República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020004531-4 A2

(22) Data do Depósito: 04/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 08/09/2020

(54) Título: MÉTODOS, COMPOSIÇÕES E CÉLULAS PARA PREPARAR PROTEÍNA SURFACTANTE D (SP-D)

(51) Int. Cl.: A61K 38/00; A61P 11/00; C07K 14/00; C07K 14/435; C07K 14/785; (...).

(30) Prioridade Unionista: 06/09/2017 US 62/554,825; 08/01/2018 US 62/614,758.

(71) Depositante(es): AIRWAY THERAPEUTICS, LLC; GLYCOTOPE GMBH.

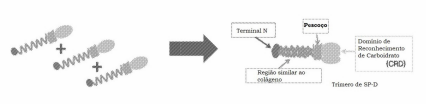
(72) Inventor(es): JAN SUSAN ROSENBAUM; FREDERICK GYAPON QUAST; MATTHIAS KAUP; LARS STÖCKL.

(86) Pedido PCT: PCT US2018049391 de 04/09/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/050857 de 14/03/2019

(85) Data da Fase Nacional: 06/03/2020

(57) Resumo: Algumas modalidades dos métodos e composições fornecidos aqui referem-se à preparação da proteína surfactante-D (SP-D). Algumas modalidades incluem a expressão da SP-D humana em certas linhagens de células e a purificação da SP-D humana destas linhagens de células. Algumas modalidades incluem a preparação de certas formas oligoméricas da SP-D humana.



“MÉTODOS, COMPOSIÇÕES E CÉLULAS PARA PREPARAR PROTEÍNA SURFACTANTE D (SP-D)”

RELATÓRIO DESCRITIVO

REFERÊNCIA REMISSIVA

A PEDIDOS DE PATENTES RELACIONADOS

[0001] Este Pedido de patente reivindica prioridade ao Pedido de Patente U.S. Provisório No. 62/614758 depositado em 8 de janeiro de 2018 intitulado “METHODS, COMPOSITIONS AND CELLS FOR PREPARING SURFACTANT PROTEIN D (SP-D)” e ao Pedido de Patente U.S. Provisório No. 62/554825 depositado em 6 de setembro de 2017 intitulado “METHODS, COMPOSITIONS AND CELLS FOR PREPARING SURFACTANT PROTEIN D (SP-D)”, dos quais cada um é incorporado como referência em sua totalidade.

REFERÊNCIA A LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] O presente Pedido de patente está sendo depositado junto com uma Listagem de Sequências no formato eletrônico. A Listagem de Sequências é fornecida na forma de um arquivo intitulado AIRWY007WOSEQ, criado em 31 de agosto de 2018, que tem um tamanho de aproximadamente 13 Kb. A informação no formato eletrônico da Listagem de Sequências é incorporada aqui como referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENNÇÃO

[0003] Algumas modalidades dos métodos e composições fornecidos aqui referem-se à preparação da proteína surfactante-D (SP-D). Algumas

modalidades incluem a expressão da SP-D humana em certas linhagens de células e a purificação da SP-D humana destas linhagens de células. Algumas modalidades incluem a preparação de certas formas oligoméricas da SP-D humana.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

[0004] O sufactante pulmonar de mamífero é uma mistura de proteínas (10%) e lipídeos (90%) que incluem o componente lipídico principal dipalmitoilfosfatidilcolina (Zuo YY, et al., Biochim Biophys Acta (2008) 1778:1947–77). A função principal do sufactante pulmonar é garantir a tensão superficial mínima dentro do pulmão para evitar o colapso durante a respiração. Além disso, através da interação com agentes patogênicos inalados, o sufactante pulmonar também participa da defesa do hospedeiro (Clements JA. Am Rev Respir Dis (1977) 115:67–71). Pulmonary surfactant deficiency is, therefore, associated with pulmonary diseases such as asthma, bronchiolitis, respiratory distress syndrome (RDS), cystic fibrosis e pneumonia (Griese M. Eur Respir J (1999) 13:1455–76). A deficiência de sufactante pulmonar está, portanto, associada a doenças pulmonares tais como asma, bronquiolite, síndrome do desconforto respiratório (RDS), fibrose cística e pneumonia (Griese M. Eur Respir J (1999) 13:1455–76). Formulações surfactantes são indicadas para o tratamento de RDS, que afeta ~1,5 milhão de bebês prematuros globalmente todos os anos. A síndrome do desconforto respiratório é uma doença de deficiência de sufactante pulmonar importante causada pela imaturidade estrutural dos pulmões em bebês prematuros, que torna difícil respirar, inibe a troca gasosa e promove colapso alveolar (Notter RH. Lung Surfactants. Basic Science and Clinical Applications. New York, NY: Marcel Dekker Inc.). Entretanto, o tratamento fica mais difícil se os pulmões estiverem infectados ou se houver complicações inflamatórias ou oxidativas, porque as

preparações surfactantes atuais não têm proteína surfactante D (SP-D). O tratamento bem sucedido de doenças pulmonares complexas, portanto, requer a produção de formulações surfactantes cuja composição se pareça o máximo possível à do sufactante pulmonar natural (Robertson B, et al., Biochim Biophys Acta (1998) 1408:346–61).

[0005] A SP-D tem uma função no sistema imunológico inato pulmonar através do fornecimento de atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas que se direcionam às doenças pulmonares crônicas tais como asma, fibrose cística e enfisema induzido pelo tabagismo (Clark H, et al., Immunobiology (2002) 205:619–31). Dados baseados em cordeiros recém-nascidos prematuros sugerem que a administração de ~2–3 mg/kg de SP-D humana recombinante em combinação com 100 mg/kg de Survanta® (um surfactante natural disponível nos EUA) é mais eficiente que Survanta® individualmente para a prevenção de choque endotóxico e a redução de inflamação pulmonar causada pela ventilação (Ikegami M, et al., Am J Respir Crit Care Med (2006) 173:1342–7; Sato A, et al., Am J Respir Crit Care Med (2010) 181:1098–105).

[0006] Tradicionalmente, a SP-D foi isolada do sobrenadante da lavagem broncoalveolar ou do fluido amniótico, mas a maior parte da SP-D é perdida durante a purificação, em parte devido às propriedades hidrofílicas da SP-D (Dodagatta-Marri E, et al., Methods Mol Biol (2014) 100:273–90). O uso de SP-D natural para suplementar formulações pulmonares surfactantes pode garantir eficiência terapêutica devido ao fato de que a multimerização de ordem superior no surfactante endógeno aumenta o número de sítios de ligação da SP-D com os ligantes de carboidrato sobre a superfície dos agentes patogênicos, atingindo efeitos potentes de aglutinação bacteriana e viral (White M, et al., J Immunol (2008) 181:7936–43). O estado de oligomerização apropriado também é requerido

para o reconhecimento de receptores e para a transdução de sinal mediada pelo receptor para a modulação da resposta imunológica do hospedeiro (Yamoze M et al., J Biol Chem (2008) 283:35878-35888) bem como para a manutenção da homeostase do surfactante (Zhang L et al., J Biol Chem (2001) 276:19214-19219).

[0007] Os baixos rendimentos de SP-D e estados de oligomerização variáveis tornam difícil a utilização de fontes naturais para a produção de SP-D farmacêutica (Strong P, et al., J Immunol Methods (1998) 220:139–49). Para superar algumas destas limitações, pode ser produzida SP-D recombinante em micro-organismos ou linhagens de células de mamíferos, potencialmente oferecendo uma plataforma em grande escala para a produção de formulações homogêneas de SP-D recombinante. Entretanto, é um desafio expressar a SP-D humana recombinante (rhSP-D) em níveis suficientes para uma campanha comercial em linhagens de células de mamíferos comumente utilizadas porque a proteína não é sintetizada de forma eficiente e os rendimentos são tipicamente < 2 mg de proteína purificada por litro. Embora os rendimentos tendam a ser maiores em sistemas que não são de mamíferos, foi tentada a expressão apenas de uma variante truncada de SP-D em sistemas tais como de levedura ou bactérias que têm a desvantagem de não produzir a forma glicosilada da proteína ou de não produzir a proteína com um padrão de glicosilação humano (Salgado D, et al., Front Immunol (2014) 5:623, doi: 10.3389/fimmu.2014.00623). Além disso, não foi possível até agora controlar a variabilidade nos estados de oligomerização observados com a SP-D humana recombinante e natural. A não ser que o sistema de expressão possa produzir de forma reproduzível a rhSP-D com níveis constantemente estáveis dos estados de multimerização de ordem superior observados na SP-D natural, há um potencial de eficácia reduzida destas preparações.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0008] Algumas modalidades dos métodos e composições fornecidos aqui incluem um método para produção de uma composição de polipeptídeos da proteína surfactante D (SP-D) humana que compreende: (a) a introdução de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo da SP-D em uma célula humana; (b) a cultura da célula sob condições nas quais o polipeptídeo da SP-D é expresso; e (c) o isolamento do polipeptídeo da SP-D expresso da célula.

[0009] Em algumas modalidades, a célula é derivada de uma célula de leucemia mieloide humana. Em algumas modalidades, a célula é selecionada do grupo que consiste de NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 e NM-F9. Em algumas modalidades, a célula é uma célula NM-H9D8.

[0010] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica uma sequência líder do polipeptídeo da SP-D do tipo selvagem.

[0011] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO:03.

[0012] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO:02.

[0013] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:05.

[0014] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:04.

[0015] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica uma sequência líder do polipeptídeo do receptor de células T (TCR) do tipo selvagem.

[0016] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO:08.

[0017] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO:07.

[0018] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:10.

[0019] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:09.

[0020] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da SP-D compreende um resíduo em uma posição polimórfica, em que o resíduo é selecionado do grupo que consiste de Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290 e Ala 286/306. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da SP-D compreende Met11/31. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da SP-D compreende Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290 e Ala 286/306.

[0021] Algumas modalidades também incluem o isolamento de uma população dos polipeptídeos da SP-D expressos, cada polipeptídeo da SP-D expresso compreendendo um carboidrato do tipo complexo ligado em um sítio de N-glicosilação, em que a população tem um padrão de glicosilação que compreende as características a seguir: (i) pelo menos 70% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma fucose central; (ii) pelo menos

10% dos carboidratos do tipo complexo incluem pelo menos um resíduo de ácido siálico; (iii) pelo menos 50% dos carboidratos do tipo complexo incluem pelo menos uma estrutura de carboidrato biantenária; (iv) pelo menos 10% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma N-acetilglicosamina de bissecção; (v) menos de 10% dos carboidratos são estruturas do tipo alto teor de manose; e (vi) uma quantidade detectável de resíduos de ácido siálico acoplados a α2,6.

[0022] Em algumas modalidades, a população tem um padrão de glicosilação que compreende uma ou mais das características a seguir: (i) pelo menos 20% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma N-acetilglicosamina de bissecção; e (ii) pelo menos 85% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma fucose central.

[0023] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo da dihidrofolato redutase. Em algumas modalidades, a cultura da célula compreende o contato da célula com um antifolato. Em algumas modalidades, a expressão do polipeptídeo da SP-D é aumentada através do aumento da concentração do antifolato. Em algumas modalidades, o antifolato compreende metotrexato.

[0024] Em algumas modalidades, a célula é cultivada em um reator de perfusão.

[0025] Em algumas modalidades, a célula é cultivada em uma cultura contínua.

[0026] Em algumas modalidades, a cultura da célula compreende a manutenção de um meio de cultura que tem pH de 7,2, oxigênio dissolvido a 40% e ou a 20% e temperatura a 37°C. Em algumas modalidades, o oxigênio dissolvido é menor que 35%, preferencialmente 30%.

[0027] Em algumas modalidades, o isolamento do polipeptídeo da SP-D expresso da célula compreende a preparação de um sobrenadante de células partindo de um meio de cultura que contém a célula.

[0028] Algumas modalidades dos métodos e composições fornecidos aqui incluem um vetor de expressão que codifica um polipeptídeo líder, um polipeptídeo da proteína surfactante D (SP-D) humana e uma dihidrofolato redutase.

[0029] Em algumas modalidades, o polipeptídeo líder é uma sequência líder do polipeptídeo da SP-D do tipo selvagem. Em algumas modalidades, o polipeptídeo líder compreende a SEQ ID NO:05.

[0030] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:04.

[0031] Em algumas modalidades, o polipeptídeo líder é uma sequência líder do polipeptídeo do receptor de células T (TCR) do tipo selvagem. Em algumas modalidades, o polipeptídeo líder compreende a SEQ ID NO:10.

[0032] Em algumas modalidades, o vetor inclui um polinucleotídeo que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs:02 e 07.

[0033] Em algumas modalidades, o vetor inclui codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs:04 e 09.

[0034] Algumas modalidades dos métodos e composições fornecidos aqui incluem uma célula humana imortalizada que compreende o vetor de

expressão de qualquer uma das modalidades anteriores relacionadas a um vetor de expressão. Em algumas modalidades, a célula é derivada de uma célula de leucemia mieloide humana. Em algumas modalidades, a célula é selecionada do grupo que consiste de NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 e NM-F9. Em algumas modalidades, a célula é uma célula NM-H9D8. Em algumas modalidades, a célula é uma célula NM-H9D8(8B11).

[0035] Algumas modalidades dos métodos e composições fornecidos aqui incluem uma célula humana imortalizada que compreende um vetor de expressão que codifica um polipeptídeo da proteína surfactante D (SP-D) humana, em que a célula é derivada de uma célula de leucemia mieloide humana.

[0036] Em algumas modalidades, o vetor de expressão codifica também um polipeptídeo líder. Em algumas modalidades, o polipeptídeo líder é uma sequência líder do polipeptídeo da SP-D do tipo selvagem. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:05. Em algumas modalidades, o polipeptídeo líder é uma sequência líder do polipeptídeo do receptor de células T (TCR) do tipo selvagem. Em algumas modalidades, o polipeptídeo líder compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:10.

[0037] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da proteína surfactante D (SP-D) humana compreende a sequência de aminoácidos das posições 22 a 376 da SEQ ID NO:04.

[0038] Em algumas modalidades, o vetor de expressão codifica também uma dihidrofolato redutase.

[0039] Em algumas modalidades, a célula é selecionada do grupo que consiste de NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 e NM-F9. Em algumas

modalidades, a célula é uma célula NM-H9D8. Em algumas modalidades, a célula é uma célula NM-H9D8(8B11).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0040] A FIG. 1 é um esquema que descreve a formação de um trímero de SP-D e características estruturais do trímero de SP-D.

[0041] A FIG. 2A é um mapa do vetor de expressão pHBG1Ddhfr_WT_SP-D (7228 pb) que contém um polinucleotídeo que codifica uma SP-D humana, uma sequência líder do receptor de células T (TCR) humana e dihidrofolato redutase (DHFR).

[0042] A FIG. 2B é um mapa do vetor de expressão pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D (7231 pb) que contém um polinucleotídeo que codifica uma SP-D humana, uma sequência líder do receptor de células T (TCR) humana e dihidrofolato redutase (DHFR).

[0043] A FIG. 2C é um mapa do vetor de expressão pHBG1Ddhfr_SFTPD (7228 pb) que contém um polinucleotídeo que codifica uma SP-D humana, uma sequência líder do receptor de células T (TCR) humana e dihidrofolato redutase (DHFR).

[0044] A FIG. 3 é um gráfico de barras que mostra as taxas de produção específicas para conjuntos cultivados com várias concentrações de metotrexato (MTX). Os conjuntos de linhagens de células incluíam ‘rhSP-D-F9’, ‘rhSP-D-Fuc(-)’, ‘rhSP-D-H9D8’ que eram células F9, células H9D8-E6Q12 e células H9D8 cada uma transfectada com o vetor de expressão da SP-D humana contendo a sequência líder da SP-D humana, respectivamente; e ‘rhSP-D-TCR-H9D8’ que era células H9D8 transfectadas com o vetor de expressão da SP-D humana que contém a sequência líder do

TCR humana.

[0045] A FIG. 4 é uma série de gráficos que mostra alterações nas condições de cultura ao longo do tempo de um processo no biorreator para o clone H9D8-P1315-2A5 que incluem: concentração de células viáveis (painel A); concentração de glicose (painel B); viabilidade celular (painel C); concentração de lactato (painel D).

[0046] A FIG. 5 é uma fotografia de um gel de SDS-PAGE corado com Coomassie blue, que mostra proteínas em vários estágios de purificação da rhSP-D partindo das células de expressão.

[0047] A FIG. 6 é um gráfico de linhas para um ensaio de agregação bacteriana no qual as bactérias foram tratadas com várias concentrações de rhSP-D purificada do clone H9D8-P1315-2A5 para mostrar como o tratamento com a SP-D afetava a agregação bacteriana ao longo do tempo.

[0048] A FIG. 7 é um gráfico de linhas que mostra a atividade de inibição de concentrações crescentes de rhSP-D purificada do clone H9D8-P1315-2A5 em um ensaio da via do receptor TLR4.

[0049] A FIG. 8 é um cromatograma de N-glicanas com marcação fluorescente liberadas da rhSP-D purificada de fontes diferentes e submetidas à cromatografia de ultra desempenho com interação hidrofílica com detecção de fluorescência.

[0050] A FIG. 9 é um cromatograma de O-glicanas com marcação fluorescente liberadas da SP-D de fontes diferentes e submetidas à cromatografia de ultra desempenho com interação hidrofílica com detecção de fluorescência.

[0051] A FIG. 10 é um cromatograma de N-glicanas com marcação

fluorescente liberadas da SP-D produzida em CHO (painéis A e B) e NM-H9D8(8B11) (painéis C e D), sem (painéis A e C) e com (painéis B e D) tratamento com neuraminidase S e submetidas à cromatografia de ultra desempenho com interação hidrofílica com detecção de fluorescência.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0052] A proteína surfactante D (SP-D) é uma lectina do tipo (dependente de Ca^{2+}) que compreende quatro domínios: uma região N-terminal ligada à cisteína necessária para a formação de ligações dissulfeto intermoleculares, uma região de colágeno em tripla-hélice, um peptídeo com α-helical-coiled-coil trimerizing neck e um domínio de reconhecimento de carboidratos dependente de cálcio C-terminal (CRD) (Crouch E. et al. (1994) J Biol Chem, 269:17311-9). Os monômeros formam trímeros através do dobramento da região de colágeno em hélices triplas e a configuração de um feixe de molas enroladas de α-hélices na região do "pescoço" (FIG. 1). Estes trímeros são estabilizados por duas ligações dissulfeto no domínio N-terminal rico em cisteína. O trímero de SP-D tem um peso molecular total de 129 kDa que compreende três cadeias polipeptídicas de 43 kDa idênticas. Os trímeros de SP-D podem formar estados de oligomerização de ordem superior que variam em relação ao tamanho e à conformação. Estados de oligomerização de ordem superior podem ser importantes para a função da SP-D (Hakansson K, et al., Protein Sci (2000) 9:1607–17; Crouch E. Respir Res (2000) 1:93–108; Crouch E. et al. (2006) J Biol Chem, 281:18008-14). A associação dos trímeros de SP-D em estados de oligomerização de ordem superior é sensível aos fatores e às condições ambientais durante a purificação e o armazenamento. A via e o tipo de interações envolvidas na formação de oligômeros de SP-D maiores não foram elucidados anteriormente. Algumas modalidades dos métodos e composições fornecidos aqui referem-se à preparação e à purificação de certas formas de oligômeros

de SP-D.

[0053] A SP-D humana produzida nas células de ovário de hamster chinês (CHO) foi caracterizada por microscopia de força atômica (AFM) e eletroforese. Uma solução de rhSP-D pode incluir uma população diversa de formas oligoméricas de SP-D diferentes que incluem: trímeros, hexâmeros, dodecâmeros e espécies oligoméricas superiores identificadas como “fuzzy balls” (bolas difusas) que compreendem mais de 4 trímeros. Foi demonstrado em algumas modalidades da presente invenção que a produção de SP-D que é descrita aqui, especialmente utilizando os vetores e/ou as células hospedeiras e/ou os métodos de purificação descritos aqui, resulta em um rendimento maior da proteína SP-D e uma quantidade maior de dodecâmeros de SP-D e uma quantidade menor de espécies oligoméricas superiores comparada com a produção de SP-D em células CHO. Foi demonstrado em algumas modalidades da presente invenção que a produção de SP-D que é descrita aqui, especialmente utilizando os vetores e/ou as células hospedeiras e/ou os métodos de purificação descritos aqui, resulta em um rendimento maior da proteína SP-D e uma quantidade relativa maior de dodecâmeros de SP-D e uma quantidade relativa menor de espécies oligoméricas superiores comparada com a produção de rhSP-D em células CHO. Por exemplo, o rendimento poderia ser aumentado em até aproximadamente 5-15 vezes, a quantidade relativa de dodecâmeros de SP-D na composição de rhSP-D purificada que é medida através de SEC HPLC poderia ser aumentada em aproximadamente 30% ou mais e a quantidade relativa de espécies oligoméricas superiores poderia ser reduzida em aproximadamente 30% ou mais. Uma purificação do sobrenadante da cultura de células *via* colunas de Q-Sepharose e Superdex 75 não altera a proporção de dodecâmeros para espécies oligoméricas superiores (tais como “fuzzy balls”). Portanto, as quantidades relativas dos dodecâmeros e das espécies oligoméricas superiores na composição de SP-D purificada

representam aquelas no sobrenadante de cultura de células.

Certos vetores e células de expressão

[0054] Em um aspecto, é fornecido um vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SP-D humana. Algumas modalidades incluem a preparação de vetores de expressão que compreendem um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SP-D humana. Os polimorfismos no polipeptídeo da SP-D humana podem incluir: resíduo 11, ATG (Met) -> ACG (Thr); resíduo 25, AGT (Ser) -> AGC (Ser); resíduo 160, ACA (Thr) -> GCA (Ala); resíduo 270, TCT (Ser) -> ACT (Thr); e resíduo 286, GCT (Ala) -> GCC (Ala) em que as posições referem-se a uma posição no polipeptídeo da SP-D maduro. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da SP-D compreende certo resíduo em uma posição polimórfica em que o resíduo é selecionado de Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290 e Ala 286/306 em que as posições do resíduo referem-se a uma posição no polipeptídeo da SP-D maduro e uma posição no polipeptídeo da SP-D com seu peptídeo líder. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da SP-D compreende Met11/31. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da SP-D compreende Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290 e Ala 286/306. Exemplos destas sequências são fornecidos na TABELA 1. Em algumas modalidades, a SP-D é codificada por um ácido nucleico que tem pelo menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, 99% e 100% ou qualquer faixa entre qualquer um dos números anteriores, de identidade com um polinucleotídeo selecionado da SEQ ID NO:02 e da SEQ ID NO:07 ao longo de todo o comprimento do polinucleotídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da SP-D tem pelo menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, 99% e 100% ou qualquer faixa entre qualquer um dos números anteriores, de homologia com um polipeptídeo selecionado da SEQ ID NO:04 e da SEQ ID NO:09 ao longo de todo o comprimento do polinucleotídeo. Em algumas

modalidades, o polipeptídeo da SP-D compreende a sequência de aminoácidos das posições 22 a 376 da SEQ ID NO:04 ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% idêntica à mesma ao longo de todo o comprimento da sequência de referência.

[0055] Em algumas modalidades, o vetor de expressão codifica um peptídeo líder localizado a 5′ da sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo da SP-D. Em algumas modalidades a sequência líder é uma sequência líder do receptor de células T (TCR) do tipo selvagem ou uma sequência líder da SP-D do tipo selvagem. Exemplos destas sequências são fornecidos na TABELA 1. Em algumas modalidades, o peptídeo líder é codificado por um ácido nucleico que tem pelo menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, 99% e 100% ou qualquer faixa entre qualquer um dos números anteriores, de identidade com um polinucleotídeo selecionado da SEQ ID NO:03 e da SEQ ID NO:08 ao longo de todo o comprimento do polinucleotídeo. Em algumas modalidades, o peptídeo líder tem pelo menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, 99% e 100% ou qualquer faixa entre qualquer um dos números anteriores, de homologia com um polipeptídeo selecionado da SEQ ID NO:05 e da SEQ ID NO:10 ao longo de todo o comprimento do polinucleotídeo.

[0056] Em algumas modalidades, o vetor de expressão inclui um gene de seleção útil para selecionar células de mamíferos que têm o gene de seleção. Exemplos destes genes incluem aqueles que codificam proteínas tal como dihidrofolato redutase que fornece resistência contra compostos de antifolato, tal como o metotrexato.

[0057] Em um aspecto, é fornecida uma célula que compreende um ou mais dos vetores de expressão que compreendem um polinucleotídeo que

codifica um polipeptídeo da SP-D humana. Algumas modalidades incluem células que compreendem um ou mais dos vetores de expressão descritos aqui. Exemplos destas células incluem células de mamíferos que podem modificar um polipeptídeo da SP-D expresso com um padrão de glicosilação que aumenta a atividade e/ou a estabilidade do polipeptídeo da SP-D expresso. Tais células incluem células sanguíneas humanas imortalizadas, tais como células derivadas de uma leucemia mieloide humana. Exemplos destas células incluem NM-H9D8 (DSM ACC 2806); NM-H9D8-E6Q12 (DSM ACC 2856); e NM-F9 (DSM ACC 2606) que foram depositadas sob um código de ACC determinado junto à "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" em Braunschweig (Alemanha). NM-F9 foi depositada por Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlim (Alemanha) em 14 de agosto de 2003, NM-H9D8 foi depositada por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlim (Alemanha) em 15 de setembro de 2006 e NM-H9D8-E6Q12 foi depositada por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlim (Alemanha) em 8 de agosto de 2007. Mais exemplos de linhagens de células úteis podem ser encontrados na Patente U.S. No. 9.051.356, que é incorporada aqui como referência em sua totalidade. Em algumas modalidades, a célula que compreende um ou mais dos vetores de expressão que compreendem um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SP-D humana é uma célula da linhagem de células NM-H9D8.

Certos métodos para produção de SP-D humana

[0058] Em um aspecto, é fornecido um método de produção de uma composição de polipeptídeos da SP-D humana. Algumas modalidades incluem métodos de produção de uma composição de polipeptídeos da SP-D humana através (a) da introdução de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SP-D humana em uma célula de mamífero; (b) da cultura da

célula sob condições nas quais o polipeptídeo da SP-D é expresso; e (c) do isolamento do polipeptídeo da SP-D expresso da célula. Os métodos para a introdução de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo da SP-D em uma célula de mamífero são bem conhecidos na técnica e incluem eletroporação, transfecção utilizando lipídeos catiônicos, fosfato de cálcio, DEAE-dextran ou infecção com partículas virais tais como adenovírus ou retrovírus ou uma combinação dos mesmos. Alguns destes métodos incluem a linearização de um vetor de expressão fornecido aqui e a transfecção do vetor linearizado para dentro de uma célula. Em algumas modalidades, a célula e/ou o vetor de expressão que é descrito aqui é utilizado no método de produção de uma composição de polipeptídeos da SP-D humana. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da SP-D é secretado pela célula de mamífero. Nestas modalidades, o polipeptídeo da SP-D expresso pode ser isolado do meio de cultura de células utilizado para a cultura da célula. Em algumas modalidades, o isolamento do polipeptídeo da SP-D expresso é realizado como descrito aqui.

[0059] Em algumas modalidades, a célula é derivada de uma célula de leucemia mieloide humana, tal como uma linhagem de células NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 e NM-F9.

[0060] Algumas modalidades incluem métodos de seleção de células que compreendem um vetor de expressão. Algumas destas modalidades podem incluir a cultura de uma célula com um antifolato, tal como metotrexato. Os transfectantes podem ser isolados através de métodos tal como a subclonagem e as células que expressam SP-D podem ser facilmente identificadas através de métodos bem conhecidos na técnica, tais como métodos imunológicos utilizando anticorpos contra SP-D em combinação com ELISA, Western blots e dot-blots.

[0061] Em algumas modalidades, as células transfectadas que expressam SP-D em concentrações aumentadas podem ser selecionadas através do aumento da concentração de um antifolato, tal como metotrexato em um meio de cultura.

[0062] Algumas modalidades incluem a cultura de células que expressam SP-D em um biorreator de perfusão. Algumas destas modalidades podem incluir a cultura de células através de fermentação contínua. No modo de perfusão, o meio fresco pode ser fornecido continuamente e o sobrenadante livre de células pode ser tirado do biorreator enquanto que as células são retidas no fermentador. As células podem ser retidas através da aplicação de técnicas diferentes. Por exemplo, pode ser utilizada filtração, centrifugação ou sedimentação. Exemplos de métodos podem ser encontrados na Patente U.S. No. 9.359.427, que é incorporada aqui como referência em sua totalidade.

Certos métodos para isolamento de SP-D de um meio de cultura

[0063] Em um aspecto, é fornecido um método de isolamento de polipeptídeos da SP-D humana. Algumas modalidades incluem o isolamento de polipeptídeos da SP-D expressos de um meio de cultura. Em uma modalidade, o isolamento ocorre através da utilização de cromatografia. Exemplos de métodos cromatográficos incluem cromatografia de afinidade utilizando materiais de afinidade tais como, Proteína A, Proteína G, anticorpos anti-SP-D, cromatografia com lectina, anticorpos contra certa marcação (tag) introduzida em um polipeptídeo da SP-D tal como HIS-tag ou myc-tag ou antígeno ou através de outros meios de cromatografia tais como, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de modo misto ou cromatografia de exclusão de tamanho.

[0064] Em algumas modalidades, um sobrenadante de células é

preparado partindo de um meio de cultura que compreende uma célula que expressa SP-D. O sobrenadante pode ser esterilizado por filtração. Em algumas modalidades, um sobrenadante de células que compreende um polipeptídeo da SP-D pode ser aplicado em coluna e o eluato resultante pode ser aplicado em uma segunda coluna. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da SP-D é isolado utilizando cromatografia de troca aniônica seguida por cromatografia de afinidade. Em algumas modalidades, uma matriz forte para cromatografia de troca aniônica tal como Q-Sepharose é utilizada para cromatografia de troca aniônica. Em algumas modalidades, uma matriz de cromatografia de filtração em gel tal como a matriz Superdex 75 é utilizada para cromatografia de afinidade. Em algumas modalidades, o sobrenadante de células é aplicado em uma coluna de Q-Sepharose com um tampão de equilíbrio e de corrida compreendendo 20 mM de TRIS, 50 mM de NaCl, pH 7,4. A SP-D pode ser eluída da coluna utilizando um tampão de eluição que compreende 20 mM de Tris, 600 mM de NaCl, pH 7,4. Em algumas destas modalidades, o eluato da coluna de Q-Sepharose compreende aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,8 mg/mL de SP-D.

[0065] Algumas modalidades incluem a aplicação da fração do eluato da coluna de Q-Sepharose que compreende SP-D em uma segunda coluna, tal como a coluna Superdex75. Em algumas modalidades, o eluato da coluna de Q-Sepharose é diluído com o mesmo volume de um tampão Tris a 20 mM pH 7,4 contendo 10 mM de $CaCl_2$ e aplicado em uma coluna de Superdex75 com um tampão de equilíbrio e corrida compreendendo 20 mM de Tris, 300 mM de NaCl, 5 mM de $CaCl_2$, pH 7,4. A SP-D pode ser eluída da coluna utilizando um tampão de eluição que compreende 20 mM de Tris, 10 mM de EDTA 300 mM de NaCl, pH 7,4. Em algumas destas modalidades, o eluato compreende aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 mg/mL de SP-D. Em algumas destas modalidades, o

eluato compreende SP-D que tem do que aproximadamente 90% de pureza. Algumas modalidades também incluem a diálise do eluato em um tampão de Histidina a 5 mM que contém 200 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, pH 7,0 antes do armazenamento e da análise.

Modificação pós-tradução da SP-D

[0066] Uma modalidade inclui polipeptídeos da SP-D humana que têm um padrão específico de modificações pós-tradução. Algumas modalidades incluem uma composição que compreende polipeptídeos da SP-D humana que são glicosilados, em particular N-glicosilados. Em algumas modalidades, os polipeptídeos glicosilados da SP-D humana carregam uma estrutura de carboidrato em uma asparagina que corresponde à Asn90 da SEQ ID NO: 4 ou 9. As estruturas de carboidrato em um sítio de N-glicosilação podem compreender uma estrutura central de dois resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) e três resíduos de manose, em que a primeira GlcNAc está ligada ao esqueleto do polipeptídeo, a segunda GlcNAc está ligada à primeira GlcNAc, a primeira manose está ligada à segunda GlcNAc e cada uma da segunda e da terceira manoses está ligada à primeira manose. Unidades monossacarídicas adicionais podem ser ligadas a esta estrutura central. Em algumas modalidades, pelo menos 60%, especialmente pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85% ou em particular pelo menos 90% das estruturas de carboidrato no sítio de N-glicosilação da SP-D na composição são estruturas de carboidrato do tipo complexo. As estruturas de carboidrato do tipo complexo compreendem pelo menos um resíduo de GlcNAc adicional ligado ao segundo ou ao terceiro resíduo de manose, mas não compreendem quaisquer resíduos de manose adicionais.

[0067] Em algumas modalidades, os polipeptídeos da SP-D humana

na composição têm um padrão de glicosilação no sítio de N-glicosilação que compreende uma ou mais das características a seguir:

(i) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam fucose central de pelo menos 70% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição; e/ou

(ii) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam pelo menos um resíduo de ácido siálico de pelo menos 10% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição; e/ou

(iii) uma quantidade relativa de pelo menos estruturas de carboidrato biantenárias de pelo menos 50% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição.

[0068] Em algumas modalidades, a quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam fucose central é pelo menos 75% ou pelo menos 80% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição. Um resíduo de fucose central é ligado ao primeiro resíduo de GlcNAc da estrutura central. Uma “quantidade relativa de estruturas de carboidrato” de acordo com a invenção refere-se a uma porcentagem específica ou uma faixa de porcentagens das estruturas de carboidrato ligadas à SP-D em uma composição. Em particular, a quantidade relativa de estruturas de carboidrato refere-se a uma porcentagem específica ou uma faixa de porcentagens de todas as estruturas de carboidrato ligadas às cadeias polipeptídicas da SP-D em uma composição. Em algumas modalidades, são consideradas somente as estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-

glicosilação da SP-D.

[0069] Em algumas modalidades, a quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam pelo menos um resíduo de ácido siálico é pelo menos 15%, pelo menos 20% ou pelo menos 25% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição. A quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam pelo menos um resíduo de ácido siálico pode estar na faixa de 10% a 80%, de 15% a 75% ou de 20% a 70%. Em algumas modalidades, o padrão de glicosilação dos polipeptídeos da SP-D humana na composição compreende uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam dois resíduos de ácido siálico de pelo menos 0,5%, por exemplo, pelo menos 1% ou pelo menos 2%, da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição. A quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam pelo menos dois resíduos de ácido siálico pode estar na faixa de 0,5% a 30%, de 1% a 20% ou de 1,5% a 15%. O termo “ácido siálico” refere-se em particular a quaisquer derivados substituídos por N- ou O- do ácido neuramínico. Pode se referir tanto ao ácido 5-N-acetilneuramínico quanto ao ácido 5-N-glicolilneuramínico, mas preferencialmente refere-se apenas ao ácido 5-N-acetilneuramínico. O ácido siálico, em particular o ácido 5-N-acetilneuramínico é preferencialmente ligado a uma cadeia de carboidrato através de uma ligação 2,3 ou 2,6. Preferencialmente, no padrão de glicosilação da SP-D descrito aqui estão presentes os ácidos siálicos acoplados a 2,3 bem como a 2,6.

[0070] Em algumas modalidades, a quantidade relativa de pelo menos estruturas de carboidrato biantenárias é pelo menos 60% ou pelo menos 70% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição. Em

algumas modalidades, o padrão de glicosilação dos polipeptídeos da SP-D humana na composição compreende uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato pelo menos triantenárias de pelo menos 2%, por exemplo, pelo menos 3% ou pelo menos 4%, da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição. Antenas são ramificações ou uma ou mais unidades monossacarídicas que são ligadas aos resíduos de manose terminais (isto é, o segundo ou o terceiro) da estrutura central. Nas estruturas de carboidrato do tipo complexo, uma antena compreende geralmente um resíduo de GlcNAc, que pode carregar adicionalmente um resíduo de galactose e opcionalmente um resíduo de ácido siálico. Uma estrutura de carboidrato do tipo complexo binatenária compreende duas antenas, isto é, a cada um dos dois resíduos de manose terminais da estrutura central é ligado pelo menos um resíduo de GlcNAc. Em uma estrutura de carboidrato do tipo complexo triantenária, uma manose terminal carrega duas antenas e a outra manose terminal carrega uma antena. Em uma estrutura de carboidrato do tipo complexo tetra-antenária, ambas as manoses terminais carregam duas antenas. O termo “pelo menos biantenária” inclui estruturas de carboidrato bi- tri- e tetra-antenárias, enquanto que o termo “pelo menos triantenária” inclui estruturas de carboidrato tri- e tetra-antenárias.

[0071] O número de A na glicosilação é um número de referência para a antenaridade das estruturas de glicana em um padrão de glicosilação. O número de A é calculado através da multiplicação da quantidade relativa de uma antenaridade específica com seu número de antenas e da adição dos números obtidos para cada antenaridade. Em particular, a quantidade relativa de glicanas monoantenárias é multiplicada por 1, a quantidade relativa de glicanas biantenárias é multiplicada por 2, a quantidade relativa de glicanas triantenárias é multiplicada por 3 e a quantidade relativa de glicanas tetra-antenárias é multiplicada por 4. A

soma destes números resulta no número de A. Em algumas modalidades, os polipeptídeos da SP-D humana na composição têm um padrão de glicosilação no sítio de N-glicosilação que tem um número de A de pelo menos 185, por exemplo, pelo menos 190.

[0072] Em algumas modalidades, os polipeptídeos da SP-D humana na composição têm um padrão de glicosilação no sítio de N-glicosilação que compreende uma ou mais das características a seguir:

(i) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam N-acetilglicosamina de bissecção (bisGlcNAc) de pelo menos 2%, por exemplo, pelo menos 5% ou pelo menos 8%, da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição; e/ou

(ii) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam pelo menos um resíduo de galactose de pelo menos 40%, por exemplo, pelo menos 45% ou pelo menos 50%, da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição; e/ou

(iii) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam pelo menos dois resíduos de galactose de pelo menos 15%, por exemplo, pelo menos 20% ou pelo menos 25%, da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição; e/ou

(iv) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam um resíduo de N-acetilgalactose de 30% ou menos, por exemplo, 20% ou menos ou 15% ou menos, da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na

composição; e/ou

(v) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato do tipo híbrido de 30% ou menos, por exemplo, 25% ou menos ou 20% ou menos, da quantidade total de estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição; e/ou

(vi) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato do tipo alto teor de manose de 25% ou menos, por exemplo, 20% ou menos ou 15% ou menos, da quantidade total de estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição.

[0073] Um resíduo de N-acetilglicosamina de bissecção ou bisGlcNAc é um resíduo de GlcNAc ligado ao resíduo de manose central (isto é, o primeiro) da estrutura central da estrutura de carboidrato. Em algumas modalidades, a quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam bisGlcNAc está na faixa de 2% a 50%, por exemplo, de 5% a 40% ou de 8% a 35% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição. Uma "estrutura de carboidrato do tipo alto teor de manose" compreende somente resíduos de manose ligados às manoses terminais da estrutura central. Uma "estrutura de carboidrato do tipo híbrido" compreende resíduos de manose ligados a uma manose terminal da estrutura central e uma antena como é descrito para estruturas de carboidrato do tipo complexo ligada a outra manose terminal da estrutura central.

[0074] Em algumas modalidades, uma população de polipeptídeos da SP-D que têm um carboidrato do tipo complexo ligado no sítio de N-glicosilação da SP-D, pode ter um padrão de glicosilação que compreende uma ou mais das características a seguir:

(i) pelo menos 20% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma N-acetilglicosamina de bissecção;

(ii) pelo menos 25% dos carboidratos do tipo complexo incluem pelo menos um resíduo de ácido siálico;

(iii) pelo menos 85% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma estrutura de carboidrato biantenária;

(iv) pelo menos 0,5% dos carboidratos do tipo complexo incluem pelo menos uma GalNAc;

(v) menos de 2% dos carboidratos do tipo complexo incluem 3 galactoses; e

(vi) menos de 2% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma estrutura de carboidrato triantenária.

[0075] Em algumas modalidades, uma população de polipeptídeos da SP-D que têm um carboidrato do tipo complexo ligado no sítio de N-glicosilação da SP-D pode ter um padrão de glicosilação que inclui qualquer uma das características a seguir. Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 38%, 40%, 45% ou uma porcentagem em uma faixa entre qualquer uma das porcentagens anteriores dos carboidratos do tipo complexo das estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D da população inclui uma N-acetilglicosamina de bissecção. Em algumas modalidades, pelo menos 75%, 80%, 82%, 85%, 90%, 95% ou uma porcentagem em uma faixa entre qualquer uma das porcentagens anteriores dos carboidratos do tipo complexo das estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D da população inclui uma estrutura de carboidrato biantenária. Em algumas modalidades, pelo

menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 15% ou uma porcentagem em uma faixa entre qualquer uma das porcentagens anteriores dos carboidratos do tipo complexo das estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D da população inclui pelo menos uma GalNAc. Em algumas modalidades, menos de 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou uma porcentagem em uma faixa entre qualquer uma das porcentagens anteriores dos carboidratos do tipo complexo das estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D da população inclui 3 resíduos de galactose. Em algumas modalidades, menos de 15%, 13%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou uma porcentagem em uma faixa entre qualquer uma das porcentagens anteriores dos carboidratos do tipo complexo das estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D da população inclui uma estrutura de carboidrato triantenária.

[0076] Em algumas modalidades, os polipeptídeos da SP-D humana na composição têm um padrão de glicosilação no sítio de N-glicosilação que compreende as características a seguir:

(i) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam GlcNAc de bissecção de pelo menos 10% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição;

(ii) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato do tipo alto teor de manose 10% ou menos, da quantidade total de estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição; e

(iii) uma quantidade detectável de estruturas de carboidrato do tipo complexo que carregam um resíduo de ácido siálico acoplado a α2,6.

[0077] Em modalidades adicionais, os polipeptídeos da SP-D

humana na composição têm um padrão de glicosilação no sítio de N-glicosilação que compreende as características a seguir:

(i) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam fucose central de pelo menos 85% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição;

(ii) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato que carregam GlcNAc de bissecção de pelo menos 20% da quantidade total de estruturas de carboidrato do tipo complexo ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição;

(iii) uma quantidade relativa de estruturas de carboidrato do tipo alto teor de manose 10% ou menos, da quantidade total de estruturas de carboidrato ligadas ao sítio de N-glicosilação da SP-D na composição; e

(iv) uma quantidade detectável de estruturas de carboidrato do tipo complexo que carregam um resíduo de ácido siálico acoplado a α2,6.

Identificação de espécies oligoméricas da SP-D

[0078] Em um aspecto, é fornecido um método de identificação de espécies oligoméricas de polipeptídeos da SP-D humana. Algumas modalidades incluem métodos de identificação de espécies oligoméricas da SP-D, tais como trímeros, dodecâmeros e estruturas oligoméricas que contêm mais de 4 trímeros. Tais métodos podem ser úteis para identificar condições e componentes para preparação de formulações de SP-D que têm certa quantidade de certa forma oligomérica, tal como predominantemente uma forma dodecamérica. Em algumas modalidades, os métodos para identificação de espécies oligoméricas de polipeptídeos da SP-D humana

podem incluir a realização de uma análise de fracionamento de fluxo em campo de fluxo assimétrico com espalhamento de luz em multiângulos (AF4-MALS) em uma amostra de SP-D. Em algumas modalidades, os métodos podem incluir a realização de uma HPLC com cromatografia de exclusão de tamanho (SEC HPLC) para a identificação de espécies oligoméricas de polipeptídeos da SP-D humana. Exemplos de condições para a SEC HPLC incluem: UHPLC: Dionex UltiMate 3000; coluna: TSKgel G6000PWXL, fase de metacrilato hidroxilado, L × I.D. 30 cm × 7,8 mm, tamanho de partícula de 13 µm (# 0008024,Tosoh); temperatura do forno da coluna: 30 °C; temperatura do amostrador: 4 °C; limite de pressão superior: 31 bar; detecção de UV: 280 nm; eluente: TBS, 10 mM de EDTA, pH 7,4 (de 10xTBS Roti-Stock #1060.1, Carl Roth, EDTA # 8040.2, Carl Roth); vazão: 0,25 mL/min; injeção de amostras: 20 µg ou 30 µL de volume fixo; limites de integração: HOO 25,0 - 30,0 min, dodecâmero 30,0 - 34,5 min, LOO 34,5 - 44,0 min.

[0079] Em algumas modalidades, os métodos de identificação de espécies oligoméricas de SP-D podem incluir a realização de microscopia de força atômica (AFM) em uma amostra de SP-D, a identificação e/ou a quantificação de espécies oligoméricas de SP-D nas imagens de AFM. Em algumas destas modalidades, os métodos podem incluir a resolução de uma mistura de espécies oligoméricas de SP-D por tamanho. Alguns destes métodos incluem o contato de uma amostra de SP-D com um detergente aniônico, tal como de dodecil sulfato de sódio (SDS); o contato da amostra com um reagente de reticulação, tal como 1% de glutardialdeído (GA); e a resolução por tamanho das espécies de SP-D, tal como através da realização de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Em algumas modalidades, a amostra de SP-D é colocada em contato com o detergente aniônico antes do contato da amostra com o reagente de reticulação. Em outras modalidades, a amostra de SP-D é colocada em contato com o reagente de

reticulação antes do contato da amostra com o detergente aniônico. Em algumas modalidades, a amostra é colocada em contato com uma solução de aproximadamente 1% de GA. Em algumas modalidades, a amostra é colocada em contato com um reagente de reticulação durante um período entre aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos. Em algumas modalidades, a PAGE ocorre na presença de dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS). Em outras modalidades, a PAGE é PAGE nativa. Em algumas modalidades, a PAGE compreende um gel em gradiente. Em algumas modalidades, o gel em gradiente é um gel e tris-glicina com gradiente de 4 - 15 % de poliacrilamida. Em algumas modalidades, a PAGE é realizada na ausência de um agente redutor. Em algumas modalidades, o agente redutor compreende β-mercaptoetanol. Algumas modalidades também incluem a identificação das espécies de SP-D, tal como a realização de um Western blot.

Certas composições que compreendem SP-D

[0080] Algumas modalidades incluem soluções que compreendem uma população de polipeptídeos de rhSP-D que tem certa distribuição de formas oligoméricas da SP-D. Em algumas modalidades, a solução pode incluir formas oligoméricas da SP-D em que mais do que aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 70% ou qualquer faixa entre os números anteriores, das formas oligoméricas compreendem dodecâmeros da SP-D. Em algumas modalidades, uma distribuição das formas oligoméricas da SP-D pode ser medida através dos métodos fornecidos aqui, tal como uma análise de fracionamento de fluxo em campo de fluxo assimétrico com espalhamento de luz em multiângulos (AF4-MALS). Em algumas modalidades, a solução de polipeptídeos de rhSP-D é preparada através de um método fornecido aqui. Em algumas modalidades, o método de produção de uma composição de polipeptídeos da SP-D humana que é

descrito aqui produz uma solução que compreende uma população de polipeptídeos de rhSP-D que é descrita aqui. Em algumas modalidades, o método de isolamento de polipeptídeos da SP-D humana que é descrito aqui produz uma solução que compreende uma população de polipeptídeos de rhSP-D que é descrita aqui. Em algumas modalidades do método de produção de uma composição de polipeptídeos da SP-D humana que é descrito aqui, o polipeptídeo da SP-D expresso está predominantemente na forma dodecamérica. Em algumas modalidades do método de isolamento de polipeptídeos da SP-D humana que é descrito aqui, o polipeptídeo da SP-D isolado está predominantemente na forma dodecamérica. “Predominantemente” sob este aspecto pode em particular se referir a uma quantidade relativa de pelo menos 30% de todos os polipeptídeos da SP-D na composição, tal como pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50% ou pelo menos 55% de todos os polipeptídeos da SP-D na composição. Em algumas modalidades, “predominantemente” refere-se a uma quantidade relativa maior que 50% de todos os polipeptídeos da SP-D na composição.

EXEMPLOS

Exemplo 1—Construção de vetores de expressão de SP-D

[0081] Dois vetores de expressão foram desenvolvidos para expressão de SP-D humana em células humanas. Um vetor incluía uma sequência líder/sinal de SP-D humana do tipo selvagem; o outro vetor incluía uma sequência líder/sinal do receptor de células T (TCR) humana. A sequência líder de TCR foi selecionada para um dos vetores de expressão porque as proteínas seriam expressas nas células de leucemia mieloide humana que se supunha que secretassem proteínas com uma sequência líder de TCR com uma eficiência alta.

[0082] Os polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo da SP-D

humana e que incluem a sequência líder/sinal de SP-D humana do tipo selvagem ou a sequência líder/sinal do receptor de células T (TCR) humana foram sintetizados por GENEART (ThermoFisher Scientific). Cada polinucleotídeo incluía sítios de restrição de Xba I (extremidade a 5') e Hind III (extremidade a 3') com a finalidade de clonagem e uma sequência consenso de Kozak. Cada polinucleotídeo foi cortado de um vetor de fornecimento da GENEART (ThermoFisher Scientific) pela restrição com Hind III/Xba I e ligado dentro de um vetor de clonagem pHBG1Ddhfr (Glycotope GmbH, Alemanha) para a obtenção dos vetores de expressão: pHBG1Ddhfr_WT_SP-D (7228 pb) e pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D (7231 pb). *Ver* a FIG. 2A e a FIG. 2B. Um exemplo adicional de vetor de expressão é mostrado na FIG. 2C. Os vetores de expressão foram sequenciados e mapeados com restrição para confirmar a sequência correta A TABELA 1 lista certas sequências.

TABELA 1

SEQ ID NO.	**Sequência**
SEQ ID NO:01 Polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SP-D com uma sequência líder de SP-D endógena, sequência de Kozak (sublinhada) e sítios	aagcttgccaccatgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacaca gcctctgggctatctggaagccgagatgaagacctacagccaccggaccat gcccagcgcctgtaccctcgtgatgtgcagcagcgtggaaagcggcctgcc tggcagagatggcagggatggaagagagggccccagaggcgagaagggc gatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgcctggacaggct ggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggccct aagggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccagga cctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctca gggaaagccaggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtggg agcacctggcatgcagggaagtgccggcgctagaggactggctggcccaa aaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcgtgcccggaaatactgg

SEQ ID NO.	**Sequência**
de restrição de Xba I (extremidade a 5') e Hind III (extremidade a 3').	cgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccaggcgcaag aggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggc gctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggt ggaagctctccagggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagta caagaaggtggaactgttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatct ttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccgaggctcagctgctgtgtac ccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccgaaaatgccgc tctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgac cgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctgg tgtacagcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgagg actgcgtggaaatcttcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcg agaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaagggtctaga
SEQ ID NO:02 Polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SP-D com uma sequência líder de SP-D endógena.	gccaccatgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctct gggctatctggaagccgagatgaagacctacagccaccggaccatgccca gcgcctgtaccctcgtgatgtgcagcagcgtggaaagcggcctgcctggca gagatggcagggatggaagagagggccccagaggcgagaagggcgatcc tggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgcctggacaggctggacc tgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggccctaaggg ggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgct ggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaa agccaggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcac ctggcatgcagggaagtgccggcgctagaggactggctggcccaaaaggc gaaaggggagtgcctggcgaaagaggcgtgcccggaaatactggcgccgc tggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccaggcgcaagaggccc tccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgctaag ggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagc tctccagggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaa

SEQ ID NO.	**Sequência**
	ggtggaactgttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatctttaagac cgccggcttcgtgaagcccttcaccgaggctcagctgctgtgtacccaggct ggcggacagctggcctctcctagatctgccgccgaaaatgccgctctccag cagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgaccgacagc aagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacag caattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgt ggaaatcttcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaa gactggtcgtgtgcgagttctgaaggg
SEQ ID NO:03 O polinucleotídeo que codifica a sequência líder endógena na SEQ ID NO:01.	atgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggcta tctggaa
SEQ ID NO:04 Polipeptídeo da SP-D codificado pela SEQ ID NO:01 que inclui uma sequência líder (sublinhada) e polimorfismos	MLLFLLSALVLLTQPLLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLV MCSSVESGLPGRDGRDGREGPRGEKGDPGLPGAAGQ AGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGP PGVPGPAGREGPLGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEV GAPGMQGSAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAA GSAGAMGPQGSPGARGPPGLKGDKGIPGDKGAKGES GLPDVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFPN GQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSA AENAALQQLVVAKNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESL VYSNWAPGEPNDDGGSEDCVEIFTNGKWNDRACGEK

SEQ ID NO.	**Sequência**
(sublinhados) em: Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290, Ala 286/306.	RLVVCEF
SEQ ID NO:05 A sequência líder na SEQ ID NO:04.	MLLFLLSALVLLTQPLLGYLE
SEQ ID NO:06 Polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SP-D com uma sequência líder de TCR, sequência de Kozak (sublinhada) e sítios de restrição de Xba I (extremidade a 5') e Hind III (extremidade a 3').	aagcttgccaccatggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagca cctgtctggaattcagcatggccgccgagatgaagacctacagccaccgga caatgcccagcgcctgcaccctcgtgatgtgcagctctgtggaaagcggcc tgcccggcagagatggcagggatggaagagagggacccagaggcgagaa gggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgcctggaca ggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctgg ccctaaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgcc aggacctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggc cctcagggaaagccaggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaa gtgggagcacctggcatgcagggaagtgccggcgctagaggactggctgg cccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcgtgcccggaaat actggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccaggc gcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgata agggcgctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacag caggtggaagctctccagggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagc cagtacaagaaggtggaactgttccccaacggccagagcgtgggcgagaa

