РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2020 109 398** (13) **A**

(51) МПК
C07K 14/785 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: **2020109398, 04.09.2018**

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
06.09.2017 US 62/554,825;
08.01.2018 US 62/614,758

(43) Дата публикации заявки: **06.10.2021** Бюл. № **28**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **06.04.2020**

(86) Заявка PCT:
US 2018/049391 (04.09.2018)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2019/050857 (14.03.2019)

Адрес для переписки:
190900, г. Санкт-Петербург, BOX 1125, Нилова Мария Иннокентьевна

(71) Заявитель(и):
ЭЙРВЭЙ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US),
ГЛИКОТОП ГМБХ (DE)

(72) Автор(ы):
РОЗЕНБАУМ, Джен Сьюзан (US),
КУАСТ, Фредерик Гьяпон (DE),
КАУП, Маттиас (DE),
ШТЁКЛЬ, Ларс (DE)

(54) **СПОСОБЫ, КОМПОЗИЦИИ И КЛЕТКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СУРФАКТАНТНОГО БЕЛКА D (SP-D)**

(57) Формула изобретения

1. Способ получения композиции полипептида сурфактантного белка D (SP-D) человека, включающий

a) введение полинуклеотида, кодирующего полипептид SP-D, в клетку млекопитающего, являющегося человеком;

b) культивирование указанной клетки в условиях, при которых экспрессируется указанный полипептид SP-D; и

c) выделение экспрессированного полипептида SP-D из указанной клетки.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная клетка происходит из клетки миелоидного лейкоза человека.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанная клетка выбрана из группы, состоящей из NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 и NM-F9.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой клетку NM-H9D8.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует лидерную последовательность полипептида SP-D дикого типа.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид содержит SEQ ID NO:03.

7. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид содержит SEQ

RU 2020109398 A

RU 2020109398 A

ID NO:02.

8. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует полипептид, имеющий последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO:05.

9. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует полипептид, имеющий последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO:04.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует лидерную последовательность полипептида Т-клеточного рецептора (TCR) дикого типа.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид содержит SEQ ID NO:08.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид содержит SEQ ID NO:07.

13. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует полипептид, имеющий последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO:10.

14. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует полипептид, имеющий последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO:09.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный полипептид SP-D содержит остаток в полиморфном положении, при этом указанный остаток выбран из группы, состоящей из Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290 и Ala 286/306.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанный полипептид SP-D содержит Met11/31.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанный полипептид SP-D содержит Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290 и Ala 286/306.

18. Способ по п. 1, дополнительно включающий выделение популяции экспрессированных полипептидов SP-D, причем каждый экспрессированный полипептид SP-D содержит углевод сложного типа, присоединенный к сайту N-гликозилирования, при этом указанная популяция имеет профиль гликозилирования, включающий следующие характеристики: i) по меньшей мере 70% указанных углеводов сложного типа содержат коровую фукозу; ii) по меньшей мере 10% указанных углеводов сложного типа содержат по меньшей мере один остаток сиаловой кислоты; iii) по меньшей мере 50% указанных углеводов сложного типа содержат по меньшей мере биантенную углеводную структуру; iv) по меньшей мере 10% указанных углеводов сложного типа содержат бисектный N-ацетилглюкозамин; v) менее 10% указанных углеводов представляют собой структуры с высоким содержанием маннозы; и vi) обнаруживаемое количество α2,6-связанных остатков сиаловой кислоты.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанная популяция имеет профиль гликозилирования, включающий одну или более из следующих характеристик i) по меньшей мере 20% указанных углеводов сложного типа содержат бисектный N-ацетилглюкозамин; и ii) по меньшей мере 85% указанных углеводов сложного типа содержат коровую фукозу.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует полипептид дигидрофолатредуктазу.

21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование указанной клетки включает приведение указанной клетки в контакт с антифолатом.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что экспрессию указанного полипептида SP-D увеличивают путем увеличения концентрации антифолата.

23. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанный антифолат содержит метотрексат.

24. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную клетку культивируют в перфузионном биореакторе.

RU 2020109398 A

RU 2020109398 A

25. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную клетку культивируют в непрерывной культуре.

26. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование указанной клетки включает поддержание питательной среды, имеющей pH 7,2 значение растворенного кислорода 40% и/или 20% и температуру 37°C.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что содержание растворенного кислорода ниже 35%, предпочтительно 30%.

28. Способ по п. 1, отличающийся тем, что выделение экспрессированного полипептида SP-D из указанной клетки включает получение супернатанта клеток из культуральной среды, содержащей указанную клетку.

29. Вектор экспрессии, кодирующий лидерный полипептид, полипептид сурфактантного белка D (SP-D) человека и дигидрофолатредуктазу.

30. Вектор по п. 29, отличающийся тем, что указанный лидерный полипептид представляет собой лидерную последовательность полипептида SP-D дикого типа.

31. Вектор по п. 30, отличающийся тем, что указанный лидерный полипептид содержит SEQ ID NO:05.

32. Вектор по п. 30, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует полипептид, имеющий последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO:04.

33. Вектор по п. 29, отличающийся тем, что указанный лидерный полипептид представляет собой лидерную последовательность полипептида Т-клеточного рецептора (TCR) дикого типа.

34. Вектор по п. 33, отличающийся тем, что указанный лидерный полипептид содержит SEQ ID NO:10.

35. Вектор по п. 29, содержащий полинуклеотид, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:02 и 07.

36. Вектор по п. 29, кодирующий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:04 и 09.

37. Иммортализованная клетка человека, содержащая вектор экспрессии по любому из пп. 29-36.

38. Клетка по п. 37, отличающаяся тем, что указанная клетка происходит из клетки миелоидного лейкоза человека.

39. Клетка по п. 38, отличающаяся тем, что указанная клетка выбрана из группы, состоящей из NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 и NM-F9.

40. Клетка по п. 39, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку NM-H9D8.

41. Клетка по п. 39, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку NM-H9D8(8B11).

42. Иммортализованная клетка человека, содержащая вектор экспрессии, кодирующий полипептид сурфактантного белка D (SP-D) человека, причем указанная клетка происходит из клетки миелоидного лейкоза человека.

43. Клетка по п. 42, отличающаяся тем, что указанный вектор экспрессии дополнительно кодирует лидерный полипептид.

44. Клетка по п. 43, отличающаяся тем, что указанный лидерный полипептид представляет собой лидерную последовательность полипептида SP-D дикого типа.

45. Клетка по п. 44, отличающаяся тем, что указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:05.

46. Клетка по п. 43, отличающаяся тем, что указанный лидерный полипептид представляет собой лидерную последовательность полипептида Т-клеточного рецептора (TCR) дикого типа.

47. Клетка по п. 46, отличающаяся тем, что указанный лидерный полипептид содержит

RU 2020109398 A

RU 2020109398 A

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

48. Клетка по п. 42, отличающаяся тем, что указанный полипептид сурфактантного белка D (SP-D) человека содержит аминокисилотную последовательность с 22 по 376 положения SEQ ID NO:04.

49. Клетка по п. 42, отличающаяся тем, что указанный вектор экспрессии дополнительно кодирует дигидрофолатредуктазу.

50. Клетка по п. 42, отличающаяся тем, что указанная клетка выбрана из группы, состоящей из NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 и NM-F9.

51. Клетка по п. 50, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку NM-H9D8.

52. Клетка по п. 50, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку NM-H9D8(8B11).

RU 2020109398 A

RU 2020109398 A