

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037749

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.05.18

(21) Номер заявки

201790934

(22) Дата подачи заявки

2015.10.23

(51) Int. Cl. A61K 38/21 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/21 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

(54) ВАРИАНТЫ ИНТЕРФЕРОНА α 2b

(31) 2014904326

(32) 2014.10.29

(33) AU

(43) 2017.09.29

(86) PCT/AU2015/050654

(87) WO 2016/065409 2016.05.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ТЕВА ФАРМАСЮТИКАЛЗ
ОСТРЭЙЛИА ПТИ ЛТД (AU)

(56) WO-A2-2013059885

US-A1-20130230517

WO-A1-2014028502

US-A1-20150313965

(72) Изобретатель:

Беренс Коллетт, Дойл Энтони, Кларк

Адам, Поллард Мэттью, Домагала

Тереза (AU)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему первый домен и второй домен, где первый домен содержит полипептидный лиганд, который связывается с ассоциированным с клеточной поверхностью антигеном, а второй домен содержит агликозилированный интерферон- α 2b (IFN α 2b), имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Агликозилированный IFN α 2b дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен или делеций, которые ослабляют активность агликозилированного IFN α 2b.

B1

037749

037749
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим лиганды, направленные против антигенов клеточной поверхности, и агликоизилированный интерферон $\alpha 2b$ (IFN $\alpha 2b$), и к применению этих полипептидов в лечении раковых заболеваний.

Уровень техники

В литературе описано, что многие пептидные и полипептидные молекулы функционируют, взаимодействуя с рецептором на поверхности клетки и путем этого стимулируя, ингибируя или иным образом модулируя биологический ответ, как правило, с участием внутриклеточных сигнальных путей, которые включают указанный рецептор. Примеры таких молекул включают пептидные и полипептидные гормоны, цитокины, хемокины, факторы роста, индуцирующие апоптоз факторы и т.п. Эти молекулы могут быть либо растворимыми, либо могут быть прикреплены к поверхности другой клетки.

В связи с биологической активностью таких молекул некоторые из них можно использовать в качестве терапевтических средств. Несколько пептидных или полипептидных молекул были одобрены регулирующими органами в качестве терапевтических средств, включая, например, гормон роста, инсулин, интерферон, IFN $\alpha 2b$, IFN $\alpha 2a$, IFN β , эритропоэтин, G-CSF и GM-CSF человека. Для многих из них и других пептидов была продемонстрирована терапевтическая активность, но также наблюдается токсичность при введении человеку. Одной из причин токсичности является то, что большинство из этих молекул связываются с рецепторами на различных клетках, включая другие клетки, помимо опосредующих терапевтический эффект. Например, когда IFN $\alpha 2b$ используется для лечения множественной миеломы, его действие основано, по меньшей мере частично, на его связывании с рецепторами интерферонов I типа на клетках миеломы, что, в свою очередь, вызывает снижение пролиферации и, следовательно, ограничивает развитие заболевания. Однако, к сожалению, этот интерферон также связывается с множеством других, здоровых клеток в организме, вызывая ряд других клеточных реакций, некоторые из которых являются отрицательными (например, гриппоподобные симптомы, нейтропения, депрессия). Следствием такой "неспецифичной" активности пептидов является то, что многие пептиды становятся непригодными в качестве потенциальных лекарственных средств. В этом контексте термин "неспецифичная активность" относится к действию на природный рецептор пептида, но на поверхности клеток, отличающихся от клеток, которые опосредуют терапевтически полезные эффекты.

Несмотря на то, что некоторые пептиды, такие как IFN $\alpha 2b$, одобрены для лечения заболеваний, они плохо переносятся из-за своей "неспецифичной" биологической активности.

Неспецифичная активность и связанная с ними плохая переносимость также означают, что лекарственные средства на основе некоторых из этих пептидов невозможно ввести в достаточно высоких дозах, чтобы получить оптимальное терапевтическое воздействие на клетки-мишени, опосредующие терапевтический эффект.

Аналогичным образом, с середины 1980-х гг. известно, что интерфероны, в частности IFN α , способны усиливать апоптоз и снижать пролиферацию определенных раковых клеток. