susan Rosenbaum)
弗雷德里克·加彭·夸斯特(Frederick Gyapon Quast)
马提亚·考珀(Matthias Kaup)
拉尔斯·斯托克尔(Lars Stockl)

<120>用于制备表面活性蛋白D(SP-D)的方法、组合物和细胞

<130> AIRWY.007WO

<150> 62/554825

<151> 2017-09-06

<150> 62/614758

<151> 2018-01-08

<160> 10

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1150

<212> DNA

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 1

aagcttgcca ccatgctgct gtttctgctg agcgccctgg tgctgctgac acagcctctg 60
ggctatctgg aagccgagat gaagacctac agccaccgga ccatgcccag cgcctgtacc 120
ctcgtgatgt gcagcagcgt ggaaagcggc ctgcctggca gagatggcag ggatggaaga 180
gagggcccca gaggcgagaa gggcgatcct ggactgcctg gcgctgcagg gcaggctgga 240
atgcctggac aggctggacc tgtgggcccc aagggcgata atggctctgt gggagagcct 300
ggccctaagg gggatacagg cccttctgga cctcctggac cacctggcgt gccaggacct 360
gctggaagag aaggacctct gggcaagcag ggcaacatcg gccctcaggg aaagccagga 420
ccaaagggcg aggccggacc caaaggcgaa gtgggagcac ctggcatgca gggaagtgcc 480
ggcgctagag gactggctgg cccaaaaggc gaaaggggag tgcctggcga aagaggcgtg 540
cccggaaata ctggcgccgc tggatctgct ggcgccatgg gacctcaggg atctccaggc 600
gcaagaggcc ctccaggcct gaaaggcgac aaaggcatcc ccggcgataa gggcgctaag 660
ggcgaatccg gcctgccaga tgtggccagc ctgagacagc aggtggaagc tctccagggc 720
caggtgcagc atctccaggc tgccttcagc cagtacaaga aggtggaact gttccccaac 780
ggccagagcg tgggcgagaa gatctttaag accgccggct tcgtgaagcc cttcaccgag 840
gctcagctgc tgtgtaccca ggctggcgga cagctggcct ctcctagatc tgccgccgaa 900
aatgccgctc tccagcagct ggtggtggcc aagaatgagg ccgccttcct gagcatgacc 960
gacagcaaga ccgagggcaa gttcacctac cccaccggcg agtccctggt gtacagcaat 1020
tgggcccctg gcgagcccaa cgatgatggc ggctctgagg actgcgtgga aatcttcacc 1080
aacggcaagt ggaacgaccg ggcctgtggc gagaaaagac tggtcgtgtg cgagttctga 1140
agggtctaga 1150

<210> 2
<211> 1138
<212> DNA
<213> 智人(homo sapiens)
<400> 2
gccaccatgc tgctgtttct gctgagcgcc ctggtgctgc tgacacagcc tctgggctat 60
ctggaagccg agatgaagac ctacagccac cggaccatgc ccagcgcctg taccctcgtg 120
atgtgcagca gcgtggaaag cggcctgcct ggcagagatg gcagggatgg aagagagggc 180
cccagaggcg agaagggcga tcctggactg cctggcgctg cagggcaggc tggaatgcct 240
ggacaggctg gacctgtggg ccccaagggc gataatggct ctgtgggaga gcctggccct 300
aaggggata caggcccttc tggacctcct ggaccacctg gcgtgccagg acctgctgga 360
agagaaggac ctctgggcaa gcagggcaac atcggccctc agggaaagcc aggaccaaag 420
ggcgaggccg gacccaaagg cgaagtggga gcacctggca tgcagggaag tgccggcgct 480
agaggactgg ctggcccaaa aggcgaaagg ggagtgcctg gcgaaagagg cgtgcccgga 540
aatactggcg ccgctggatc tgctggcgcc atgggacctc agggatctcc aggcgcaaga 600
ggccctccag gcctgaaagg cgacaaaggc atccccggcg ataagggcgc taagggcgaa 660
tccggcctgc cagatgtggc cagcctgaga cagcaggtgg aagctctcca gggccaggtg 720
cagcatctcc aggctgcctt cagccagtac aagaaggtgg aactgttccc caacggccag 780
agcgtgggcg agaagatctt taagaccgcc ggcttcgtga agcccttcac cgaggctcag 840
ctgctgtgta cccaggctgg cggacagctg gcctctccta gatctgccgc cgaaaatgcc 900
gctctccagc agctggtggt ggccaagaat gaggccgcct tcctgagcat gaccgacagc 960
aagaccgagg gcaagttcac ctaccccacc ggcgagtccc tggtgtacag caattgggcc 1020
cctggcgagc ccaacgatga tggcggctct gaggactgcg tggaaatctt caccaacggc 1080
aagtggaacg accgggcctg tggcgagaaa agactggtcg tgtgcgagtt ctgaaggg 1138
<210> 3
<211> 60
<212> DNA
<213> 智人(homo sapiens)
<400> 3
atgctgctgt ttctgctgag cgccctggtg ctgctgacac agcctctggg ctatctggaa 60
<210> 4
<211> 376
<212> PRT
<213> 智人(homo sapiens)
<400> 4
Met Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Leu Val Leu Leu Thr Gln Pro Leu
1 5 10 15
Leu Gly Tyr Leu Glu Ala Glu Met Lys Thr Tyr Ser His Arg Thr Met
20 25 30

Pro Ser Ala Cys Thr Leu Val Met Cys Ser Ser Val Glu Ser Gly Leu
35 40 45
Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Glu Gly Pro Arg Gly Glu Lys
50 55 60
Gly Asp Pro Gly Leu Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ala Gly Met Pro Gly
65 70 75 80
Gln Ala Gly Pro Val Gly Pro Lys Gly Asp Asn Gly Ser Val Gly Glu
85 90 95
Pro Gly Pro Lys Gly Asp Thr Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro
100 105 110
Gly Val Pro Gly Pro Ala Gly Arg Glu Gly Pro Leu Gly Lys Gln Gly
115 120 125
Asn Ile Gly Pro Gln Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ala Gly Pro
130 135 140
Lys Gly Glu Val Gly Ala Pro Gly Met Gln Gly Ser Ala Gly Ala Arg
145 150 155 160
Gly Leu Ala Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Glu Arg Gly
165 170 175
Val Pro Gly Asn Thr Gly Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Met Gly Pro
180 185 190
Gln Gly Ser Pro Gly Ala Arg Gly Pro Pro Gly Leu Lys Gly Asp Lys
195 200 205
Gly Ile Pro Gly Asp Lys Gly Ala Lys Gly Glu Ser Gly Leu Pro Asp
210 215 220
Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln Val Gln
225 230 235 240
His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val Glu Leu Phe Pro
245 250 255
Asn Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr Ala Gly Phe Val
260 265 270
Lys Pro Phe Thr Glu Ala Gln Leu Leu Cys Thr Gln Ala Gly Gly Gln
275 280 285
Leu Ala Ser Pro Arg Ser Ala Ala Glu Asn Ala Ala Leu Gln Gln Leu
290 295 300
Val Val Ala Lys Asn Glu Ala Ala Phe Leu Ser Met Thr Asp Ser Lys
305 310 315 320
Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser Leu Val Tyr Ser
325 330 335
Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly Ser Glu Asp Cys

340 345 350

Val Glu Ile Phe Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg Ala Cys Gly Glu

355 360 365

Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe

370 375

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 5

Met Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Leu Val Leu Leu Thr Gln Pro Leu