SEQ ID NO.	**Sequência**
	gatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccgaggctcagctgctg tgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccgaaaat gccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagc atgaccgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtc cctggtgtacagcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctc tgaggactgcgtggaaatcttcaccaacggcaagtggaacgaccgggcct gtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaagggtctaga
SEQ ID NO:07 Polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da SP-D com uma sequência líder de TCR.	gccaccatggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtct ggaattcagcatggccgccgagatgaagacctacagccaccggacaatgc ccagcgcctgcaccctcgtgatgtgcagctctgtggaaagcggcctgcccg gcagagatggcagggatggaagagagggacccagaggcgagaagggcg atcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgcctggacaggctg gacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggcccta agggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggac ctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcag ggaaagccaggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtggga gcacctggcatgcagggaagtgccggcgctagaggactggctggcccaaa aggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcgtgcccggaaatactggc gccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccaggcgcaaga ggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcg ctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtg gaagctctccagggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtac aagaaggtggaactgttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatcttt aagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccgaggctcagctgctgtgtaccc aggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccgaaaatgccgctc tccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgaccg acagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtg

SEQ ID NO.	**Sequência**
	tacagcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggac tgcgtggaaatcttcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcga gaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaaggg
SEQ ID NO:08 O polinucleotídeo que codifica a sequência líder na SEQ ID NO:06.	atggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaatt cagcatggcc
SEQ ID NO:09 Polipeptídeo da SP-D codificado pela SEQ ID NO:06 que inclui uma sequência líder de TCR (sublinhada) e polimorfismos (sublinhados) em: Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290, Ala 286/306.	MACPGFLWALVISTCLEFSMAAEMKTYSHRTMPSACTL VMCSSVESGLPGRDGRDGREGPRGEKGDPGLPGAAG QAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPG PPGVPGPAGREGPLGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGE VGAPGMQGSAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGA AGSAGAMGPQGSPGARGPPGLKGDKGIPGDKGAKGE SGLPDVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFP NGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRS AAENAALQQLVVAKNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGES LVYSNWAPGEPNDDGGSEDCVEIFTNGKWNDRACGE KRLVVCEF

SEQ ID NO:10 A sequência líder na SEQ ID NO:09.	MACPGFLWALVISTCLEFSMA

Exemplo 2—Expressão de SP-D em linhagens de células de mamíferos

[0083] Antes da transfecção, os vetores de expressão foram linearizados com Pvu I e purificados com fenol/clorofórmio e triclorometano/clorofórmio. As linhagens de células foram transfectadas com 7-8 µg de um vetor de expressão linearizado utilizando NUCLEOFECTION de acordo com as instruções do fabricante (AMAXA NUCLEOFECTOR TECHNOLOGY; Lonza, Cologne, Alemanha). As linhagens de células a seguir foram transfectadas com vetores de expressão: NM-H9D8 (DSM ACC 2806); NM-H9D8-E6Q12 (DSM ACC 2856); e NM-F9 (DSM ACC2606).

[0084] Conjuntos de células que expressam SP-D foram selecionados utilizando 25 nM de metotrexato (MTX) e aumentando a concentração até 50 nM de MTX. Para a obtenção de células com níveis maiores de expressão de SP-D, a concentração de MTX foi aumentada em etapas de 100 nM a 200 nM a 400 nM de MTX. A produtividade das células produtoras de SP-D foi determinada por ELISA específico para SP-D (BioVendor GmbH, Alemanha, Cat# RD194059101) de acordo com as instruções do fabricante e/ou análise de Dot-Blot utilizando anticorpos específicos para SP-D (Seven Hills Bioreagents, Cincinnati OH, Cat# WMAB-2D12A88 e Cat# WMAB-1A10A9). A taxa de produção específica (SPR) foi

calculada utilizando as equações a seguir:

$$SPR = \frac{\text{massa de proteína total}}{\text{área de célula integral (ICA)}}$$

$$ICA = \frac{\text{(número final de células – número inicial de células) x dias em cultura}}{\log_e \text{(número final de células / número inicial de células)}}$$

[0085] O tempo de duplicação foi calculado através da equação a seguir:

g = log 2 x (horas em cultura) / log (número final de células / número inicial de células)

[0086] Os clones que expressam SP-D foram isolados dos conjuntos de células através da tecnologia ClonePix (Molecular Devices) e avaliados em relação à produtividade. Os clones selecionados foram adicionalmente subclonados para obtenção dos clones finais. Foram obtidos clones com a produtividade >100 picogramas/célula/dia (pcd). A FIG. 3 mostra as taxas de produção específica para conjuntos de células que produzem SP-D diferentes cultivados com várias concentrações de MTX. Os conjuntos de células incluíam células H9D8-E6Q12, células H9D8 e células F9 cada uma transfectada com o vetor de expressão da SP-D humana contendo a sequência líder da SP-D humana e células H9D8 transfectadas com o vetor de expressão da SP-D humana contando a sequência líder do TCR humana.

Exemplo 3—Cultura de linhagens de células que expressam SP-D

[0087] As células foram cultivadas em um meio para terapia gênica definido quimicamente sem soro (GTM) (Glycotope GmbH, Alemanha). Ver, por exemplo, a Patente U.S. No. 9.359.427 que é incorporada como referência em sua totalidade para uma descrição do meio de cultura GTM. As culturas no processo de perfusão foram iniciadas com 1 X GTM e então modificado para 2 X GTM. As células foram mantidas na fase de crescimento exponencial através da divisão a cada 2 a 3 dias até uma concentração de células de $1x10^5$ a $3x10^5$ células/mL em frascos T (25 cm^2, volume de suspensão de 3 a 6 mL, TPP, Alemanha) e foram incubadas a 37°C, 98% de umidade e 8% de CO_2 (Integra Biosciences IBS, Biosafe plus, Suíça ou Thermo/Heraeus BBD 6220, Alemanha). A expansão celular foi realizada utilizando frascos T (75 cm^2, Volume de 12 a 30 mL; 150 cm^2, 50 a 150 mL) e frascos Spinner (100 mL a 1000 mL, Integra Biosciences IBS, Cellspin, Suíça).

[0088] Parâmetros gerais de cultura: os meios foram inoculados com $2,0x10^5$ células/mL. A operação contínua foi possibilitada através da alimentação de 1 X GTM a uma taxa de perfusão de 0,5 V/d (geralmente dias 4-5) e, dependendo do crescimento celular e das exigências nutricionais, aumentada para uma taxa de perfusão máxima de dois volumes do reator por dia. Quando a perfusão máxima com 1 X GTM foi atingida, o meio de alimentação foi substituído por 2 X GTM modificado. O meio foi mantido a pH 7,2 através da adição de 0,5 M de NaOH ou da purga com CO_2. O oxigênio dissolvido foi ajustado em 40% e a temperatura em 37°C. Também é possível a redução do oxigênio dissolvido abaixo de 40% para, por exemplo, 20% de oxigênio dissolvido. No último caso o teor de dodecâmero pode ser ligeiramente aumentado comparado com a cultura com 40% de oxigênio dissolvido.

[0090] Biorreator de perfusão de 1 L: As culturas na escala de 1 L no laboratório foram realizadas no sistema Sartorius Biostat B-DCU 2l Quad ou no sistema 2L BBI Quad. O oxigênio dissolvido e o pH foram medidos através de eletrodos padronizados (Mettler Torledo InPro 6800 e Mettler-Torledo 405-DPAS-SC-K8S, respectivamente, Mettler Torledo, Suíça). A agitação foi realizada por rotores segmentados com 3 hélices com uma velocidade de agitação de 300 a 400 rpm. A perfusão foi realizada utilizando um módulo ATF2 com uma membrana PES de 60 cm (tamanho do poro de 0,2 μm e área da membrana de 0.15 m^2, Spectrum, USA) e uma vazão de 0,9 L/min. Controle No Processo: A concentração e a viabilidade das células foram determinadas por Cedex HiRes (Roche, Suíça) utilizando o princípio de exclusão de azul de tripano. Glicose/lactato e glutamina/glutamato foram medidas através do YSI2700 ou YSI2900 Select Biochemical Analyzer (Yellow Springs Instruments, USA).

[0089] A FIG. 4 mostra alterações nas condições de cultura ao longo do tempo de um processo no biorreator para o clone H9D8-P1315-2A5 que incluem: concentração de células viáveis (painel A); concentração de glicose (painel B); viabilidade celular (painel C); concentração de lactato (painel D).

Exemplo 4—Purificação de SP-D de linhagens de células de mamíferos

[0090] Foi descoberto que a SP-D é secretada por células de expressão. O sobrenadante de células de células que produzem SP-D foi coletado das corridas do biorreator ou outras culturas e purificado utilizando uma corrida de cromatografia em Q-Sepharose (Q-Sepharose FF; GE Healthcare) no modo de ligação e eluição, seguida por uma corrida de cromatografia em Superdex75 (Superdex75; GE Healthcare) realizada no modo de ligação e eluição. A cromatografia foi realizada em sistemas de FPLC da GE (Äkta Explorer, Äkta Avant, Äkta Pure).

[0091] Cromatografia em Q-Sepharose: o sobrenadante foi esterilizado por filtração e diluído com o mesmo volume de uma solução de 20 mM de TRIS, 10 mM de EDTA, pH 7,4 e carregado na coluna de Q-Sepharose e eluído através da etapa de eluição com 600 mM de NaCl. A cromatografia foi realizada com os ajustes mostrados na TABELA 2.

TABELA 2

Parâmetro	**Ajuste**
Tampão de equilíbrio e corrida	20 mM de TRIS, 50 mM de NaCl, pH 7,4
Tampão de eluição	20 mM de TRIS, 600 mM de NaCl, pH 7,4
Volume / comprimento da coluna	240 mL / 11,5 cm 24000 mL
Carga por mL do Vol. da Col.	100 mL
Carga total	24000 ml (diluição 1:2)
Vazão (mL/min)	55 mL/min
Vazão dinâmica (cm/min)	2,6 cm/min
Tempo de contato	4,4 min
Concentração de SP-D no eluato	0,2 – 2 mg/ml

[0092] Cromatografia em Superdex75: o eluato foi diluído com o mesmo volume de um tampão Tris a 20 mM pH 7,4 contendo 10 mM de $CaCl_2$ e carregado sobre a coluna Superdex75 e eluído através da eluição em etapas com 10 mM de EDTA. A cromatografia foi realizada com os ajustes mostrados na TABELA 3.

TABELA 3

Parâmetro	**Ajuste**
Tampão de equilíbrio e corrida	20 mM de TRIS, 300 mM de NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 7,4
Tampão de eluição	20 mM de TRIS, 10 mM EDTA 300 mM de NaCl, pH 7,4
Carga total	2228 mL
Volume / comprimento da coluna	106 mL / 21,5 cm
Carga por mL do Vol. da Col.	21 mL (diluição 1:2)
Vazão (mL/min)	5 mL/min
Vazão dinâmica (cm/min)	1,01 cm/min
Tempo de contato	21,2 min
Concentração de eluição	0,5-3 mg/mL

[0093] O eluato do Superdex continha SP-D em >90% de pureza que foi determinada através da SDS-PAGE não redutora seguida da coloração com Coomassie blue (FIG. 5). Na FIG. 5, bandas maiores que 150 kD incluem oligômeros de ordem superior da SP-D. O eluato da coluna Superdex foi submetido à diálise a 4°C contra um tampão com 5 mM de Histidina pH 7,0 contendo 200 mM de NaCl e 1 mM de EDTA antes do armazenamento e da análise.

Exemplo 5—Atividade de SP-D em um ensaio de agregação bacteriana

[0094] A atividade da SP-D purificada do clone H9D8-P1315-2A5 foi testada em um ensaio de agregação bacteriana. O ensaio de agregação bacteriana foi realizado através de um método substancialmente similar ao método a seguir. *E. coli* (ATCC: Y1088) foi estriada sobre uma placa para bactéria com ágar e incubada a 37°C durante toda a noite. Uma única

colônia foi selecionada e utilizada para inocular uma cultura realizada durante toda a noite, agitada a 37°C durante toda a noite. 1 mL da cultura de bactéria foi pipetado dentro de quatro tubos de centrífuga de 1,5 mL e centrifugado a 4.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a pelota foi ressuspensa em 1 mL de tampão, (150 mM de HEPES, 20 mM de NaCl pH 7,4). Os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm durante 5 minutos e a pelota foi ressuspensa em 7 mL de tampão. A absorbância da suspensão de bactérias foi medida em um espectrômetro em 700 nm. A suspensão de bactérias foi ajustada para a obtenção de uma Absorbância na faixa de 1,0000 a 1,1000. 1 M de $CaCl_2$ foi adicionado à suspensão para a obtenção de uma concentração final de 5 mM de $CaCl_2$. Foram criadas diluições de rhSP-D em tampão de placebo (volume total de 15 µL para cada diluição) nas concentrações a seguir: 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0 µg/mL e adicionadas às cubetas cada uma contendo 20 µL do tampão HEPES-NaCl. 600 µL da suspensão de bactérias foram então adicionados às cubetas e a absorbância foi medida a cada 2,5 minutos para cada cubeta em 700 nm, ao longo de um total de 120 minutos.

[0095] No ensaio de agregação, a SP-D ativa agrega as células de bactéria e reduz a absorbância / aumenta a transmissão através da suspensão de bactérias. A FIG. 6 mostra que foi determinado que a rhSP-D purificada do clone H9D8-P1315-2A5 tem atividade no ensaio de agregação bacteriana. O experimento foi repetido mais duas vezes com resultados similares.

[0096] A SP-D humana expressa de forma recombinante em mais clones de H9D8 produzidos como é descrito no exemplo 2, acima, também foi analisada em relação a sua atividade. A SP-D de todos os clones finais selecionados testados tinha uma atividade alta similar. Um exemplo de clone isolado é NM-H9D8(8B11) que também foi utilizado em análises

subsequentes. NM-H9D8(8B11) foi depositada como “AT100-rhSP-D-H9D8-P20011-8B11” junto à “DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” em Braunschweig (Alemanha) pela Airway Therapeutics LLC, Cincinnati, OH, USA em 4 de setembro de 2018 da qual o clone depositado pode ser rapidamente identificado e um sob o número de acesso pode ser facilmente obtido.

Exemplo 6—Atividade de SP-D em um ensaio de inibição de TLR4

[0097] Formas oligoméricas de SP-D inibem respostas de células inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) prevenindo que os LPS se liguem/ativem o receptor Toll-like 4 (TLR4). Ver, por exemplo, Yamazoe M. *et al.*, (2008) J. Biological Chem. 283:35878-35888, que é incorporado como referência em sua totalidade.

[0098] A atividade da rhSP-D purificada do clone H9D8-P1315-2A5 de inibir a ativação da via do TLR4 por LPS foi testada. Células HEK-Blue™ hTLR4 (InvivoGen, San Diego, CA, U.S.A.) foram plaqueadas a uma densidade de ~20000 células/poço em placas de 384 poços e incubadas com várias concentrações de SP-D durante 2 horas a 37ºC, 5% de CO2. O LPS (*Escherichia coli* O26:B6, L5543 Sigma Aldrich) a uma concentração de EC_{80} foi adicionado em cada poço e as células foram incubadas durante mais 22 horas a 37ºC, 5% de CO_2. A atividade do TLR4 foi medida descolando as células dos poços, lavando as células suspensas, ressuspendendo as células em PBS e removendo quaisquer grumos através de pipetagem cuidadosa. As células lavadas foram transferidas para uma placa de 384 poços a uma densidade de $20e10^3$ células/poço contendo o meio de detecção HEK blue (InvivoGen, San Diego, CA, U.S.A.) que foi preparado em água livre de endotoxinas contendo 5 mM de $CaCl_2$ e 1% (v/v) de BSA. As células foram incubadas a 37°C em 5% de CO_2 durante 24 horas e a atividade de TLR4 foi

determinada através da medida da atividade de um gene repórter da fosfatase alcalina embrionária secretada (SEAP) utilizando um espectrofotômetro em 655nm. Um valor de IC_{50} para a SP-D foi determinado utilizando análise de regressão não linear através do fornecimento dos dados à equação logística de quatro parâmetros com XLfit da idbs (www.idbs.com). A FIG. 7 mostra que foi determinado que a SP-D purificada do clone, H9D8-P1315-2A5, tem atividade de inibição da ativação da via do TLR4 por LPS com uma IC_{50} de 0,00294 mg/mL e foi confirmado que a SP-D estava em uma forma oligomérica ativa para esta atividade. Uma vez que apenas o logaritmo dos valores de IC_{50} são normalmente distribuídos, a fim de se obter médias dos números de uma série de experimentos, foram utilizados os valores de pIC_{50}, definidos como o $-Log_{10}$ (IC_{50}). O experimento foi repetido mais duas vezes com resultados similares produzindo um pIC_{50} médio de 2,33 ± 0,10 mg/mL (N=3), correspondendo a uma IC_{50} média de 0,00468 mg/mL. A SP-D humana expressa de forma recombinante em mais clones de H9D8 produzidos como é descrito no exemplo 2, acima, também foi analisada em relação a sua atividade no ensaio de TLR-4. A SP-D de todos os clones finais selecionados testados tinha uma atividade alta similar. Um exemplo de clone isolado é NM-H9D8(8B11) que também foi utilizado em análises subsequentes.

