



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012123010/10, 05.11.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
05.11.2009 US 61/258,565

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2013 Бюл. № 34

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 05.06.2012(86) Заявка РСТ:  
US 2010/055702 (05.11.2010)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2011/057120 (12.05.2011)

Адрес для переписки:

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

(71) Заявитель(и):

**ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**МАРРИЧИ Мэттью (US),  
РЕЙЛЛИ Доротея Е. (US)****(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ СЕКРЕЦИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ****(57) Формула изобретения**

1. Способ получения антитела, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, который содержит (1) первую область инициации трансляции (TIR), функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим тяжелую цепь антитела, где TIR содержит котрансляционную прокариотическую сигнальную последовательность секреции; и (2) вторую TIR, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим легкую цепь антитела, где вторая TIR содержит котрансляционную или посттрансляционную прокариотическую сигнальную последовательность секреции, посредством чего при экспрессии антитела в клетке-хозяине происходит укладка и сборка тяжелой и легкой цепей, чтобы сформировать биологически активное антитело.

2. Способ по п.1, где первая TIR содержит вариант сигнальной последовательности STII или DsbA.

3. Способ по п.2, где первая область инициации трансляции содержит вариант сигнальной последовательности DsbA.

4. Способ по п.2, где первая область инициации трансляции содержит последовательность одной из SEQ ID NO: 1-10, 36-39, 41 и 42.

5. Способ по п.1, где вторая область инициации трансляции содержит вариант сигнальной последовательности STII, DsbA, MalE или PhoA.

6. Способ по п.5, где вторая область инициации трансляции содержит полинуклеотид,

кодирующий вариант сигнальной последовательности PhoA или MalE.

7. Способ по п.5, где вторая область инициации трансляции содержит последовательность одной из SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39 и 41-42.

8. Способ по любому из пп.1, 4 и 7, где клетка-хозяин дополнительно содержит (3) третью область инициации трансляции, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим полипептид Fc.

9. Способ по п.8, где третья область инициации трансляции содержит вариант сигнальной последовательности STII, PhoI или DsbA.

10. Способ по п.8, где третья область инициации трансляции содержит вариант сигнальной последовательности PhoI или DsbA.

11. Способ по п.8, где третья область инициации трансляции содержит последовательность одной из SEQ ID NO: 23, 24, 26-39, 41 и 42.

12. Способ по любому из пп.1, 4 и 7, где первая и вторая области инициации трансляции обеспечивают приблизительно равные интенсивности трансляции.

13. Способ по п.12, где относительная интенсивность трансляции составляет приблизительно один или два.

14. Способ по п.8, где первая, вторая и третья области инициации трансляции обеспечивают приблизительно равные интенсивности трансляции.

15. Способ по п.14, где относительная интенсивность трансляции составляет приблизительно один или два.

16. Способ по любому из пп.1, 4 и 7, где полинуклеотид в клетке-хозяине дополнительно содержит промотор.

17. Способ по п.16, где промотор представляет собой прокариотический промотор, выбранный из группы, состоящей из промотора phoA, tac, lpp, lac-lpp, lac, ara и T7.

18. Способ по любому из пп.1, 4 и 7, где клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку.

19. Способ по п.18, где прокариотическая клетка представляет собой E.coli.

20. Способ по п.19, где E.coli представляет собой штамм с дефицитом активностей эндогенных протеаз.

21. Способ по п.19, где генотип E.coli не содержит гены degP и prc и содержит мутантный ген spg.

22. Способ по любому из пп.1, 4 и 7, где клетка-хозяин дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один прокариотический полипептид, выбранный из группы, состоящей из DsbA, DsbC, DsbG и FkpA.

23. Способ по п.22, где полинуклеотид кодирует как DsbA, так и DsbC.

24. Способ по любому из пп.1, 4 и 7, где клетка-хозяин содержит один или несколько полинуклеотидов, совместно кодирующих антитело.

25. Способ по любому из пп.1, 4 и 7, где способ дополнительно включает извлечение антитела из культуры клетки-хозяина.

26. Способ по п.25, где антитело извлекают из среды для культивирования клетки-хозяина.

27. Способ по п.26, где способ дополнительно содержит объединение извлеченного антитела с фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или носителем для того, чтобы получить фармацевтический состав, содержащий антитело.