1 5 10 15

Leu Gly Tyr Leu Glu

20

<210> 6

<211> 1153

<212> DNA

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 6

aagcttgcca ccatggcctg ccccggattt ctgtgggccc tcgtgatcag cacctgtctg 60
gaattcagca tggccgccga gatgaagacc tacagccacc ggacaatgcc cagcgcctgc 120
accctcgtga tgtgcagctc tgtggaaagc ggcctgcccg gcagagatgg cagggatgga 180
agagagggac ccagaggcga gaagggcgat cctggactgc ctggcgctgc agggcaggct 240
ggaatgcctg gacaggctgg acctgtgggc cccaagggcg ataatggctc tgtgggagag 300
cctggcccta agggggatac aggcccttct ggacctcctg gaccacctgg cgtgccagga 360
cctgctggaa gagaaggacc tctgggcaag cagggcaaca tcggccctca gggaaagcca 420
ggaccaaagg gcgaggccgg acccaaaggc gaagtgggag cacctggcat gcagggaagt 480
gccggcgcta gaggactggc tggcccaaaa ggcgaaaggg gagtgcctgg cgaaagaggc 540
gtgcccggaa atactggcgc cgctggatct gctggcgcca tgggacctca gggatctcca 600
ggcgcaagag gccctccagg cctgaaaggc gacaaaggca tccccggcga taagggcgct 660
aagggcgaat ccggcctgcc agatgtggcc agcctgagac agcaggtgga agctctccag 720
ggccaggtgc agcatctcca ggctgccttc agccagtaca agaaggtgga actgttcccc 780
aacggccaga gcgtgggcga gaagatcttt aagaccgccg gcttcgtgaa gcccttcacc 840
gaggctcagc tgctgtgtac ccaggctggc ggacagctgg cctctcctag atctgccgcc 900
gaaaatgccg ctctccagca gctggtggtg gccaagaatg aggccgcctt cctgagcatg 960
accgacagca agaccgaggg caagttcacc taccccaccg gcgagtccct ggtgtacagc 1020
aattgggccc ctggcgagcc caacgatgat ggcggctctg aggactgcgt ggaaatcttc 1080
accaacggca agtggaacga ccgggcctgt ggcgagaaaa gactggtcgt gtgcgagttc 1140
tgaagggtct aga 1153

<210> 7
<211> 1141
<212> DNA
<213> 智人(homo sapiens)
<400> 7
gccaccatgg cctgccccgg atttctgtgg gccctcgtga tcagcacctg tctggaattc 60
agcatggccg ccgagatgaa gacctacagc caccggacaa tgcccagcgc ctgcaccctc 120
gtgatgtgca gctctgtgga aagcggcctg cccggcagag atggcaggga tggaagagag 180
ggacccagag gcgagaaggg cgatcctgga ctgcctggcg ctgcagggca ggctggaatg 240
cctggacagg ctggacctgt gggccccaag ggcgataatg gctctgtggg agagcctggc 300
cctaaggggg atacaggccc ttctggacct cctggaccac ctggcgtgcc aggacctgct 360
ggaagagaag gacctctggg caagcagggc aacatcggcc ctcagggaaa gccaggacca 420
aagggcgagg ccggacccaa aggcgaagtg ggagcacctg gcatgcaggg aagtgccggc 480
gctagaggac tggctggccc aaaaggcgaa aggggagtgc ctggcgaaag aggcgtgccc 540
ggaaatactg gcgccgctgg atctgctggc gccatgggac ctcagggatc tccaggcgca 600
agaggccctc caggcctgaa aggcgacaaa ggcatccccg gcgataaggg cgctaagggc 660
gaatccggcc tgccagatgt ggccagcctg agacagcagg tggaagctct ccagggccag 720
gtgcagcatc tccaggctgc cttcagccag tacaagaagg tggaactgtt ccccaacggc 780
cagagcgtgg gcgagaagat ctttaagacc gccggcttcg tgaagccctt caccgaggct 840
cagctgctgt gtacccaggc tggcggacag ctggcctctc ctagatctgc cgccgaaaat 900
gccgctctcc agcagctggt ggtggccaag aatgaggccg ccttcctgag catgaccgac 960
agcaagaccg agggcaagtt cacctacccc accggcgagt ccctggtgta cagcaattgg 1020
gcccctggcg agcccaacga tgatggcggc tctgaggact gcgtggaaat cttcaccaac 1080
ggcaagtgga acgaccgggc ctgtggcgag aaaagactgg tcgtgtgcga gttctgaagg 1140
g 1141
<210> 8
<211> 63
<212> DNA
<213> 智人(homo sapiens)
<400> 8
atggcctgcc ccggatttct gtgggccctc gtgatcagca cctgtctgga attcagcatg 60
gcc 63
<210> 9
<211> 376
<212> PRT
<213> 智人(homo sapiens)
<400> 9
Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala Ala Glu Met Lys Thr Tyr Ser His Arg Thr Met
20 25 30
Pro Ser Ala Cys Thr Leu Val Met Cys Ser Ser Val Glu Ser Gly Leu
35 40 45
Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Glu Gly Pro Arg Gly Glu Lys
50 55 60
Gly Asp Pro Gly Leu Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ala Gly Met Pro Gly
65 70 75 80
Gln Ala Gly Pro Val Gly Pro Lys Gly Asp Asn Gly Ser Val Gly Glu
85 90 95
Pro Gly Pro Lys Gly Asp Thr Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro
100 105 110
Gly Val Pro Gly Pro Ala Gly Arg Glu Gly Pro Leu Gly Lys Gln Gly
115 120 125
Asn Ile Gly Pro Gln Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ala Gly Pro
130 135 140
Lys Gly Glu Val Gly Ala Pro Gly Met Gln Gly Ser Ala Gly Ala Arg
145 150 155 160
Gly Leu Ala Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Glu Arg Gly
165 170 175
Val Pro Gly Asn Thr Gly Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Met Gly Pro
180 185 190
Gln Gly Ser Pro Gly Ala Arg Gly Pro Pro Gly Leu Lys Gly Asp Lys
195 200 205
Gly Ile Pro Gly Asp Lys Gly Ala Lys Gly Glu Ser Gly Leu Pro Asp
210 215 220
Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln Val Gln
225 230 235 240
His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val Glu Leu Phe Pro
245 250 255
Asn Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr Ala Gly Phe Val
260 265 270
Lys Pro Phe Thr Glu Ala Gln Leu Leu Cys Thr Gln Ala Gly Gly Gln
275 280 285
Leu Ala Ser Pro Arg Ser Ala Ala Glu Asn Ala Ala Leu Gln Gln Leu
290 295 300
Val Val Ala Lys Asn Glu Ala Ala Phe Leu Ser Met Thr Asp Ser Lys
305 310 315 320
Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser Leu Val Tyr Ser

325 330 335

Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly Ser Glu Asp Cys

340 345 350

Val Glu Ile Phe Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg Ala Cys Gly Glu