Exemplo 7—Estabilidade da SP-D proveniente de várias fontes

[0099] Foi determinada a estabilidade de rhSP-D proveniente de várias fontes. As fontes incluíam rhSP-D expressa com um peptídeo líder da SP-D do tipo selvagem nas células H9D8 (“rhSP-D:WT”) e rhSP-D expressa com um peptídeo líder de TCR nas células H9D8 (“rhSP-D:TCR”). As soluções de rhSP-D:WT ou rhSP-D:TCR em vários tampões (Tampões: 1, 2, 3 ou 4) foram incubadas a 5°C durante várias semanas. A estabilidade da rhSP-D:WT ou da rhSP-D:TCR nos vários tampões foi determinada através

da medida da distribuição relativa de formas oligoméricas de rhSP-D incluindo: trímeros/hexâmeros, dodecâmeros, oligômeros de ordem superior “fuzzy balls” e oligômeros/agregados de ordem muito alta de rhSP-D. A distribuição relativa de formas oligoméricas de rhSP-D foi determinada através de uma análise de fracionamento de fluxo em campo de fluxo assimétrico (AF4) com espalhamento de luz em multiângulos (AF4-MALS) utilizando substancialmente os mesmos métodos que aqueles fornecidos no EXEMPLO 8. Um resultado médio foi determinado partindo de determinações em triplicatas e desvios padrões +/- foram determinados. Os resultados são resumidos na TABELA 4.

TABELA 4

Fonte de SP-D (tampão)	**Tempo a 5°C (semanas)**	**Distribuição relativa de formas oligoméricas (%)**			
		Trímero/ hexâmero	**Dodecâmero**	**Transição para ‘Fuzzy balls’**	**Oligômeros de ordem muito alta**
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:	0	13,71 ±	58,48 ±	16,06 ±	11,75 ±

Fonte de SP-D (tampão)	**Tempo a 5°C (semanas)**	**Distribuição relativa de formas oligoméricas (%)**			
		Trímero/ hexâmero	**Dodecâmero**	**Transição para 'Fuzzy balls'**	**Oligômeros de ordem muito alta**
TCR (2)		1,42	0,90	1,12	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

Fonte de SP-D (tampão)	**Tempo a 5°C (semanas)**	**Distribuição relativa de formas oligoméricas (%)**			
		Trímero/ hexâmero	**Dodecâmero**	**Transição para 'Fuzzy balls'**	**Oligômeros de ordem muito alta**
	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

Fonte de SP-D (tampão)	**Tempo a 5°C (semanas)**	**Distribuição relativa de formas oligoméricas (%)**			
		Trímero/ hexâmero	**Dodecâmero**	**Transição para 'Fuzzy balls'**	**Oligômeros de ordem muito alta**
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] A TABELA 4 ilustra diferenças nas estabilidades relativas das várias formas oligoméricas em soluções diferentes contendo rhSP-D:WT

e rhSP-D:TCR. Por exemplo, em relação às formas oligoméricas de SP-D de ordem muito alta, as soluções de rhSP-D:WT geralmente tinham uma porcentagem menor destes oligômeros do que as soluções correspondentes de rhSP-D:TCR. Em adição, a porcentagem de oligômeros de ordem muito alta para soluções de rhSP-D:WT não aumentou substancialmente entre pelo menos 0 semana e 2 semanas, comparadas com soluções correspondentes de rhSP-D:TCR. Em relação às formas oligoméricas dodecaméricas de rhSP-D, a porcentagem destes oligômeros nas soluções de rhSP-D:WT era geralmente estável entre as semanas 0 e 8; em contraste; a porcentagem destes oligômeros nas soluções de rhSP-D:TCR diminuiu entre as semanas 0 e 8 nas soluções correspondentes.

[0101] Estas diferenças entre as soluções de rhSP-D:WT e rhSP-D:TCR eram notáveis porque ambos os polipeptídeos da SP-D têm a sequência de aminoácidos e cada um é produzido pelas células H9D8. A rhSP-D:WT é inicialmente expressa com um polipeptídeo líder/sinal que corresponde ao polipeptídeo líder/sinal da proteína SP-D humana do tipo selvagem e a rhSP-D:TCR é inicialmente expressa com um polipeptídeo líder/sinal que corresponde ao polipeptídeo líder/sinal da proteína do TCR humano. Cada sequência líder/sinal teria que ser clivada da proteína correspondente logo após ou durante a translocação. Esta descoberta pode ser particularmente vantajosa para a produção e o desenvolvimento de soluções estáveis de SP-D humana para o tratamento de vários distúrbios pulmonares, especialmente de soluções que têm as formas oligoméricas dodecaméricas mais ativas da SP-D.

Exemplo 8—Análise de AF4-MALS

[0102] Uma análise de fracionamento de fluxo em campo de fluxo assimétrico com espalhamento de luz em multiângulos (AF4-MALS) foi

utilizada para determinar a distribuição relativa de formas oligoméricas diferentes de SP-D em uma solução. AF4-MALS é uma técnica de separação relacionada ao fracionamento de fluxo em campo (FFF). Ao contrário do FFF, AF4-MALS inclui uma única parede permeável de forma que seja causado um fluxo cruzado somente por um líquido carreador. O fluxo cruzado é induzido pelo líquido carreador que sai de forma constante através de uma parede semipermeável sobre o fundo de um canal.

[0103] As amostras foram analisadas utilizando um sistema de AF4-MALS (Eclipse Dual Tec, Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA) seguido por UV (detector de comprimento de onda variável Ultimate 3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) e análise de MALS (detector Dawn Heleos II, Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA). Um sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) foi utilizado para injetar as amostras e fornecer a fase móvel ao sistema de AF4. A configuração de AF4 utilizava um canal curto com um espaçador com espessura de 350 μm (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA). A análise dos dados e os cálculos foram realizados utilizando Chromeleon (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) e Astra (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA) software. As amostras incluíam rhSP-D purificada de células H9D8 ou F9 transfectadas com um vetor de expressão que codifica rhSP-D e um peptídeo líder de SP-D do tipo selvagem (pHBG1Ddhfr_WT_SP-D); e células H9D8 transfectadas com um vetor de expressão que codifica rhSP-D e um peptídeo líder de TCR do tipo selvagem (pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D). As amostras utilizadas estão listadas na TABELA 5. Os parâmetros para um sistema de AF4-MALS com rhSP-D são mostrados na TABELA 6.

TABELA 5

Batelada	**Linhagem de célula parental**	**Construção de expressão**	**Volume (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

TABELA 6

Etapa	**Tempo de início (min)**	**Tempo de término (min)**	**Duração (min)**	**Modo**	**Início do fluxo X (mL/min)**	**Término do fluxo X (mL/min)**
1	0	1	1	Focalizado		
2	1	2	1	Focalizado + injeção		
3	2	3,5	1,5	Focalizado		
4	3,5	3,7	0,2	Eluição	0,5	3

Etapa	**Tempo de início (min)**	**Tempo de término (min)**	**Duração (min)**	**Modo**	**Início do fluxo X (mL/min)**	**Término do fluxo X (mL/min)**
5	3,7	6,7	3	Eluição	3	3
6	6,7	16,7	10	Eluição	3	0,18
7	16,7	26,7	10	Eluição	0,18	0,18
8	26,7	41,7	15	Eluição	0,18	0
9	41,7	51,7	10	Eluição	0	0
10	51,7	56,7	5	Eluição + Injeção	0	0
11	56,7	57	0,3	Eluição	0	0

Vazão do Detector: 0,5 ml/min

Vazão de Injeção: 0,2 ml/min

Vazão Focalizada: 0,5 ml/min

Quantidade de Injeção: 5 µg

Fase móvel: 20 mM de TRIS, 200 mM de NaCl, pH 7,4

Canal: curto (145 mm)

Espaçador: 350 µM

Membrana: 10 kD PES

[0104] Os dados utilizando AF4-MALS foram coletados utilizando um detector de UV e um detector de espalhamento de luz em multiângulos e analisados para determinar a massa molar absoluta e o tamanho da SP-D em certo ponto de tempo durante a eluição. A relação do tamanho para a massa era indicativa do formato da SP-D. Partindo da relação do tamanho para a massa, foi determinado que nos estágios iniciais de uma eluição (0-34 minutos) a molécula de SP-D tinha um formato linear ou de bastão. Para os cálculos do modelo de bastão, o software assumia que a espessura de uma partícula com formato de bastão era insignificante (0,0 nm) comparada com seu comprimento. Se a espessura fosse insignificante, era utilizada sua espessura ou sua espessura aproximada em nm. A espessura do bastão foi estimada partindo dos dados de microscopia de força atômica (AFM) e foi determinado que os comprimentos do bastão eram coerentes com as medidas de AFM de 136 ± 8,1 nm (R. Arroyo et al., J Mol Biol (2018) 430: 1495-1509). Os estágios posteriores da eluição (34-45 minutos) para a SP-D indicaram que estava sendo observada uma estrutura mais compacta. Um modelo de Debye de segunda ordem foi empregado para a análise destes estágios da eluição. O modelo de Debye de segunda ordem forneceu melhores resultados ao longo de uma faixa mais ampla de massas molares, incluindo as muito grandes (maiores que ~10e6 Daltons ou raio RMS de ~50 nm). Para as formas oligoméricas dodecaméricas de SP-D, foi determinado que o peso molecular era de 520,09 +/- 4,61 kDa (N=72 determinações).

[0105] Um primeiro pico no perfil de eluição (Pico 1) continha trímeros e hexâmeros de SP-D com base nos cálculos de massa de acordo com o modelo de bastão. Um segundo pico no perfil de eluição (Pico 2) continha dodecâmeros de SP-D. Um terceiro pico no perfil de eluição (Pico 3) continha espécies intermediárias entre dodecâmeros de SP-D a 'fuzzy balls' de SP-D com base no PM intermediário que é determinado através do modelo de bastão. Um quarto pico no perfil de eluição (Pico 4) continha uma

massa heterogênea de oligômeros de SP-D com raio de RMS constante de aproximadamente 70 nm, consistente com o que foi observado através de medidas de AFM para as espécies “fuzzy ball”. Depois de 36 minutos no perfil de eluição o raio de RMS aumenta, indicativo de espécies agregadas.

Exemplo 9—Obtenção de perfil de N-glicanas

[0106] Foram comprados os padrões de N-glicosilação da SP-D produzida nas células NM-H9D8 (rhSP-D) e da SP-D obtida no fluido amniótico humano (hSP-D). A proteína SP-D purificada foi desnaturada e reduzida. As N-glicanas foram liberadas através da ação da N-glicanase F. As N-glicanas livres foram marcadas com um fluoróforo na extremidade redutora seguida por uma etapa de purificação que emprega extração em fase sólida. A mistura de N-glicanas purificadas com marcação fluorescente foi aplicada à cromatografia de ultra desempenho com interação hidrofílica com detecção de fluorescência (HILIC-UPLC-FLD) acoplada à espectrometria de massa em tandem com tempo de voo em quadrupolo com ionização por eletrospray (ESI-Q-TOF MS/MS). As glicanas foram quantificadas através das áreas de picos de fluorescência e identificadas através das massas moleculares em combinação com análises de fragmentos.

[0107] Os sinais de fluorescência mostraram uma faixa de tempos de retenção constantes para todas as N-glicanas. A atribuição de estrutura confiável foi realizada através de experimentos de MS/MS devido aos sinais consistentes por todas as amostras. Os padrões de glicosilação das proteínas SP-D comparas são mostrados na TABELA 7.

TABELA 7

N-glicana	**Porcentagem de estruturas de carboidrato que incluem a N-glicana**	
	hSP-D	**rhSP-D**
glicana fucosilada	91	99
glicana com N-acetilglicosamina de bissecção	18	38
glicana com pelo menos um ácido siálico	52	58
glicana com 1 ácido siálico	45	50
glicana com 2 ácidos siálicos	7	8
glicana com 3 ácidos siálicos	0	0
glicana com pelo menos uma galactose	93	92
glicana com 1 galactose	19	22
glicana com 2 galactoses	64	66
glicana com 3 galactoses	10	4
glicana monoantenária	1	1
glicana biantenária	82	90
glicana triantenária	13	5
glicana tetra-antenária	1	1
glicana com pelo menos uma	1	11

N-glicana	**Porcentagem de estruturas de carboidrato que incluem a N-glicana**	
	hSP-D	**rhSP-D**
GalNAc		
glicana do tipo híbrido	2	2
glicana do tipo alto teor de manose	2	2

[0108] Partindo da quantidade das antenaridades diferentes, o número de A pode ser calculado como uma medida da antenaridade total utilizando a fórmula 1 x a porcentagem de glicanas monoantenárias + 2 x a porcentagem de glicanas biantenárias + 3 x a porcentagem de glicanas triantenárias + 4 x a porcentagem de glicanas tetra-antenárias = número de A. Os números de A de rhSP-D e hSP-D são muito similares aos da rhSP-D que tem um número de A de 200 e da hSP-D que tem um número de A de 208.

[0109] Em alguns aspectos, os perfis de N-glicosilação da hSP-D e da rhSP-D eram similares. Por exemplo, tanto para a hSP-D quanto para a rhSP-D a porcentagem de estruturas de carboidrato que incluem uma glicana com 3 ácidos siálicos, uma glicana monoantenária, uma glicana tetra-antenária, uma glicana do tipo híbrido ou uma glicana do tipo alto teor de manose, era a mesma. Entretanto, em alguns aspectos, os perfis de N-glicosilação da hSP-D e da rhSP-D eram diferentes. Por exemplo, a porcentagem de estruturas de carboidrato que incluem uma glicana com N-acetilglicosamina de bissecção, uma glicana com 1 ácido siálico, uma glicana com 3 galactoses, uma glicana triantenária ou uma glicana com pelo menos uma GalNA, era diferente entre a hSP-D e a SP-D.

[0110] Em uma análise adicional, foram comparados os perfis de glicosilação da SP-D humana recombinante produzida em clones diferentes de células NM-H9D8 (rhSP-D), incluindo duas bateladas de purificação diferentes do clone NM-H9D8(8B11), da SP-D humana recombinante produzida em clones diferentes de células CHO (CHO-SP-D) e da SP-D nativa obtida no fluido amniótico humano (hSP-D). Como mostrando na FIG. 8, o perfil de N-glicosilação da rhSP-D e da hSP-D é altamente comparável, enquanto que a CHO-SP-D exibe diferenças notáveis causadas pela produção em uma linhagem de célula não humana. A FIG. 9 demonstra ainda que os perfis de O-glicosilação da rhSP-D derivada de NM-H9D8 e da CHO-SP-D derivada de CHO também diferem significativamente. A O-glicosilação da SP-D obtida no fluido amniótico humano não pôde ser determinada devido à alta quantidade de proteína necessária para esta análise. O perfil de N-glicosilação inclui todas as estruturas de glicana ligadas aos resíduos de asparagina da cadeia polipeptídica da SP-D enquanto que o perfil de O-glicosilação mostra as estruturas de glicana ligadas aos resíduos de serina, treonina, hidróxi-lisina e hidróxi-prolina. Em conclusão, a rhSP-D produzida nos clones de células NM-H9D8 tem um padrão de glicosilação humano que se assemelha muito à glicosilação da hSP-D que ocorre naturalmente.

[0111] Em adição, foi analisada e ligação dos ácidos siálicos (ácido N-acetilneuramínico; NANA) nas estruturas de glicana da SP-D. O NANA pode ser geralmente ligado em uma confirmação α2,3 ou α2,6 ao resíduo de galactose terminal. Na glicosilação humana, é observada uma mistura de NANA ligado a α2,3 e a α2,6, enquanto que as células de hamster tal como CHO não produzem NANA ligado a α2,6. A SP-D humana produzida na CHO bem como na NM-H9D8 foi purificada, desnaturada e reduzida. As N-glicanas foram liberadas durante a incubação com N-glicanase F. As N-glicanas livres foram marcadas com um fluoróforo (RapiFluor, Waters)

seguida pela etapa de purificação empregando uma extração em fase sólida com HILIC. Para o tratamento com neuraminidase, as N-glicanas purificadas foram digeridas com a neuraminidase S (NEB) durante 1 h a 37°C. A neuraminidase S remove especificamente o NANA ligado a α2,3 enquanto não elimina por clivagem o NANA ligado a α2,6. A enzima foi removida através da extração em fase sólida repetida com HILIC. Um sistema de classe I com detecção de fluorescência (Waters) foi utilizado para HILIC-UPLC. A mistura de N-glicanas com marcação fluorescente purificadas foi separada em uma coluna Acquity UPLC BEH Glycan (150x2,1mm, 1,7u, Waters) a 60°C com uma vazão de 0,5 mL/min. 100% de acetonitrila (A) e 100mM de formiato de amônio, pH4,5, foram utilizados como o sistema eluente e o gradiente de 22% de B a 44% de B foi aplicado em 82 min. Os ajustes de comprimento de onda fluorescente eram: λ_{ex} 265nm e λ_{em} 425nm. Um Bruker Impact HD ESI-Q-TOF-MS(MS) acoplado foi utilizado para a identificação de N-glicana no modo de íons positivos. As N-glicanas foram identificadas de acordo com as massas moleculares em combinação com análises de fragmentos.

[0112] A análise revelou que a SP-D proveniente de CHO exibe um perfil de N-glicana heterogêneo entre 20 e 70 min RT (temperatura ambiente). Além dos três picos principais compreendendo N-glicanas biantenárias com zero (S0), um (S1) e dois (S2) NANAs, são detectadas estruturas antenárias superiores com até quatro NANAs entre 53-70 min. As estruturas S1 e S2 biantenárias bem como a maioria das estruturas antenárias superiores após 56 min RT são afetadas pelo tratamento com a neuraminidase S provando a presença de NANA ligado a 2,3. A sialilação total foi fortemente reduzida, indicando a presença principalmente de NANA ligado a α2,3 na SP-D produzida por CHO (ver a FIG. 10, painéis A e B). Na SP-D das células NM-H9D8(8B11) foram detectadas apenas ligeiras modificações no perfil de N-glicanas após o tratamento com neuraminidase.

O pico de monossialilação à temperatura ambiente durante 50 min não é afetado através do tratamento com a neuraminidase S. Foi observada apenas uma alteração no pico menor compreendendo uma N-glicana S2 na SP-D de NM-H9D8 à temperatura ambiente durante 54 min. A sialilação total foi apenas ligeiramente reduzida pela neuraminidase S, indicando que a SP-D produzida na NM-H9D8(8B11) compreende principalmente NANA ligado a α2,6 e apenas quantidades pequenas de NANA ligado a α2,3 (ver a FIG. 10, painéis C e D).