28. Способ по п.26, где по меньшей мере 50% комплексов полипептидов иммуноглобулинов, которые сформированы, представляют собой антитело.

29. Способ по п.28, где по меньшей мере 70% комплексов полипептидов иммуноглобулинов, которые сформированы, представляют собой антитело.

30. Способ по любому из пп.1, 4 и 7, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

31. Способ по п.30, где антитело представляет собой химерное антитело, аффинно зрелое антитело, биспецифическое антитело, гуманизированное антитело, фрагмент антитела или антитело человека.
32. Способ по п.31, где фрагмент антитела представляет собой антитело с одним Fab фрагментом.
33. Способ по п.32, где антитело связывает с-met.
34. Способ по п.30, где антитело представляет собой биспецифическое антитело.
35. Полинуклеотид, содержащий вариант области инициации трансляции (TIR), где вариант TIR содержит варианты нуклеиновой кислоты сигнальной области секреции PhoA, MalE, DsbA или STII.
36. Полинуклеотид по п.35, где вариант TIR содержит последовательность одной из SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42.
37. Полинуклеотид по п.35, где интенсивность трансляции указанного варианта области инициации трансляции менее интенсивности трансляции области инициации трансляции дикого типа.
38. Полинуклеотид по любому из пп.35-37, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим гетерологичный полипептид, посредством чего при экспрессии гетерологичного полипептида в клетке-хозяине, происходит укладка и сборка гетерологичного полипептида, чтобы сформировать биологически активный гетерологичный полипептид.
39. Полинуклеотид по п.38, где гетерологичный полипептид выбран из тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела.
40. Полинуклеотид по п.39, где гетерологичный полипептид содержит (а) тяжелую цепь антитела и (b) легкую цепь антитела.
41. Полинуклеотид по п.40, где гетерологичный полипептид дополнительно содержит (с) полипептид Fc.
42. Полинуклеотид по п.38, где гетерологичный полипептид представляет собой антитело и где Полинуклеотид содержит (1) первую TIR, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим тяжелую цепь антитела, где TIR содержит котрансляционную прокариотическую сигнальную последовательность секреции; и (2) вторую TIR, функционально связанную с полинуклеотидом, кодирующим легкую цепь антитела, где вторая TIR содержит котрансляционную или посттрансляционную прокариотическую сигнальную последовательность секреции, посредством чего при экспрессии антитела в клетке-хозяине происходит укладка и сборка тяжелой и легкой цепей, чтобы сформировать биологически активное антитело.
43. Полинуклеотид по п.42, который дополнительно содержит (3) третью TIR, функционально связанную полинуклеотидом, кодирующим полипептид Fc.
44. Полинуклеотид по любому из пп.35-37, который дополнительно содержит промотор.
45. Полинуклеотид по п.44, где промотор представляет собой прокариотический промотор, выбранный из группы, состоящей из промотора phoA, tac, lpp, lac-lpp, lac, ara и T7.
46. Полинуклеотид по п.38, где гетерологичный полипептид представляет собой протеазу, иммуноадгезин или внеклеточный домен рецептора.
47. Полинуклеотид по п.42, где антитело представляет собой моноклональное антитело.
48. Полинуклеотид по п.42, где антитело представляет собой химерное антитело, аффинно зрелое антитело, биспецифическое антитело, гуманизированное антитело, фрагмент антитела или антитело человека.
49. Полинуклеотид по п.48, где фрагмент антитела представляет собой антитело с

одним Fab фрагментом.

50. Полинуклеотид по п.49, где антитело связывает с-met.

51. Полинуклеотид по п.48, где антитело представляет собой биспецифическое антитело.

52. Полинуклеотид по п.49, где тяжелая цепь антитела содержит одну или несколько мутаций T366A, L368A, Y407V и/или T366W.

53. Полинуклеотид по п.49, где полипептид Fc содержит одну или несколько мутаций T366A, L368A, Y407V и/или T366W.

54. Антитело, полученное способом по любому из пп.1, 4 и 7.

55. Фармацевтический препарат, содержащий антитело по п.54.

RU 20121212102 A 0103010 A

RU 201212123010 A