355 360 365

Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe

370 375

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 10

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu

1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala

20

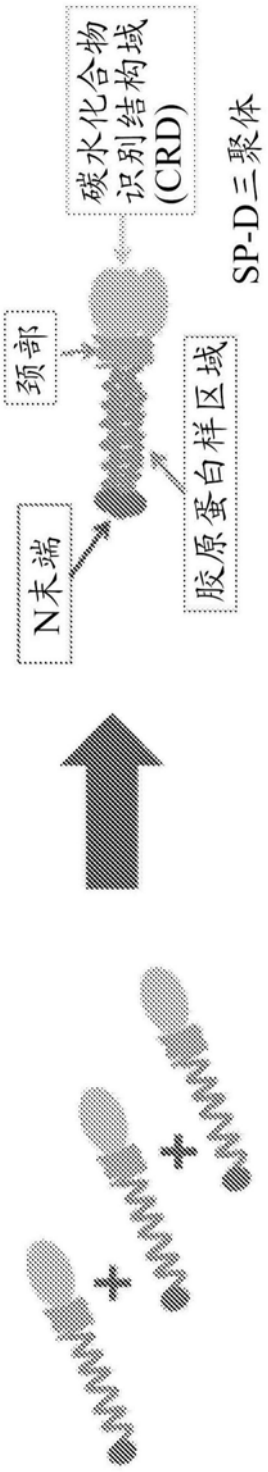


图1

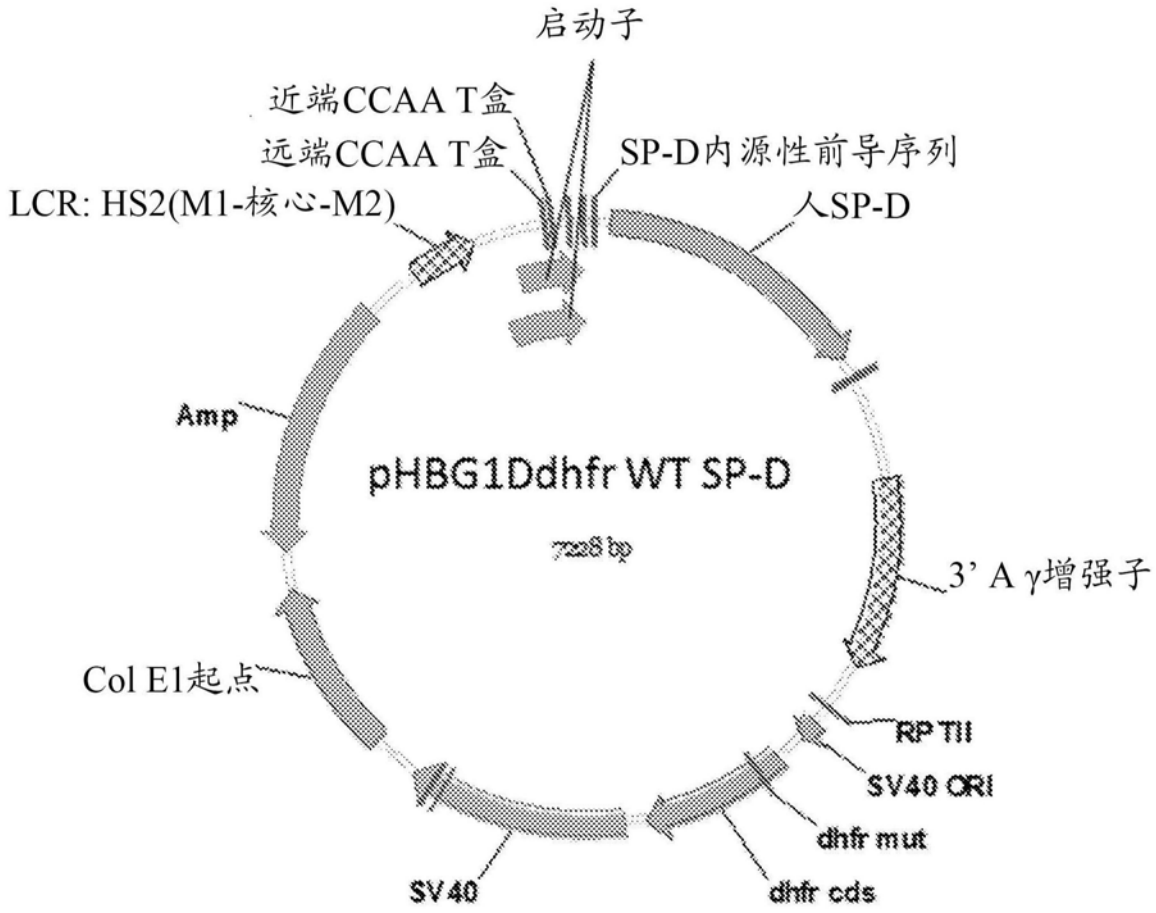

启动子
近端CCAA T盒
远端CCAA T盒
SP-D内源性前导序列
LCR: HS2(M1-核心-M2)
人SP-D
Amp
pHBG1Ddhfr WT SP-D
3' A γ增强子
Col E1起点
RP TII
SV40 ORI
dhfr mut
SV40
dhfr cds

图2A

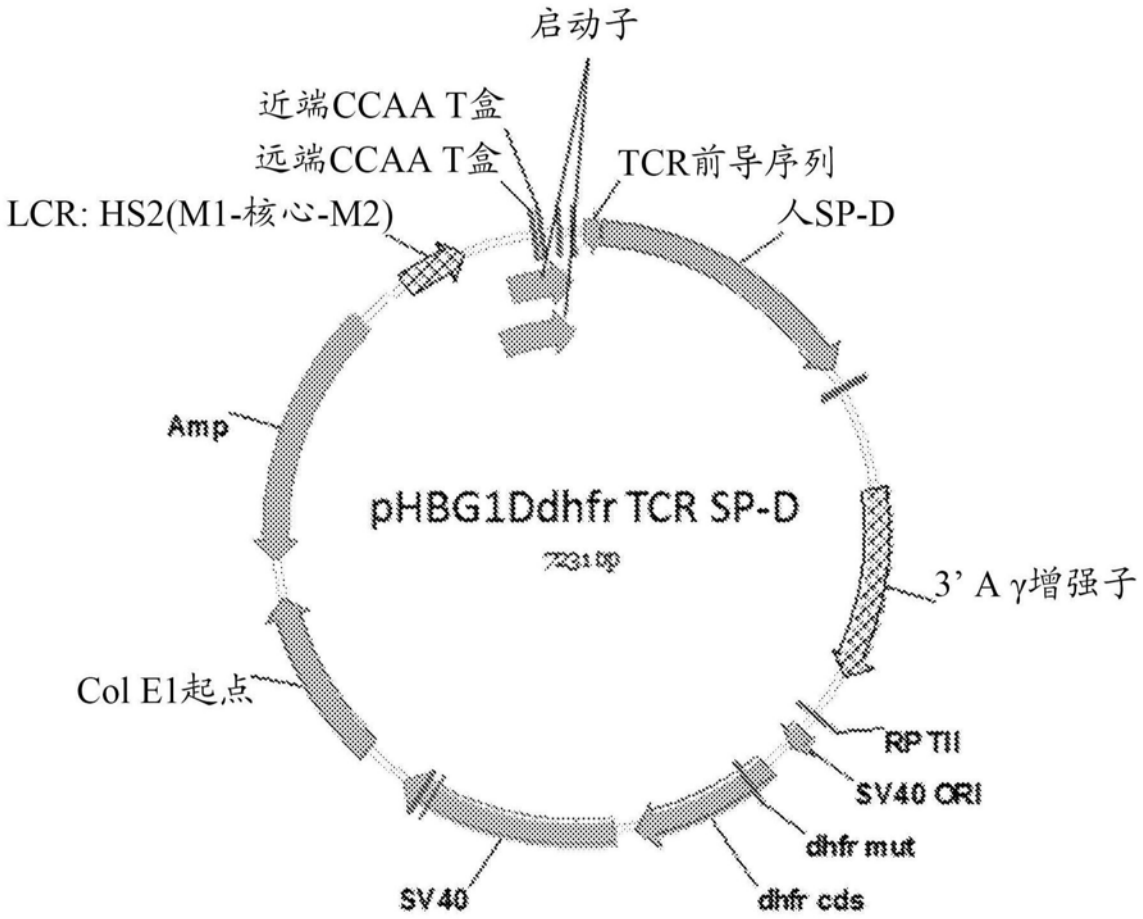

启动子
近端CCAA T盒
远端CCAA T盒
TCR前导序列
LCR: HS2(M1-核心-M2)
人SP-D
Amp
pHBG1Ddhfr TCR SP-D
3' A γ增强子
Col E1起点
RP TII
SV40 ORI
dhfr mut
SV40
dhfr cds

图2B

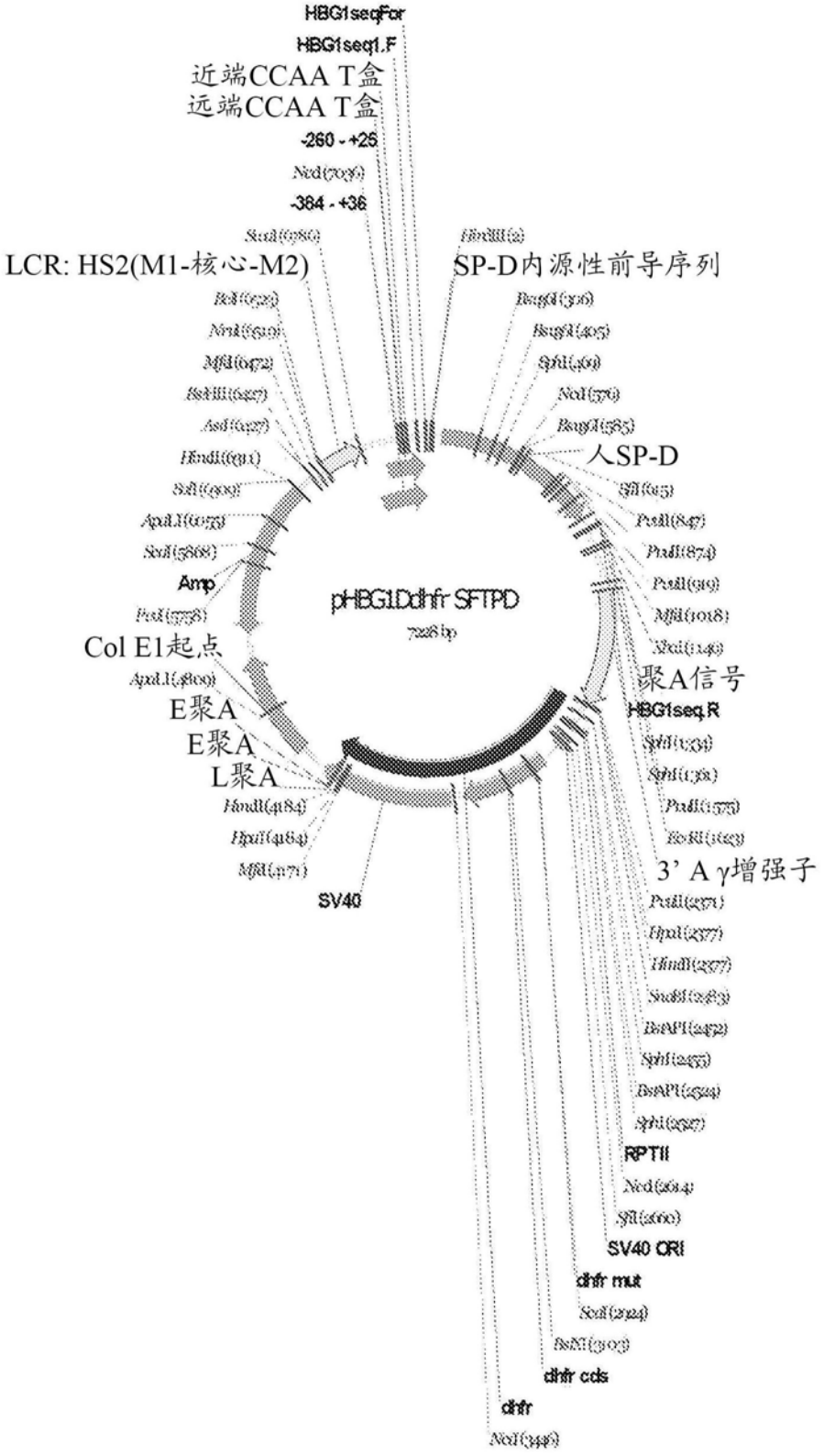

HBG1seqFor
HBG1seq1.F
近端CCAA T盒
远端CCAA T盒
-260 - +25
-364 - +36
LCR: HS2(M1-核心-M2)
SP-D内源性前导序列
人SP-D
聚A信号
HBG1seq.R
3' A γ增强子
RPTII
SV40 ORI
dhfr mut
dhfr cds
dhfr
SV40
Amp
Col E1起点
E聚A
E聚A
L聚A
pHBG1Ddhfr SFTPD
7228 bp