[0113] O termo “compreendendo” como utilizado aqui é sinônimo de “incluindo”, “contendo” ou “caracterizado por” e é inclusivo ou ilimitado e não exclui elementos ou etapas de métodos não citadas adicionais.

[0114] A descrição acima divulga vários métodos e materiais da presente invenção. Esta invenção é suscetível a modificações nos métodos e nos materiais, bem como a alterações nos métodos e no equipamento de fabricação. Estas modificações se tornarão evidentes para os peritos na técnica partindo de uma consideração desta divulgação ou da prática da invenção divulgada aqui. Consequentemente, não é pretendido que esta invenção seja limitada às modalidades específicas divulgadas aqui, mas que cubra todas as modificações e as alternativas que estão dentro do âmbito e do espírito verdadeiros da invenção.

[0115] Todas as referências citadas aqui, que incluem, mas não são limitadas aos pedidos de patentes publicados ou não publicados, às patentes e às referências na literatura, são incorporadas aqui como referência em sua totalidade e por meio deste constituem uma parte deste relatório descritivo. Até que as publicações e patentes ou Pedidos de patentes incorporados com referência contradigam a divulgação contida no relatório descritivo, é pretendido que o Relatório Descritivo substitua e/ou

tenha prioridade sobre qualquer tipo de material contraditório.

REIVINDICAÇÕES

1. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, **caracterizado** por que compreende:

(a) a introdução de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo da SP-D em uma célula humana;

(b) a cultura da célula sob condições nas quais o polipeptídeo da SP-D é expresso; e

(c) o isolamento do polipeptídeo da SP-D expresso da célula.

2. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a célula é derivada de uma célula de leucemia mieloide humana.

3. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 2, **caracterizado** por que a célula é selecionada do grupo que consiste em NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 e NM-F9.

4. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 3, **caracterizado** por que a célula é uma célula NM-H9D8.

5. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o polinucleotídeo codifica uma sequência líder do polipeptídeo da SP-D do tipo selvagem.

6. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado** por que o polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO:03.

7. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado** por que o polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO:02.

8. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado** por que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:05.

9. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado** por que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:04.

10. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o polinucleotídeo codifica uma sequência líder do polipeptídeo do receptor de células T (TCR) do tipo selvagem.

11. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 10, **caracterizado** por que o polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO:08.

12. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 10, **caracterizado** por que o polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO:07.

13. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 10, **caracterizado** por que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:10.

14. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 10,

caracterizado por que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:09.

15. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o polipeptídeo da SP-D compreende um resíduo em uma posição polimórfica, em que o resíduo é selecionado do grupo que consiste em Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290 e Ala 286/306.

16. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 15, **caracterizado** por que o polipeptídeo da SP-D compreende Met11/31.

17. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 15, **caracterizado** por que o polipeptídeo da SP-D compreende Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290 e Ala 286/306.

18. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 1, que compreende ainda o isolamento de uma população dos polipeptídeos da SP-D expressos, cada polipeptídeo da SP-D expresso compreendendo um carboidrato do tipo complexo ligado em um sítio de N-glicosilação, **caracterizado** por que a população tem um padrão de glicosilação que compreende as características a seguir:

(i) pelo menos 70% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma fucose central;

(ii) pelo menos 10% dos carboidratos do tipo complexo incluem pelo menos um resíduo de ácido siálico;

(iii) pelo menos 50% dos carboidratos do tipo complexo incluem pelo menos uma estrutura de carboidrato biantenária;

(iv) pelo menos 10% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma N-acetilglicosamina de bissecção;

(v) menos de 10% dos carboidratos são estruturas do tipo alto teor de manose; e

(vi) uma quantidade detectável de resíduos de ácido siálico acoplados a α2,6.

19. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 18, **caracterizado** por que a população tem um padrão de glicosilação que compreende uma ou mais das características a seguir:

(i) pelo menos 20% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma N-acetilglicosamina de bissecção; e

(iii) pelo menos 85% dos carboidratos do tipo complexo incluem uma fucose central.

20. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo da dihidrofolato redutase.

21. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a cultura da célula compreende o contato da célula com um antifolato.

22. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 21, **caracterizado** por que a expressão do polipeptídeo da SP-D é aumentada através do aumento da concentração do antifolato.

23. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 21, **caracterizado** por que o antifolato compreende metotrexato.

24. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a célula é cultivada em um reator de perfusão.

25. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a da Reivindicação 1, **caracterizado** por que a célula é cultivada em uma cultura contínua.

26. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a da Reivindicação 1, **caracterizado** por que a cultura da célula compreende a manutenção de um meio de cultura que tem um pH 7,2, oxigênio dissolvido a 40% e ou 20% e temperatura a 37°C.

27. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que o oxigênio dissolvido é menor que 35%, preferencialmente 30%.

28. **Método Para Produzir Composição de Polipeptídeos da Proteína Surfactante D (SP-D) Humana**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o isolamento do polipeptídeo da SP-D expresso da célula compreende a preparação de um sobrenadante de células partindo de um meio de cultura que contém as células.

29. **Vetor de Expressão**, **caraterizado** por que codifica um polipeptídeo líder, um polipeptídeo da proteína surfactante D (SP-D) humana e uma dihidrofolato redutase.

30. **Vetor de Expressão**, de acordo com a Reivindicação 29, **caraterizado**

por que o polipeptídeo líder é uma sequência líder do polipeptídeo da SP-D do tipo selvagem.

31. **Vetor de Expressão**, de acordo com a Reivindicação 30, **caraterizado** por que o polipeptídeo líder compreende a SEQ ID NO:05.

32. **Vetor de Expressão**, de acordo com a Reivindicação 30, **caraterizado** por que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que compreende a SEQ ID NO:04.

33. **Vetor de Expressão**, de acordo com a Reivindicação 29, **caraterizado** por que o polipeptídeo líder é uma sequência líder do polipeptídeo do receptor de células T (TCR) do tipo selvagem.

34. **Vetor de Expressão**, de acordo com a Reivindicação 33, **caraterizado** por que o polipeptídeo líder compreende a SEQ ID NO:10.

35. **Vetor de Expressão**, de acordo com a Reivindicação 29, **caraterizado** por que compreende um polinucleotídeo que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:02 e 07.

36. **Vetor de Expressão**, de acordo com a Reivindicação 29, **caraterizado** por que codifica um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs:04 e 09.

37. **Célula Humana Imortalizada**, **caraterizada** por que compreende o vetor de expressão conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 29 a 36.

38. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 37, **caraterizada** por que a célula é derivada de uma célula de leucemia mieloide humana.

39. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 38, **caraterizada** por que a célula é selecionada do grupo que consiste em

NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 e NM-F9.

40. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 39, **caraterizada** por que a célula é uma célula NM-H9D8.

41. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 39, **caraterizada** por que a célula é uma célula NM-H9D8(8B11).

42. **Célula Humana Imortalizada**, que compreende um vetor de expressão que codifica um polipeptídeo da proteína surfactante D (SP-D) humana, **caraterizada** por que a célula é derivada de uma célula de leucemia mieloide humana.

43. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 42, **caraterizada** por que o vetor de expressão codifica também um polipeptídeo líder.

44. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 43, **caraterizada** por que o polipeptídeo líder é uma sequência líder do polipeptídeo da SP-D do tipo selvagem.

45. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 44, **caraterizada** por que o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:05.

46. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 43, **caraterizada** por que o polipeptídeo líder é uma sequência líder do polipeptídeo do receptor de células T (TCR) do tipo selvagem.

47. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 46, **caraterizada** por que o polipeptídeo líder compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:10.

48. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 42, **caraterizada** por que o polipeptídeo da proteína surfactante D (SP-D)

humana compreende a sequência de aminoácidos das posições 22 a 376 da SEQ ID NO:04.

49. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 42, **caraterizada** por que o vetor de expressão codifica também uma dihidrofolato redutase.

50. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 42, **caraterizada** por que a célula é selecionada do grupo que consiste em NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12 e NM-F9.

51. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 50, **caraterizada** por que a célula é uma célula NM-H9D8.

52. **Célula Humana Imortalizada**, de acordo com a Reivindicação 50, **caraterizada** por que a célula é uma célula NM-H9D8(8B11).

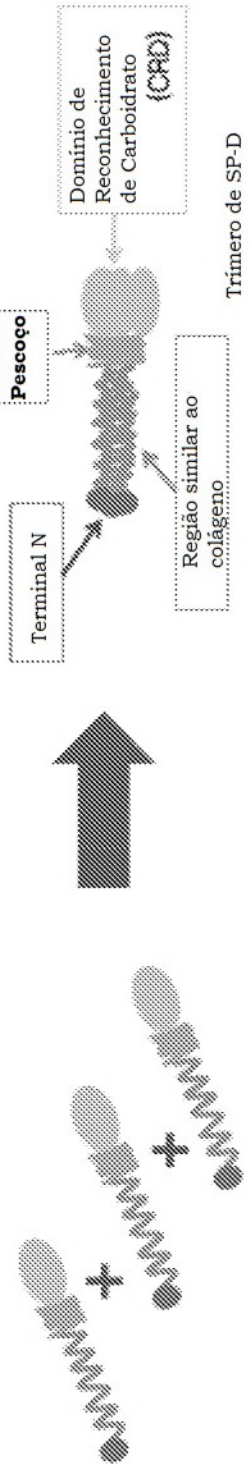

Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD)
Trímero de SP-D
Pescoço
Terminal N
Região similar ao colágeno

FIG. 1

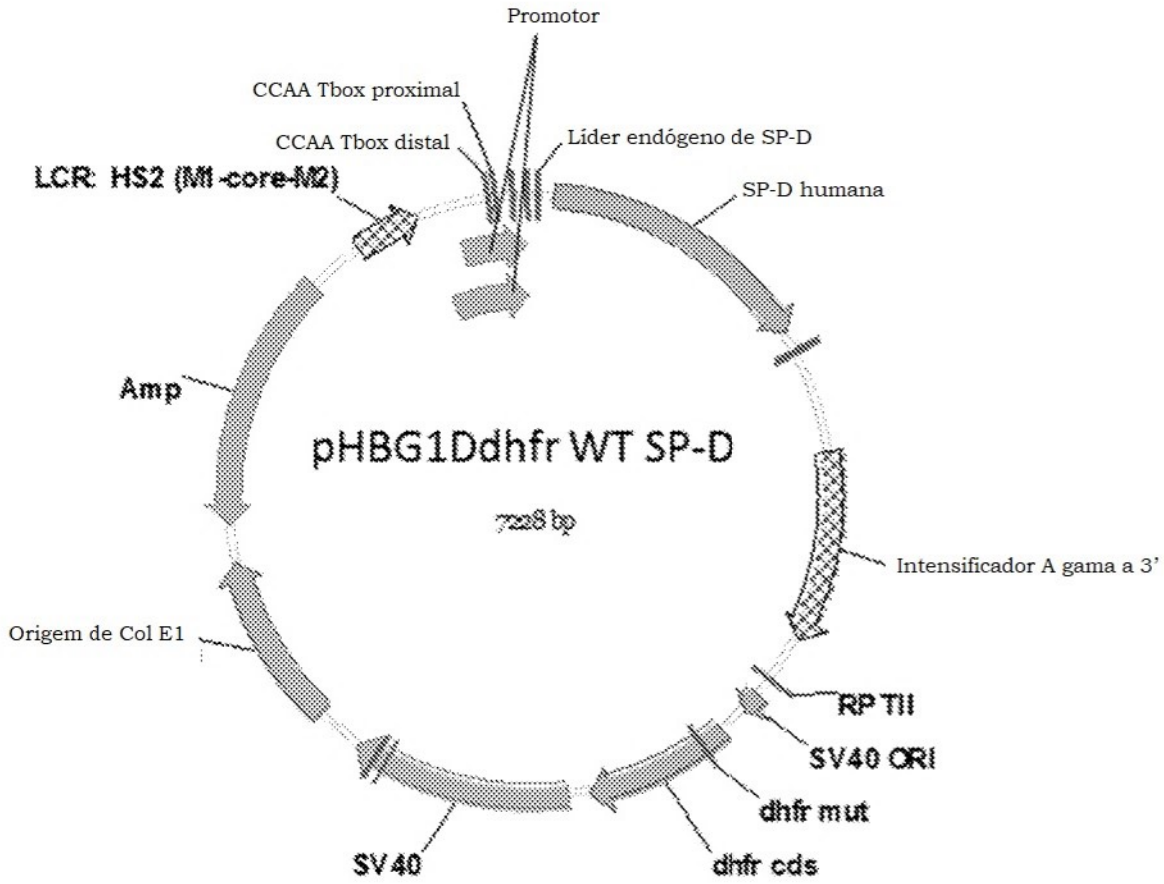

Promotor
CCAA Tbox proximal
CCAA Tbox distal
Líder endógeno de SP-D
LCR: HS2 (M1-core-M2)
SP-D humana
Amp
pHBG1Ddhfr WT SP-D
Intensificador A gama a 3'
Origem de Col E1
RP TII
SV40 ORI
dhfr mut
SV40
dhfr cds

FIG.2A

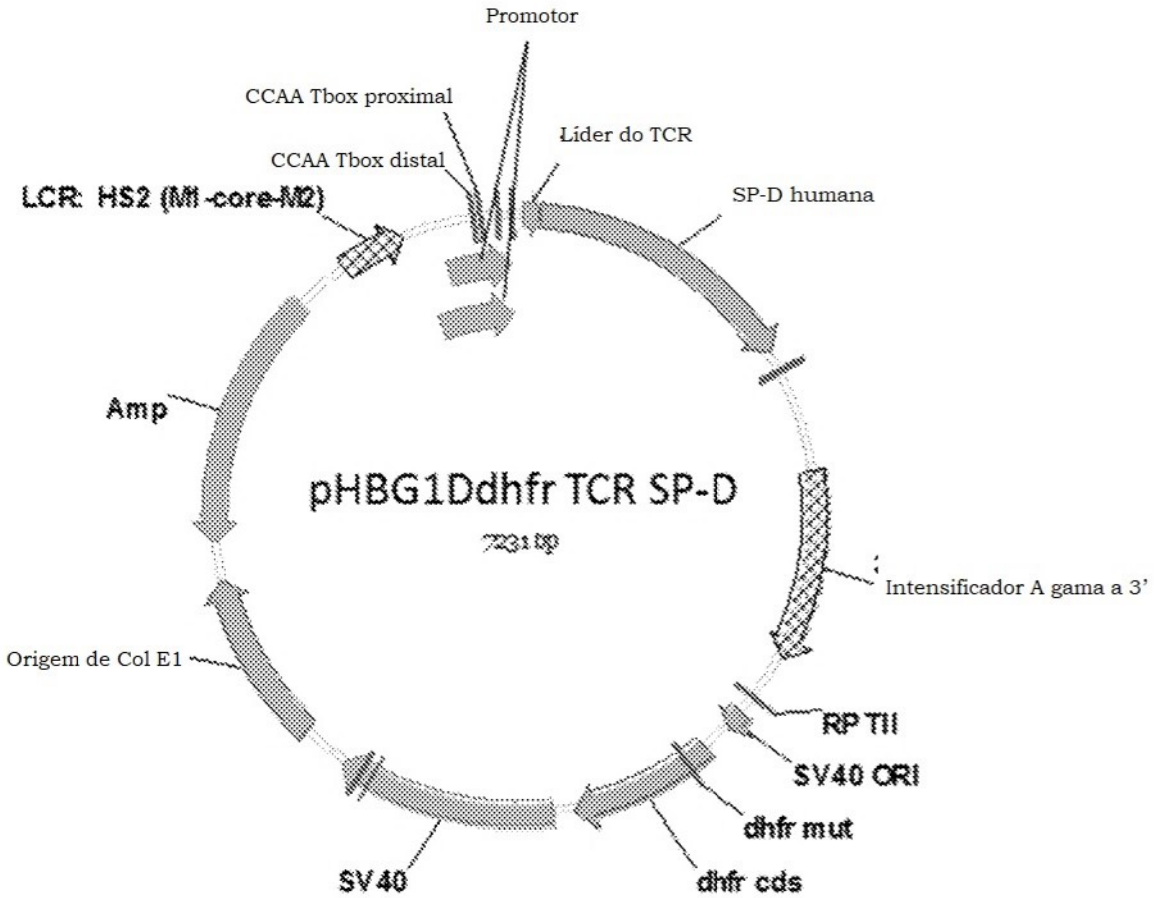

Promotor
CCAA Tbox proximal
CCAA Tbox distal
Líder do TCR
SP-D humana
LCR: HS2 (MI-core-M2)
Amp
pHBG1Ddhfr TCR SP-D
Intensificador A gama a 3'
Origem de Col E1
RP TII
SV40 ORI
dhfr mut
dhfr cds
SV40

