



(51) МПК
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21)(22) Заявка: 2012157307, 26.05.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.05.2011

Дата регистрации:
22.03.2017

Приоритет(ы):

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

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

(45) Опубликовано: 22.03.2017 Бюл. № 9

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 28.12.2012

(86) Заявка РСТ:
US 2011/038191 (26.05.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/150241 (01.12.2011)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЧЖОУ Мэйся (US),
СНЕДЕКОР Брэдли Ричард (US),
НГ Чи Кин Домингос (US),
ШЭНЬ Эми (US)

(73) Патентообладатель(и):
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: KIM SH et al., Down-regulation of
lactate dehydrogenase-A by siRNAs for
reduced lactic acid formation of Chinese
hamster ovary cells producing thrombopoietin,
Appl Microbiol Biotechnol., 2007 Feb, Vol.74,
No.1, pp.152-9. CHUN-WUN LU et al.,
Induction of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-3
by Hypoxia-inducible Factor-1 Promotes
Metabolic Switch and (см. прод.)

R U
2 6 1 4 1 2 5 C 2

(54) СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ ЛАКТАТА И УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ПОЛИПЕТИДА ПУТЕМ
ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И КИНАЗЫ
ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

(57) Формула изобретения

1. Способ снижения продукции лактата в культивируемых клетках млекопитающего, причем способ содержит культивирование клеток, содержащих первую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую малую интерферирующую РНК (миРНК), специфичную для лактатдегидрогеназы (LDH), и вторую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для киназы пируватдегидрогеназы (PDHK), где первая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с первым промотором, и вторая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана со вторым промотором.

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

3. Способ по п. 1, в котором культивируемые клетки дополнительно содержат третью

R U
2 6 1 4 1 2 5 C 2

R U
2 6 1 4 1 2 5 C 2

R U
2 6 1 4 1 2 5 C 2

гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для второй PDHK, и третья гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с третьим промотором.

4. Способ по п. 3, в котором культивируемые клетки дополнительно содержат четвертую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для третьей PDHK, и четвертая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с четвертым промотором.

5. Способ по п. 4, в котором культивируемые клетки дополнительно содержат пятую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для четвертой PDHK, и пятая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с пятым промотором.

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Способ по п. 4, в котором средняя скорость продукции лактата у культивируемых клеток меньше чем $0,02 \text{ мг}/10^6 \text{ клеток}/\text{день}$ со знаком минус.

15. Способ по п. 4, в котором культивируемые клетки обладают специфической выработкой, которая на 75% выше, чем выработка, которой обладают культивируемые клетки, не имеющие гетерологичную нуклеотидную последовательность, содержащую PDHK и LDH.

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

17. Способ по п. 4, в котором культивируемые клетки обладают выработкой полипептида, которая по меньшей мере на 68% выше, чем выработка, которой обладают культивируемые клетки, не имеющие гетерологичную нуклеотидную последовательность, содержащую PDHK и LDH.

18. Способ сайленсинга или снижения в культивируемой клетке млекопитающего транскрипции лактатдегидрогеназы (LDH) и киназы пируватдегидрогеназы (PDHK), содержащий: введение в клетку вектора, содержащего первую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую малую интерферирующую РНК (миРНК), специфичную для LDH, и вторую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для PDHK, где первая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с первым промотором, и вторая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана со вторым промотором, причем миРНК экспрессируются, приводя, таким образом, к сайленсингу или снижению транскрипции генов LDH и PDHK.

R U
2 6 1 4 1 2 5
C 2

19. Способ получения клетки млекопитающего, которая проявляет пониженное продуцирование лактата в культуре, содержащий введение в клетку вектора, содержащего первую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую малую интерферирующую РНК (миРНК), специфичную для LDH, и вторую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для PDHK, где первая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с первым промотором, и вторая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана со вторым промотором.

20. Клетка млекопитающего в культуре, содержащая первую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую первую малую интерферирующую РНК (миРНК), специфичную для лактатдегидрогеназы (LDH), и вторую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую миРНК, специфичную для киназы пируватдегидрогеназы (PDHK), где первая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с первым промотором, и вторая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана со вторым промотором, где клетка продуцирует гетерологичный полипептид.

21. Клетка по п. 20, где клетка дополнительно содержит третью гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для второй PDHK, и третья гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с третьим промотором.

22. Клетка по п. 21, где клетка дополнительно содержит четвертую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для третьей PDHK, и четвертая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с четвертым промотором.

23. Клетка по п. 22, где клетка дополнительно содержит пятую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для четвертой PDHK, и пятая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с пятым промотором.

24. Клетка по какому-либо из пп. 20, 21, 22 и 23, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1, PDHK2, PDHK3 и PDHK4.

25. Клетка по какому-либо из пп. 20, 21 и 22, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1, PDHK2 и PDHK3.

26. Клетка по п. 20 или 21, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1 и PDHK2.

27. Клетка по п. 20 или 21, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK1 и PDHK3.

28. Клетка по п. 20 или 21, где PDHK выбирают из группы, состоящей из PDHK2 и PDHK3.

29. Клетка по п. 21, где LDH представляет собой LDHa, первая PDHK представляет собой PDHK1, вторая PDHK представляет собой PDHK2 и третья PDHK представляет собой PDHK3.

30. Клетка по п. 20, где гетерологичный полипептид представляет собой антитело.

31. Клетка по п. 22, где клетка обладает средней скоростью продукции лактата меньше чем $0,02 \text{ мг}/10^6 \text{ клеток}/\text{день}$ со знаком минус.

32. Клетка по п. 22, где клетка обладает специфической выработкой, которая на около 75% выше, чем выработка, которой обладают культивируемые клетки, не имеющие гетерологичную нуклеотидную последовательность, содержащую LDH и PDHK.

33. Клетка по п. 22, где клетка обладает осмолярностью меньше чем 300 мОsm.

34. Клетка по п. 22, где клетка обладает выработкой полипептида, которая по

R U 2 6 1 4 1 2 5 C 2

меньшей мере на 68% выше, чем выработка, которой обладают культивируемые клетки, не имеющие гетерологичную нуклеотидную последовательность, содержащую LDH и PDHK.

35. Вектор, содержащий первую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую малую интерферирующую РНК (миРНК), специфичную для лактатдегидрогеназы (LDH), и вторую гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую миРНК, специфичную для киназы пируватдегидрогеназы (PDHK), где первая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана с первым промотором, и вторая гетерологичная нуклеотидная последовательность функционально связана со вторым промотором, где вектор используется для снижения продукции лактата в культивируемых клетках млекопитающих.

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

37. Способ по п. 36, в котором культивируемые клетки дополнительно экспрессируют миРНК, специфичную для второй PDHK.

38. Способ по п. 37, в котором культивируемые клетки дополнительно экспрессируют миРНК, специфичную для третьей PDHK.

39. Способ по п. 37, в котором культивируемые клетки дополнительно экспрессируют миРНК, специфичную для четвертой PDHK.

40. Способ по п. 38, в котором культивируемые клетки обладают выработкой полипептида, которая по меньшей мере на 68% выше, чем выработка, которой обладают культивируемые клетки, не имеющие миРНК, специфичных для LDH и PDHK.

(56) (продолжение):

Drug Resistance, J Biol Chem., 2008 Oct 17, Vol.283, No.42, pp.28106-28114. US 20090325287 A1, 31.12.2009. US 20090209618 A1, 20.08.2009. RU 2487168 C2, 10.07.2013.