图2C

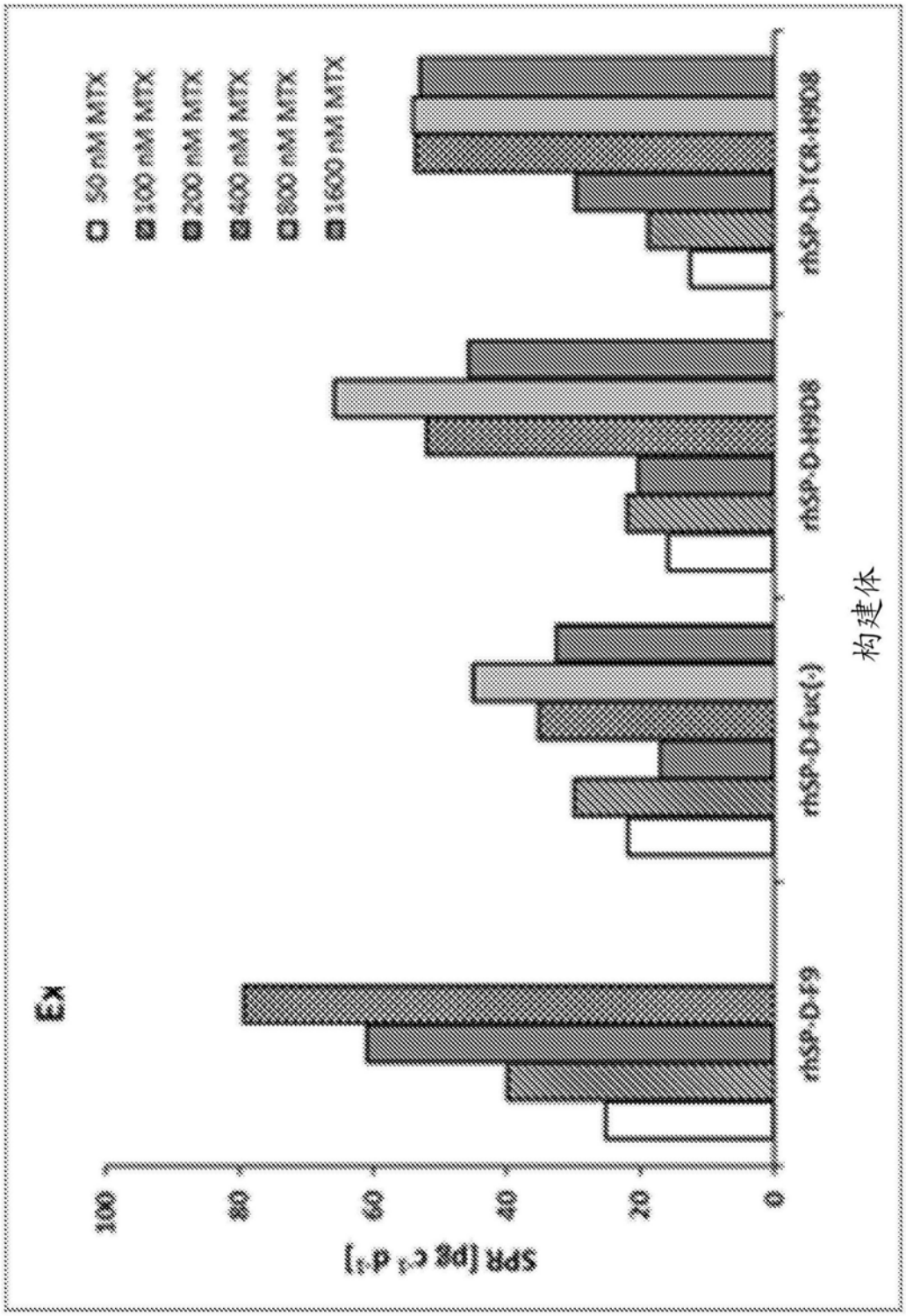

50 nM MTX
100 nM MTX
200 nM MTX
400 nM MTX
800 nM MTX
1600 nM MTX
mSP-D-TCR-H9D8
mSP-D-H9D8
mSP-D-Fuc(-)
mSP-D-F9
构建体
SPR [pg c⁻¹ d⁻¹]
0
20
40
60
80
100
Ex

图3

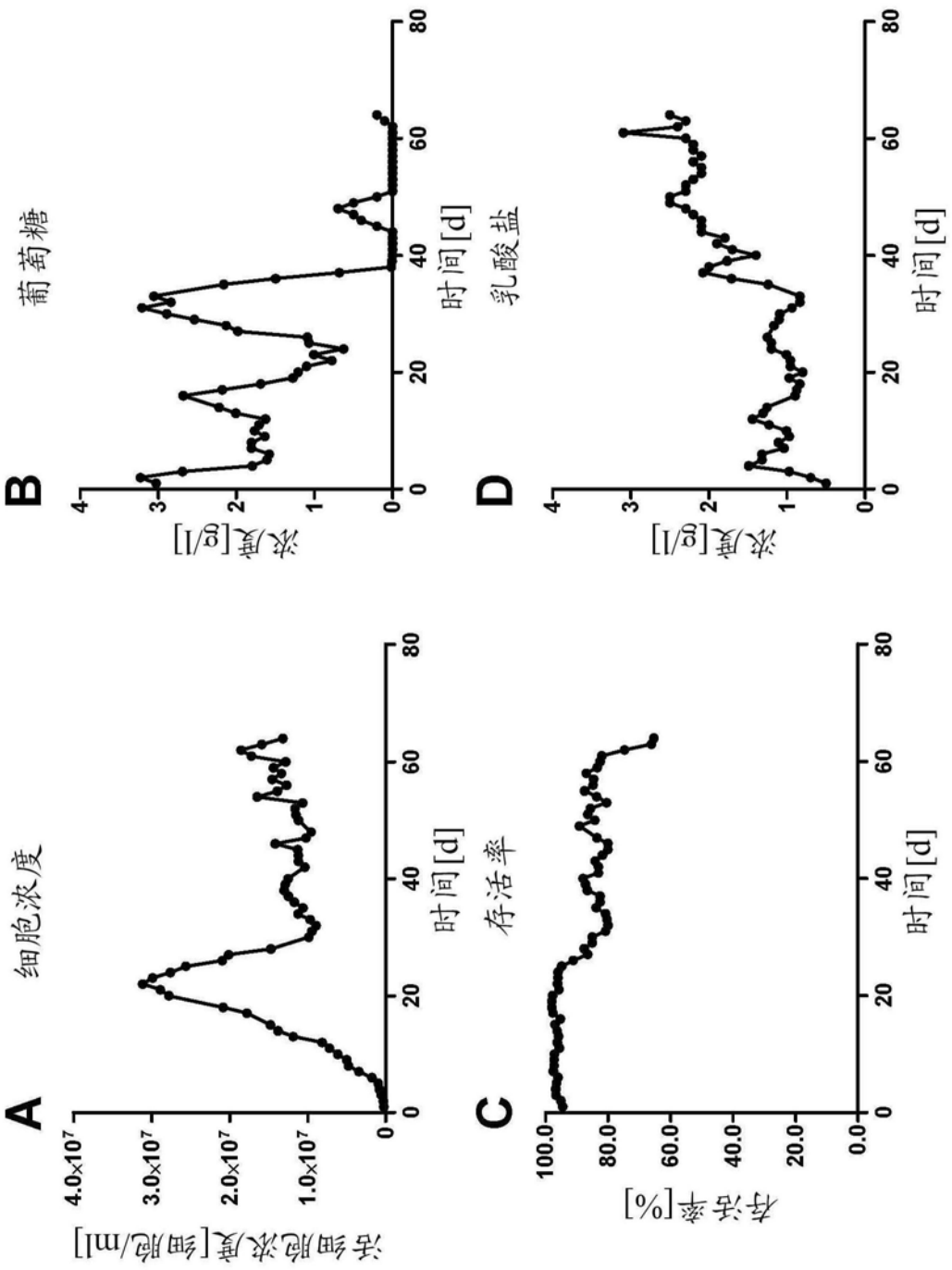

A
细胞浓度
活细胞浓度[细胞/ml]
4.0x10^7
3.0x10^7
2.0x10^7
1.0x10^7
0
0
20
40
60
80
时间[d]
B
葡萄糖
浓度[g/l]
4
3
2
1
0
0
20
40
60
80
时间[d]
C
存活率
存活率[%]
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0
20
40
60
80
时间[d]
D
乳酸盐
浓度[g/l]
4
3
2
1
0
0
20
40
60
80
时间[d]