FIG. 2B

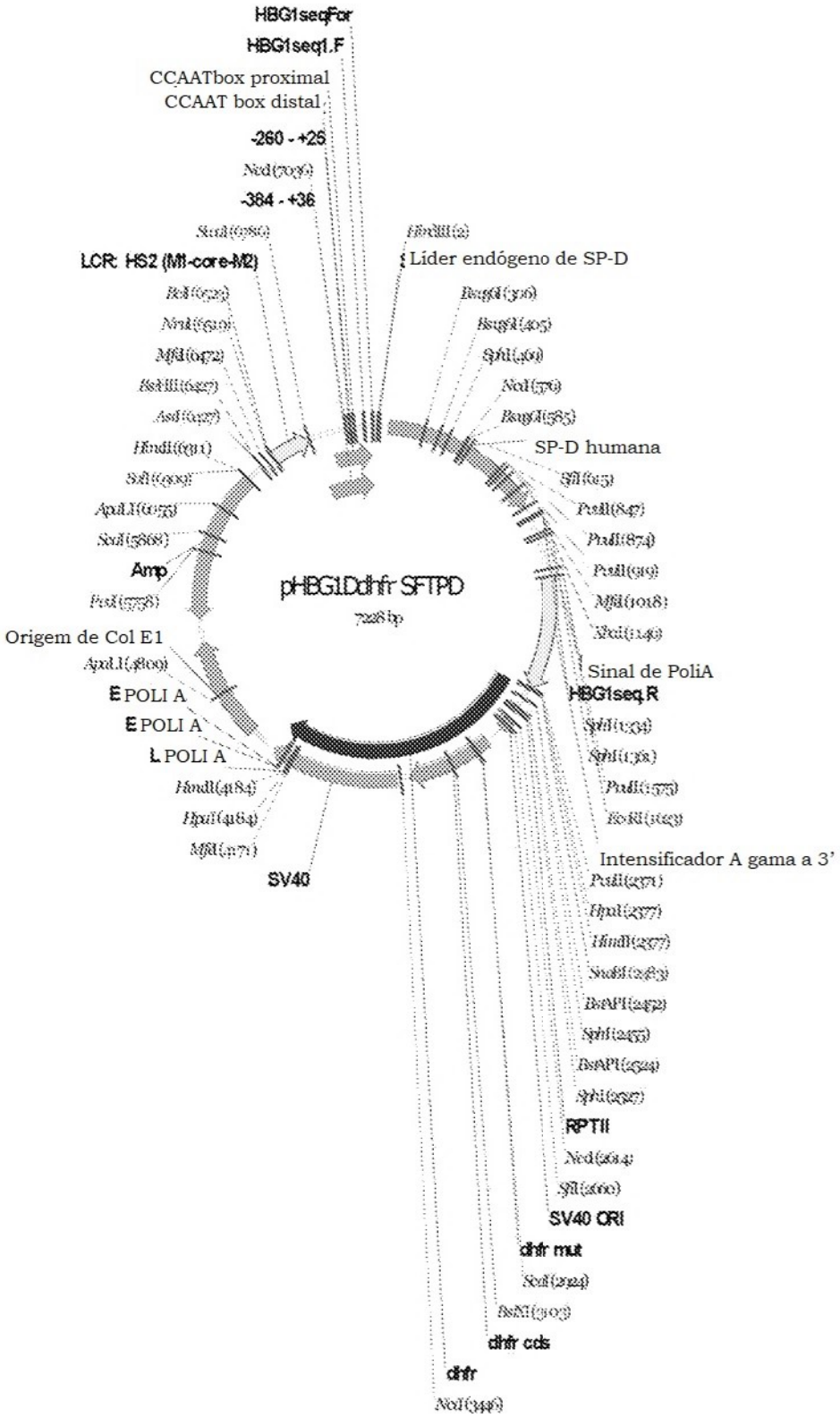

HBG1seqFor
HBG1seq1.F
CCAATbox proximal
CCAAT box distal
-260 - +25
-384 - +36
LCR: HS2 (MI-core-M2)
Líder endógeno de SP-D
SP-D humana
pHBG1Ddhfr SFTPD
7268 bp
Amp
Origem de Col E1
E POLI A
E POLI A
L POLI A
SV40
Sinal de PoliA
HBG1seq.R
Intensificador A gama a 3'
RPTII
SV40 ORI
dhfr mut
dhfr cds
dhfr

FIG. 2C

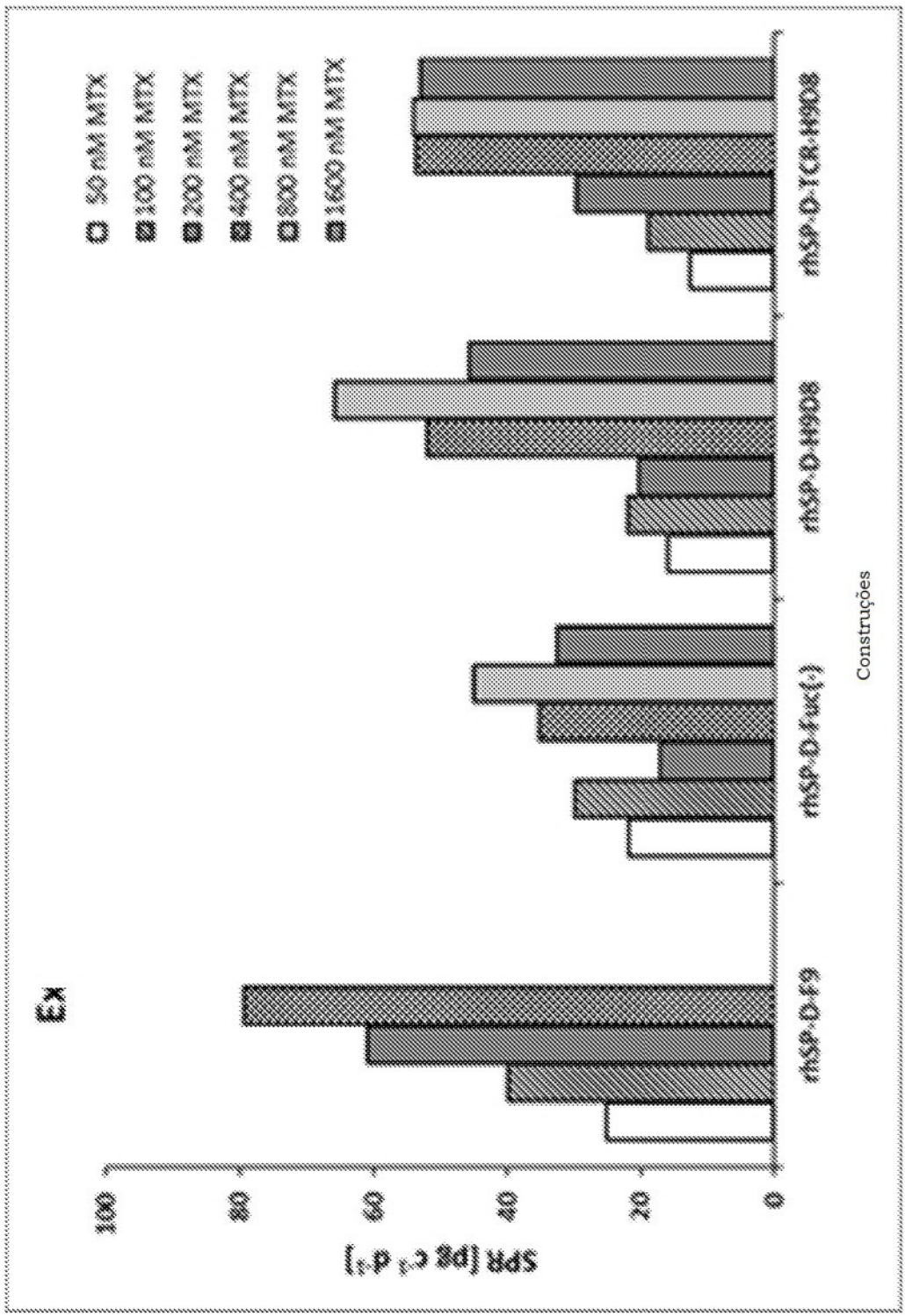

50 nM MTX
100 nM MTX
200 nM MTX
400 nM MTX
800 nM MTX
1600 nM MTX
rhSP-D-F9
rhSP-D-Fuc(-)
rhSP-D-H9D8
rhSP-D-TCR-H9D8
Construções
SPR [pg c⁻¹ d⁻¹]
0
20
40
60
80
100
Ex

FIG. 3

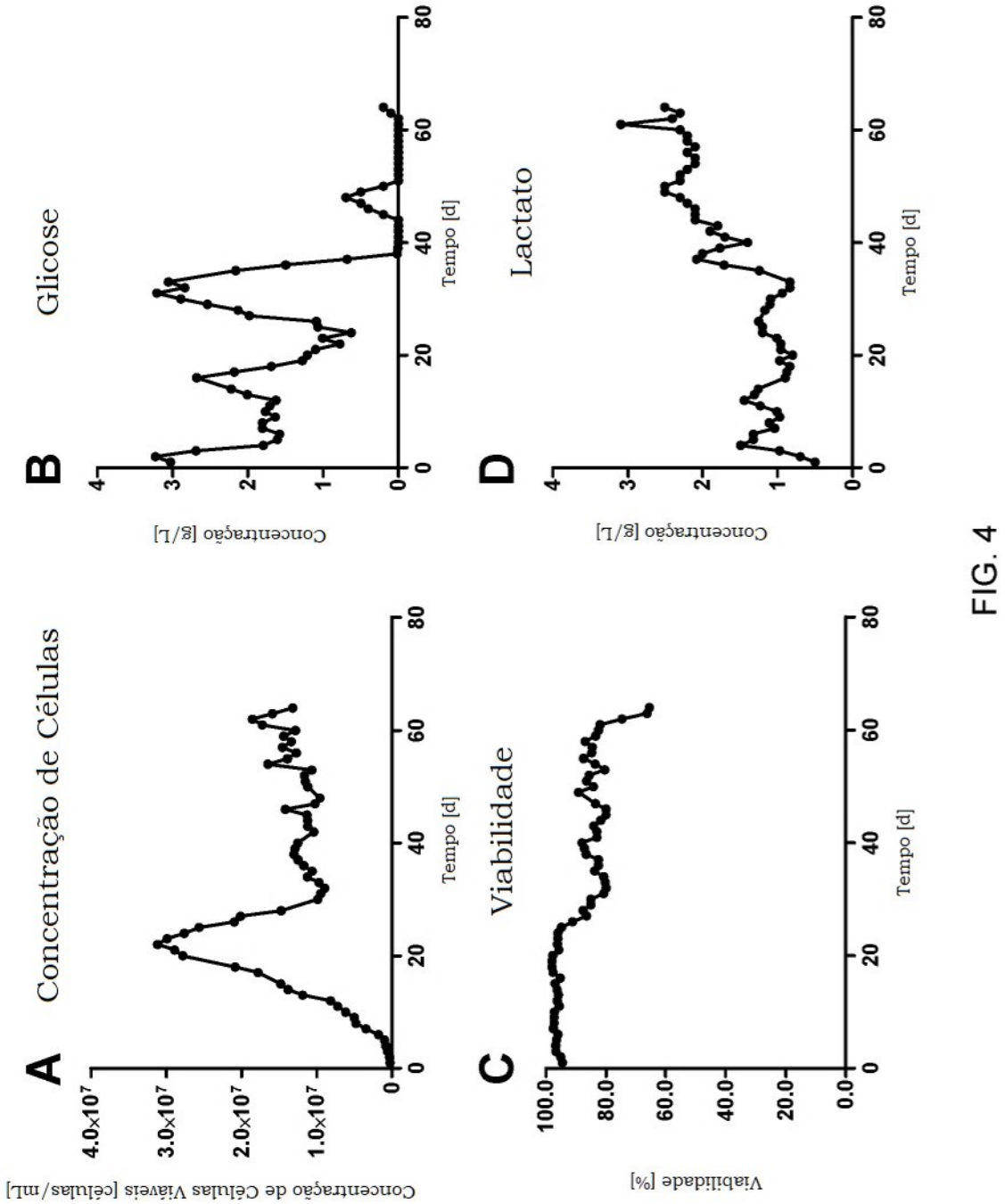

A
Concentração de Células
Concentração de Células Viáveis [células/mL]
4.0x10^7
3.0x10^7
2.0x10^7
1.0x10^7
0
0
20
40
60
80
Tempo [d]
B
Glicose
Concentração [g/L]
4
3
2
1
0
0
20
40
60
80
Tempo [d]
C
Viabilidade
Viabilidade [%]
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0
20
40
60
80
Tempo [d]
D
Lactato
Concentração [g/L]
4
3
2
1
0
0
20
40
60
80
Tempo [d]

FIG. 4

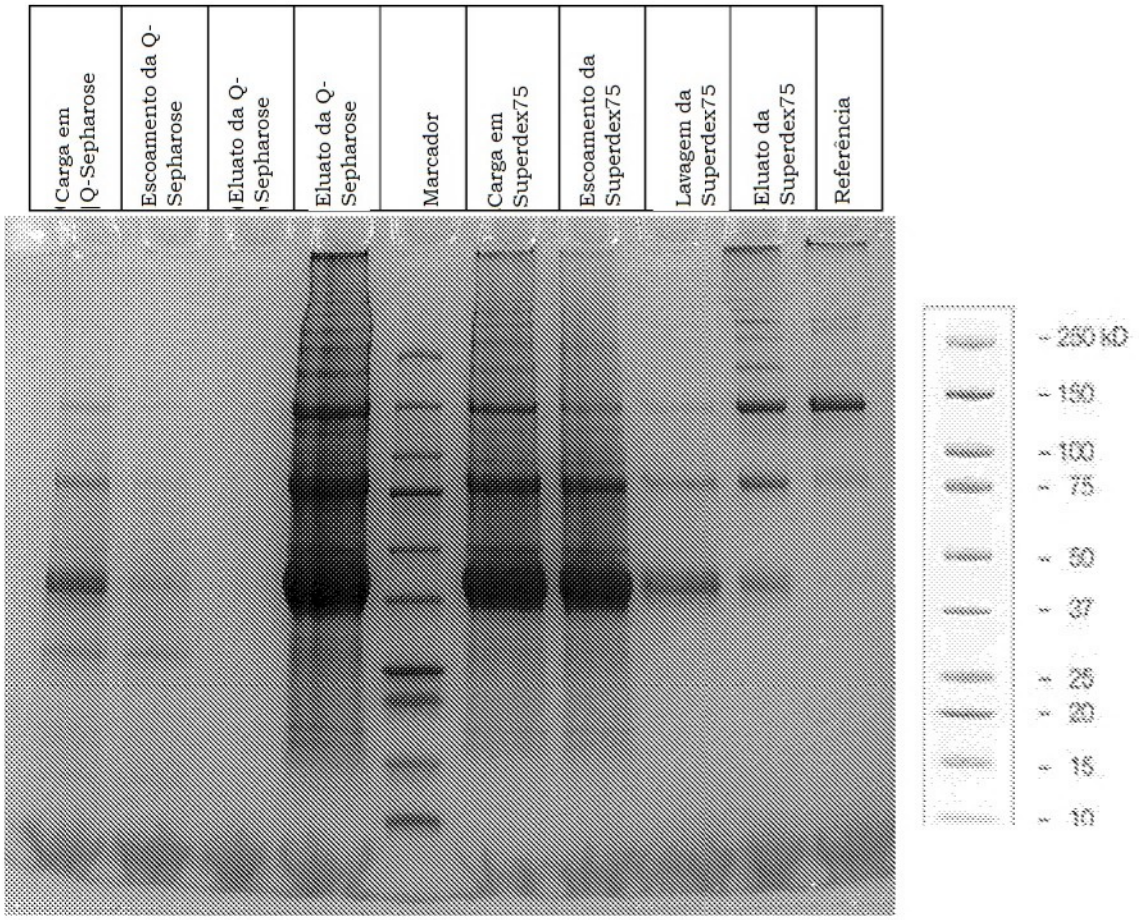

Carga em Q-Sepharose
Escoamento da Q-Sepharose
Eluato da Q-Sepharose
Eluato da Q-Sepharose
Marcador
Carga em Superdex75
Escoamento da Superdex75
Lavagem da Superdex75
Eluato da Superdex75
Referência
~ 250 kD
~ 150
~ 100
~ 75
~ 50
~ 37
~ 25
~ 20
~ 15
~ 10

FIG. 5

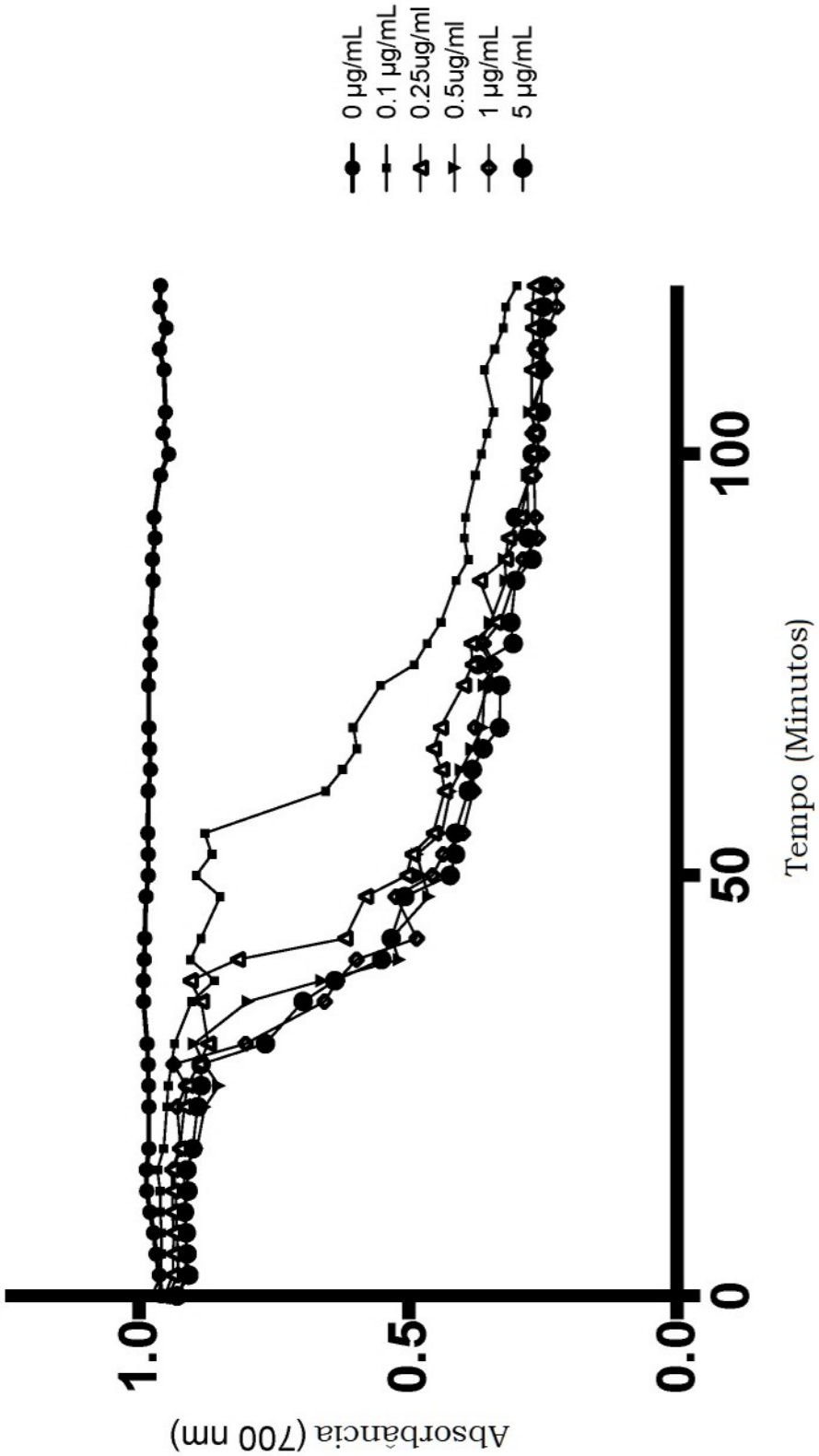

0 µg/mL
0.1 µg/mL
0.25ug/ml
0.5ug/ml
1 µg/mL
5 µg/mL
Absorbância (700 nm)
1.0
0.5
0.0
0
50
100
Tempo (Minutos)