图4

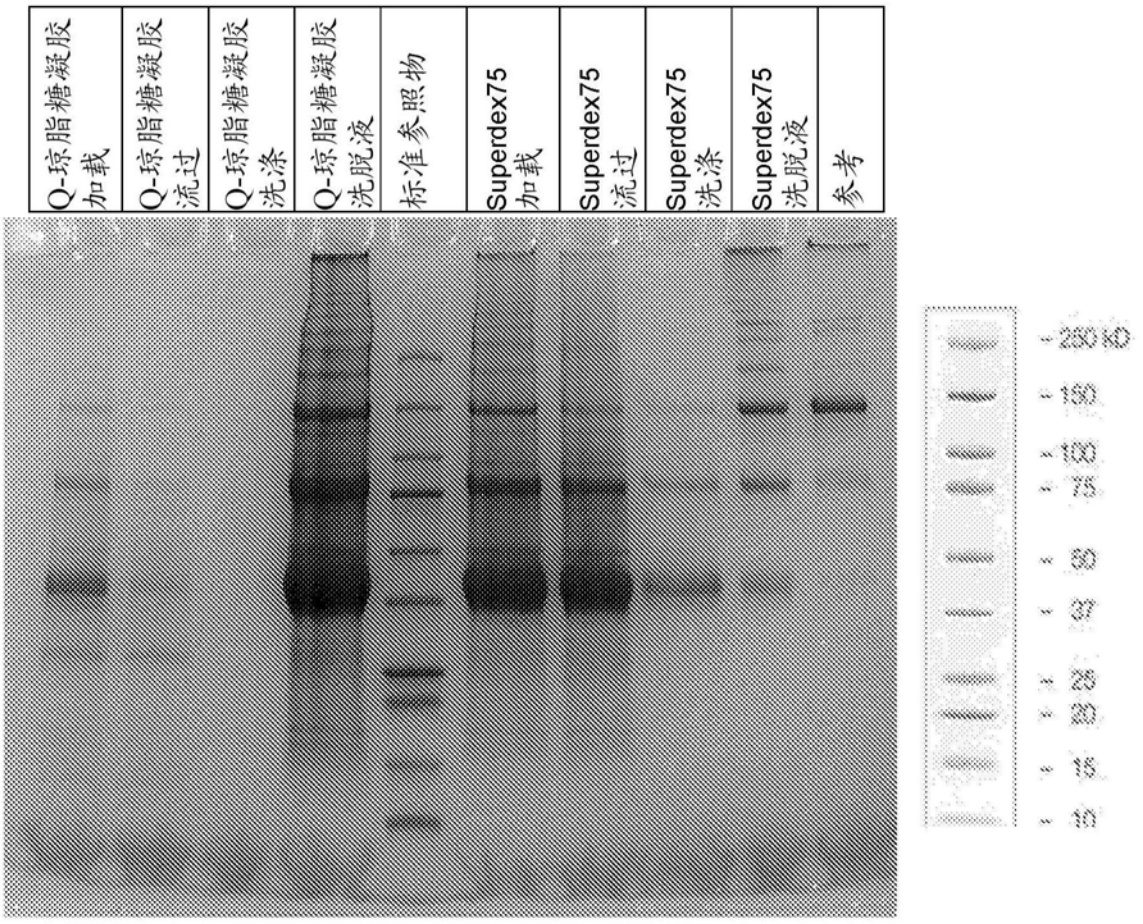

Q-琼脂糖凝胶加载
Q-琼脂糖凝胶流过
Q-琼脂糖凝胶洗涤
Q-琼脂糖凝胶洗脱液
标准参照物
Superdex75加载
Superdex75流过
Superdex75洗涤
Superdex75洗脱液
参考
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

图5

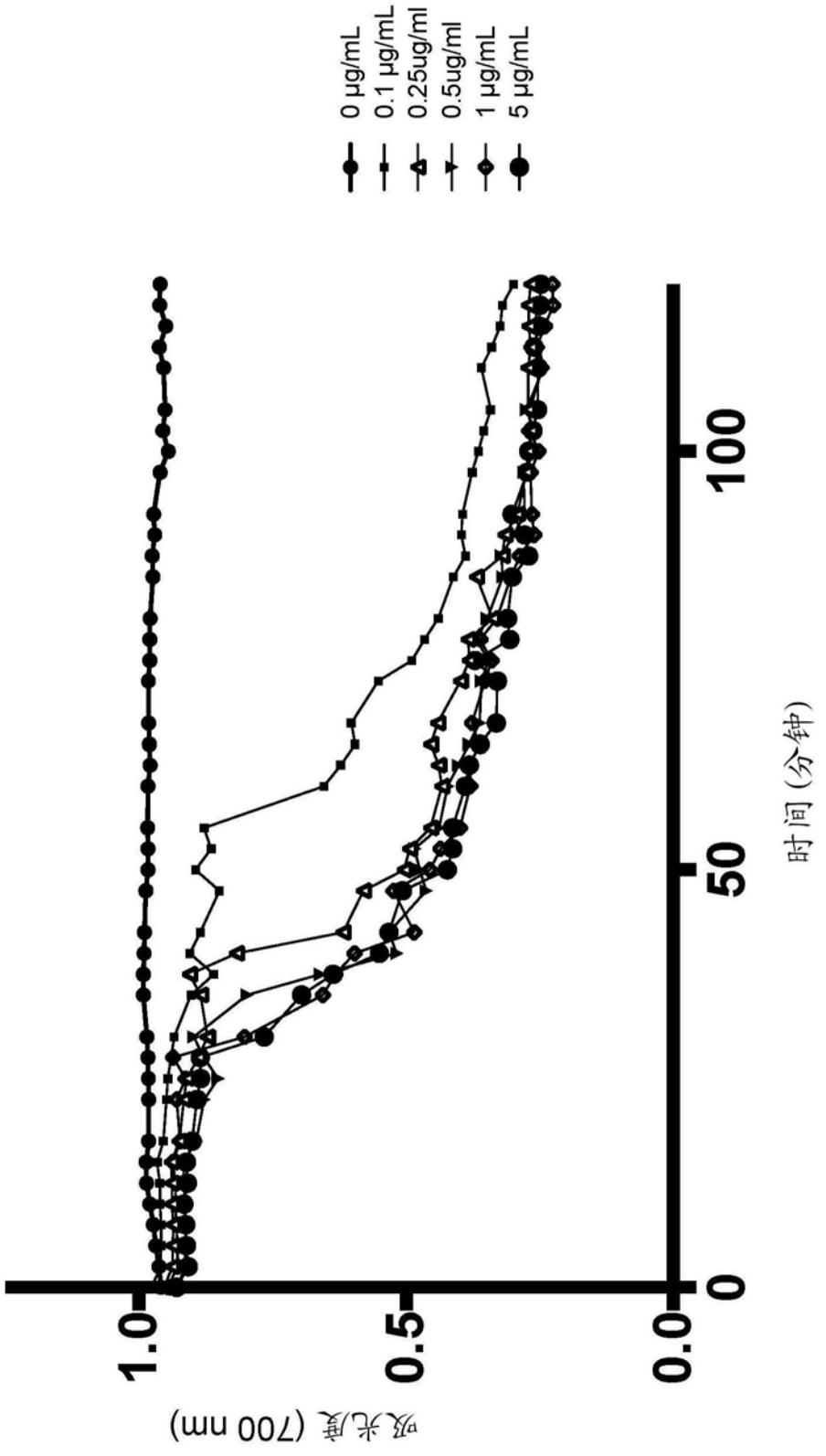

0 μg/mL
0.1 μg/mL
0.25ug/ml
0.5ug/ml
1 μg/mL
5 μg/mL
1.0
0.5
0.0
0
50
100
吸光度 (700 nm)
时间 (分钟)

图6

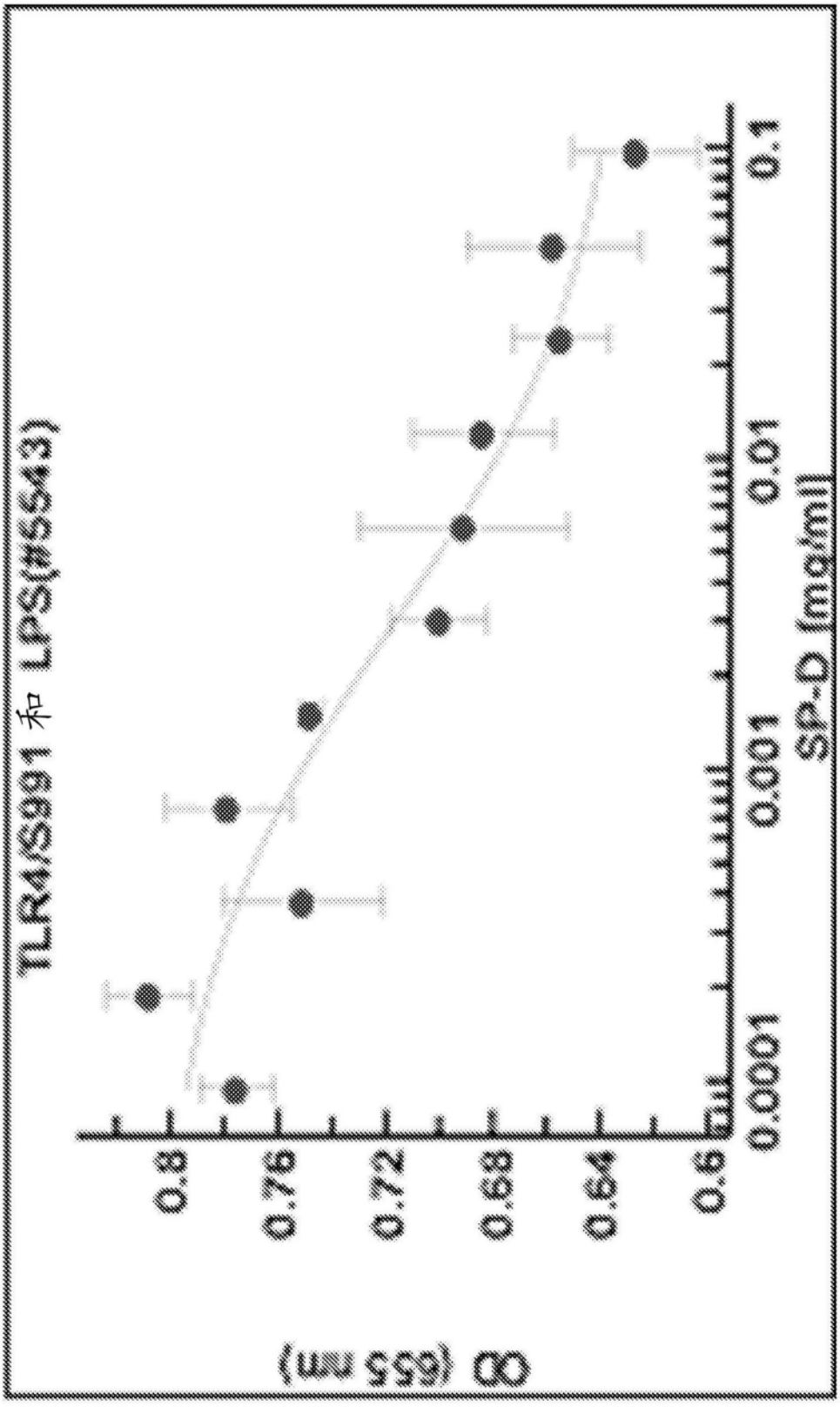

TLR4/S991 和 LPS(hS543)
SP-D (mg/ml)
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
0.8
0.76
0.72
0.68
0.64
0.6
OD (655 nm)

图7

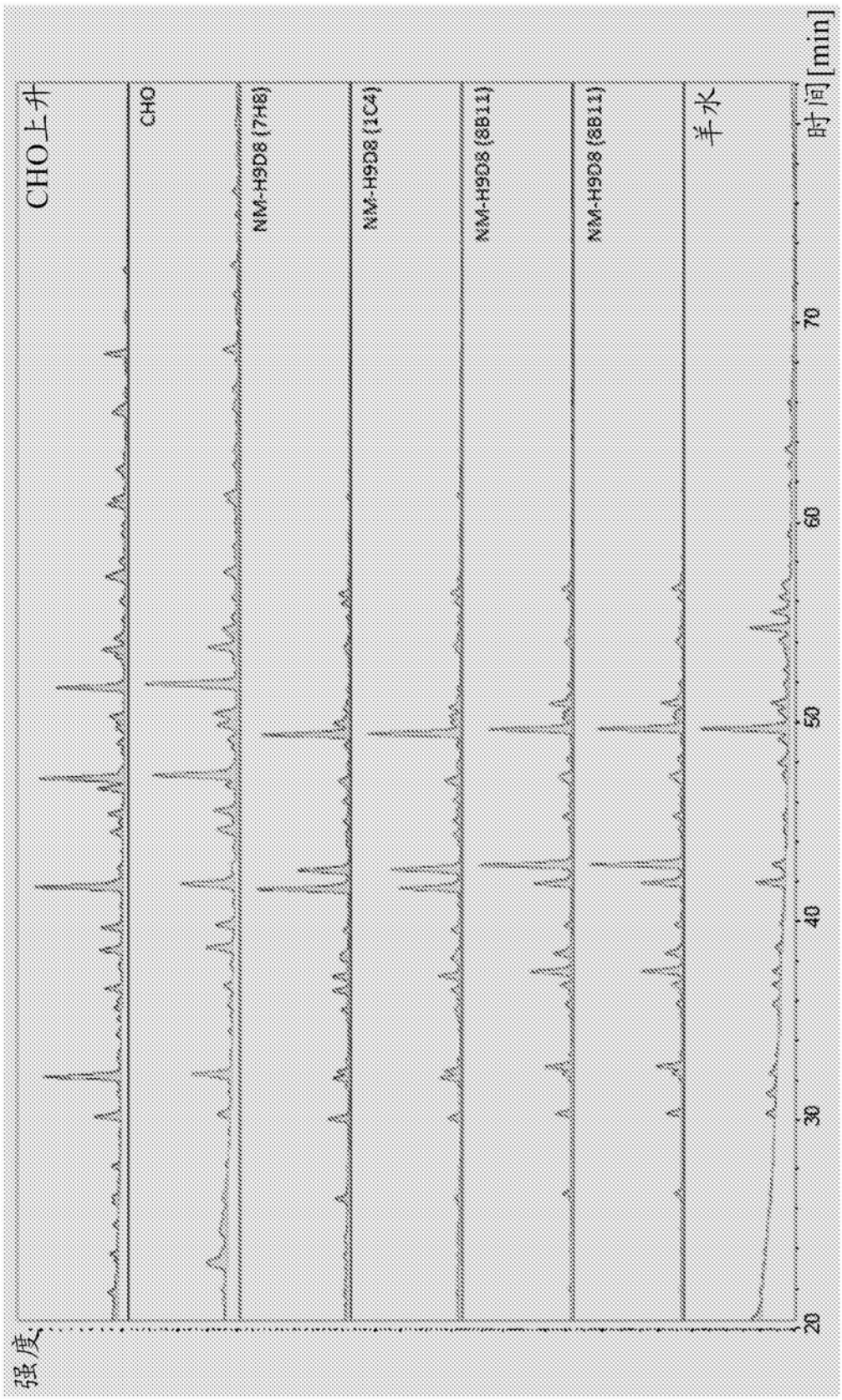

CHO上升
CHO
NM-H9D8 (7H8)
NM-H9D8 (1C4)
NM-H9D8 (8B11)
NM-H9D8 (6B11)
羊水
强度
20
30
40
50
60
70
时间[min]