FIG. 6

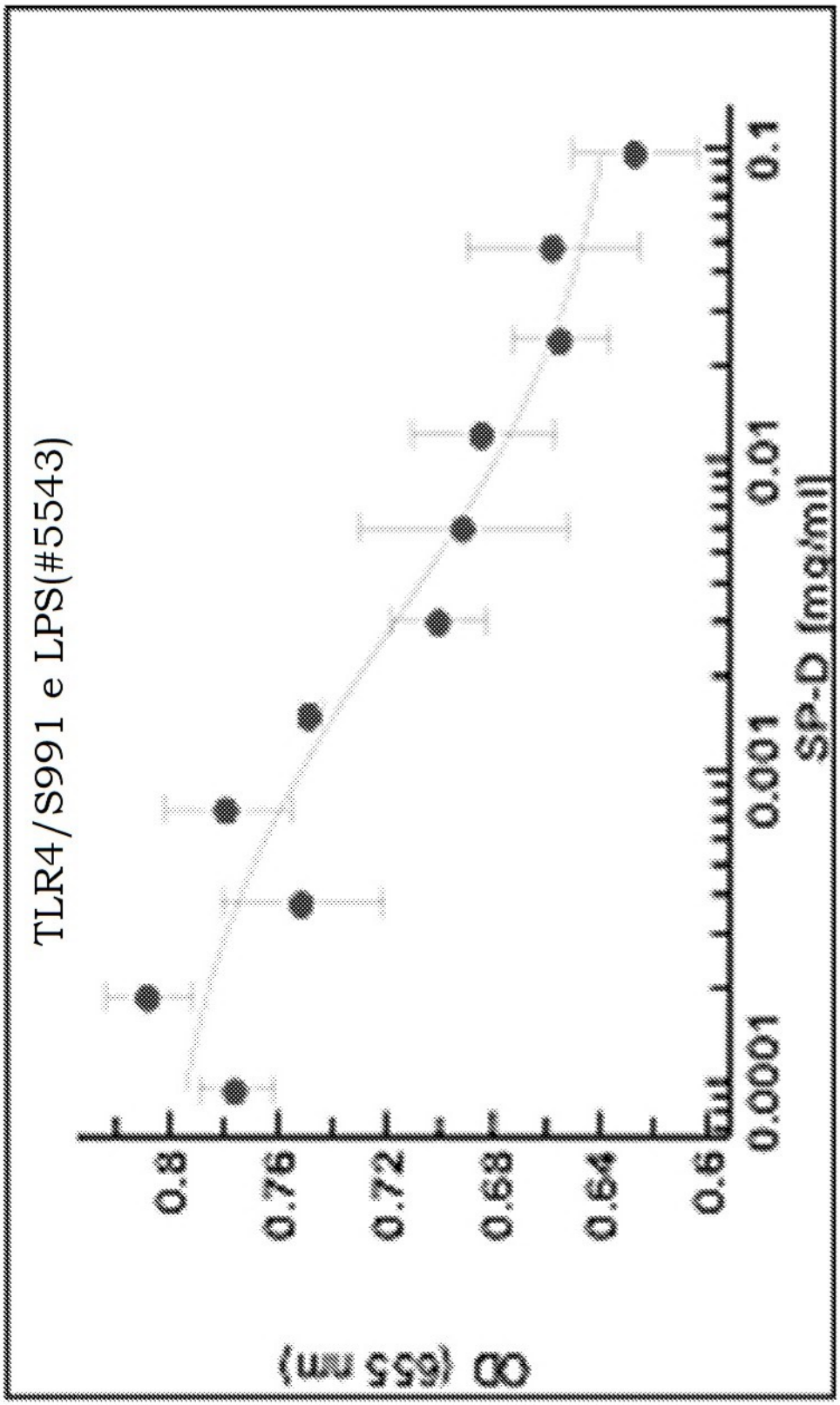

TLR4/S991 e LPS(#5543)
OD (655 nm)
0.8
0.76
0.72
0.68
0.64
0.6
0.0001
0.001
0.01
0.1
SP-D (mg/ml)

FIG. 7

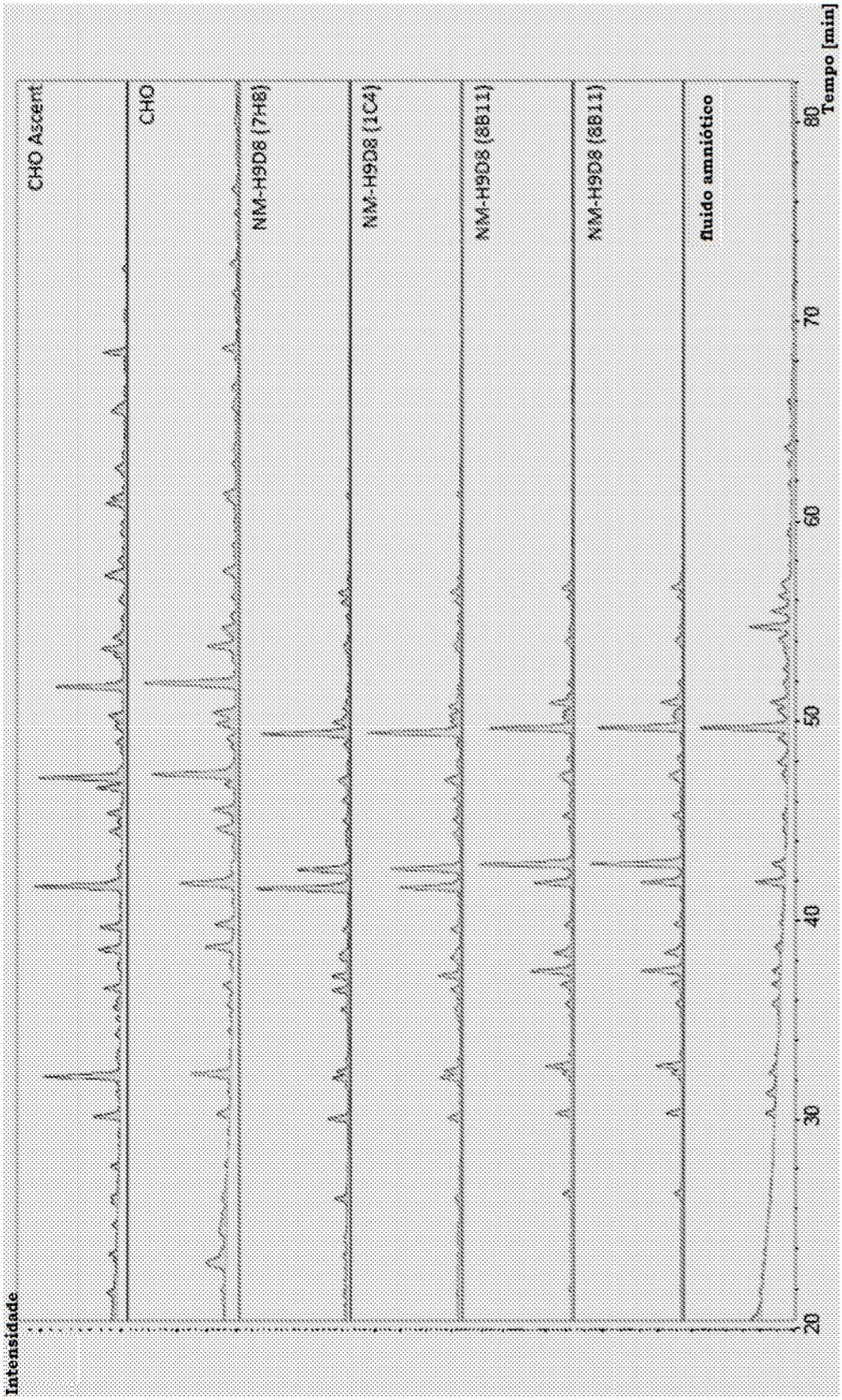

CHO Ascent
CHO
NM-H9D8 (7H8)
NM-H9D8 (1C4)
NM-H9D8 (8B11)
NM-H9D8 (8B11)
fluido amniótico
Intensidade
20
30
40
50
60
70
80
Tempo [min]

FIG. 8

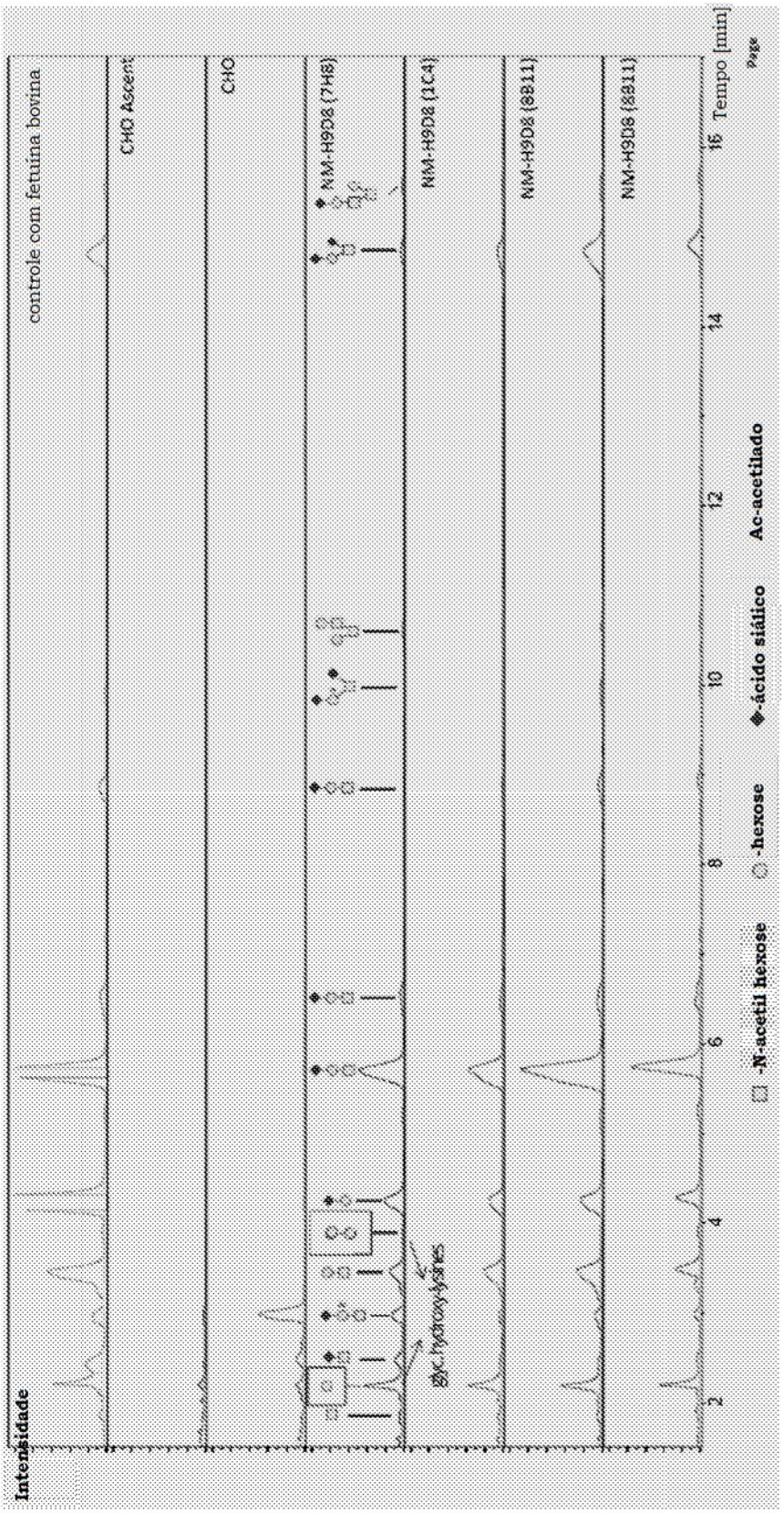

Intensidade
controle com fetuína bovina
CHO Ascent
CHO
NM-H9D8 (7H8)
NM-H9D8 (1C4)
NM-H9D8 (8B11)
NM-H9D8 (8B11)
glyc.hydroxy-lysines
2
4
6
8
10
12
14
16
Tempo [min]
Page
-N-acetil hexose
-hexose
-ácido siálico
Ac-acetilado

FIG. 9

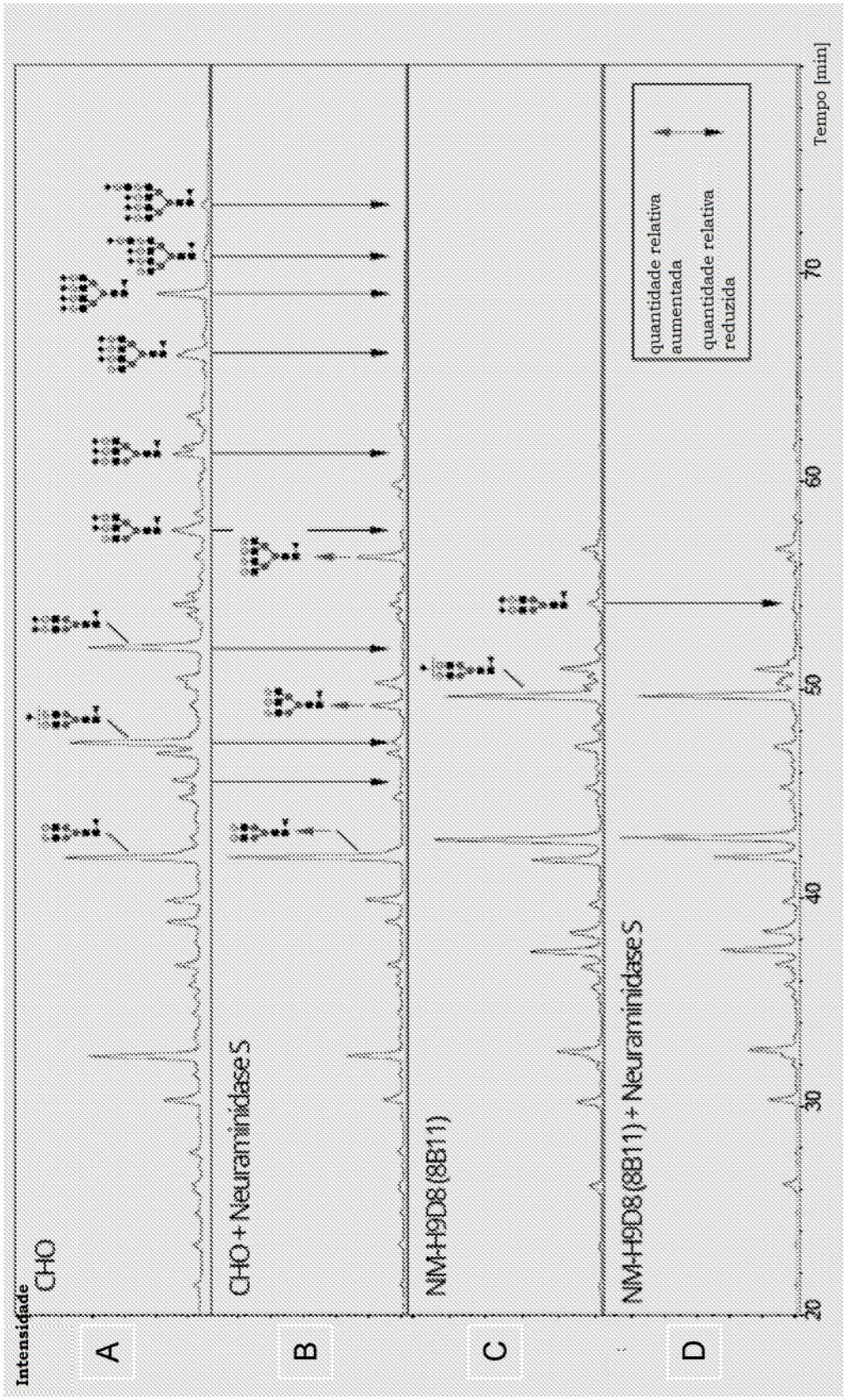

Intensidade
A
CHO
B
CHO + Neuraminidase S
C
NM-H9D8 (8B11)
D
NM-H9D8 (8B11) + Neuraminidase S
quantidade relativa aumentada
quantidade relativa reduzida
20
30
40
50
60
70
Tempo [min]

FIG. 10

“MÉTODOS, COMPOSIÇÕES E CÉLULAS PARA PREPARAR PROTEÍNA SURFACTANTE D (SP-D)”

RESUMO

Algumas modalidades dos métodos e composições fornecidos aqui referem-se à preparação da proteína surfactante-D (SP-D). Algumas modalidades incluem a expressão da SP-D humana em certas linhagens de células e a purificação da SP-D humana destas linhagens de células. Algumas modalidades incluem a preparação de certas formas oligoméricas da SP-D humana.