图8

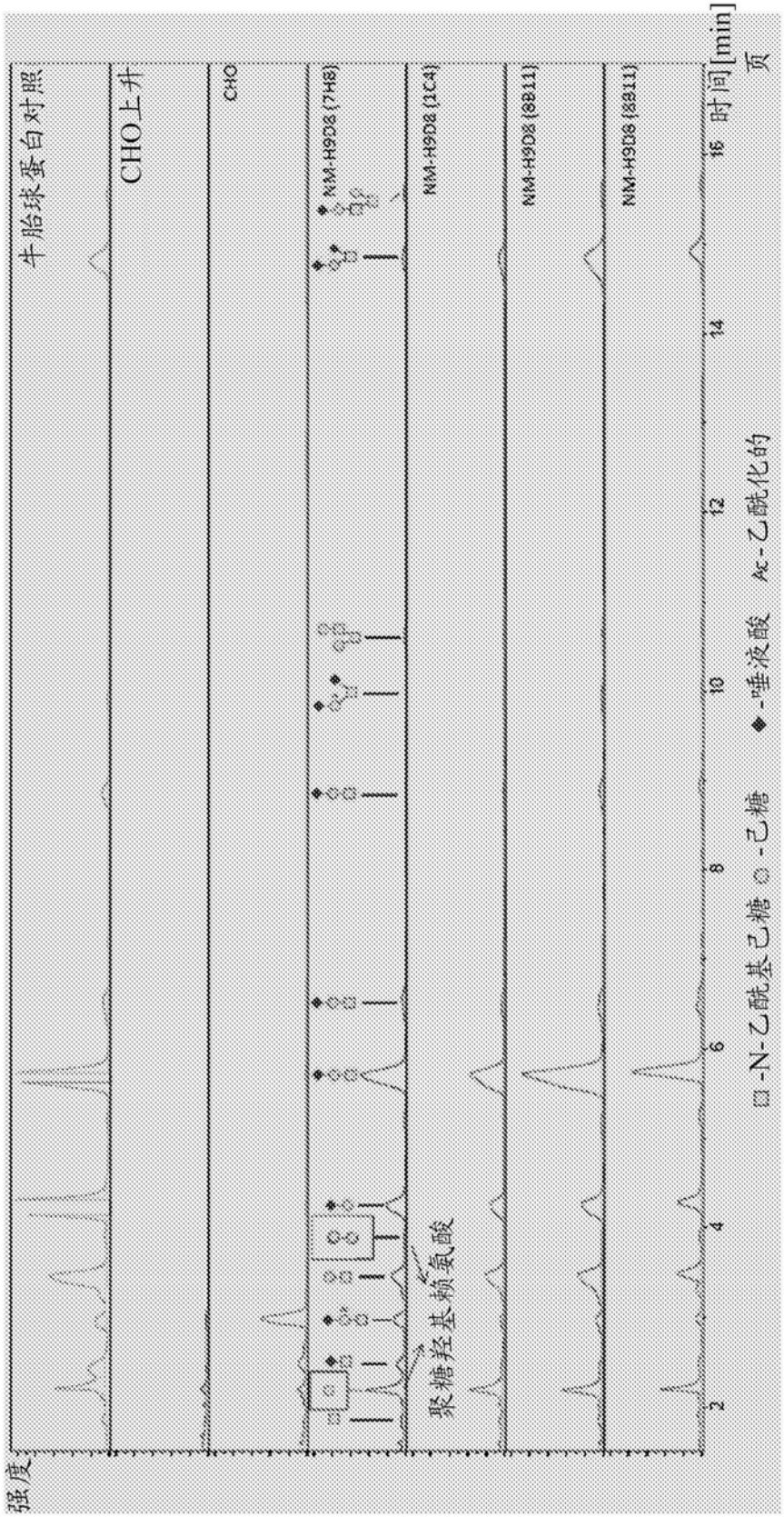

强度
牛胎球蛋白对照
CHO上升
CHO
NM-H9D8 (7H8)
NM-H9D8 (1C4)
聚糖羟基烯氨酸
NM-H9D8 (8B11)
NM-H9D8 (2B11)
2
4
6
8
10
12
14
16
时间[min]
□-N-乙酰基己糖 ○-己糖 ◆-唾液酸 Ac-乙酰化的

图9

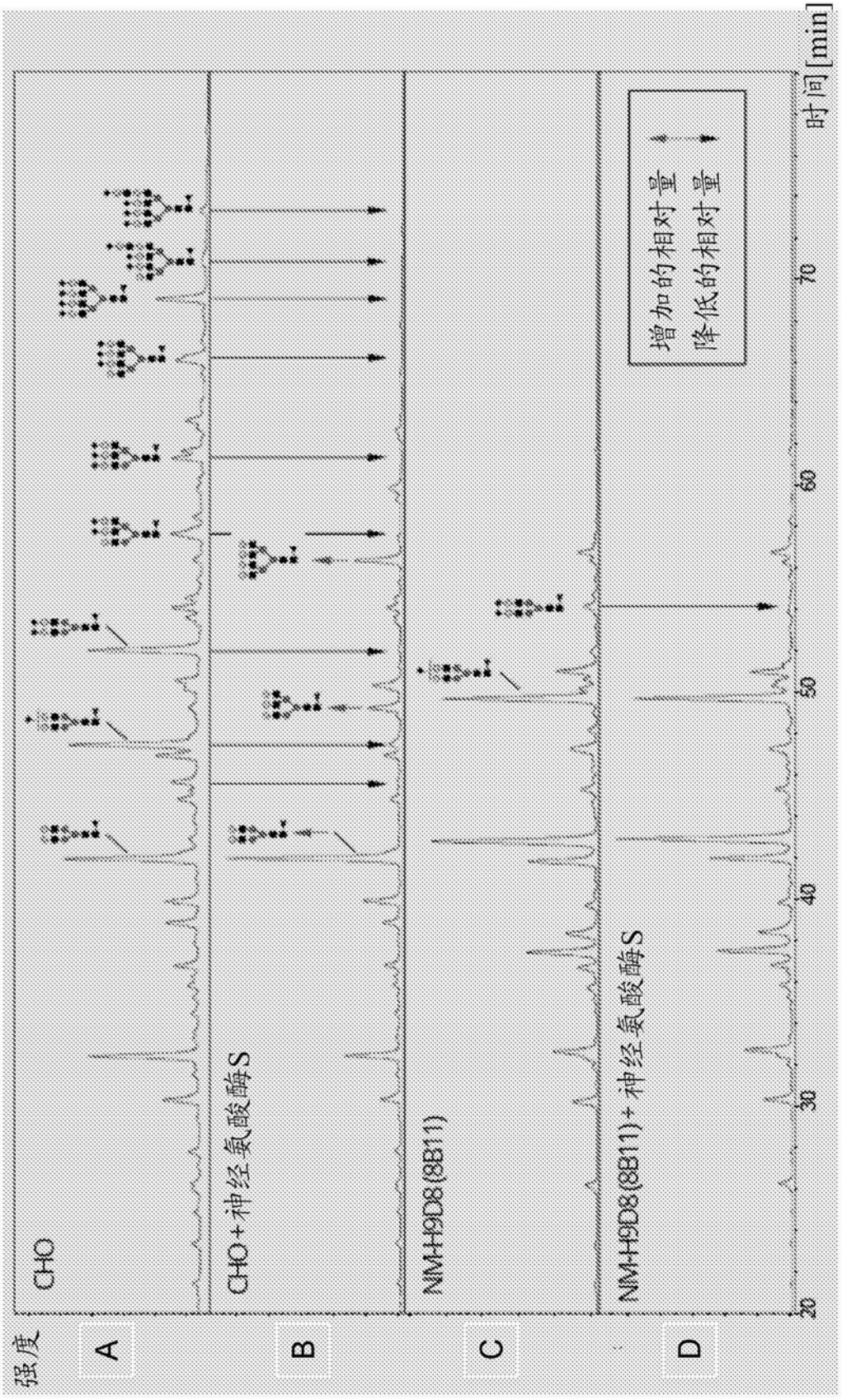

强度
A
CHO
B
CHO+神经氨酸酶S
C
NM-H9D8(8B11)
D
NM-H9D8(8B11)+神经氨酸酶S
增加的相对量
降低的相对量
20
30
40
50
60
70
时间[min]

图10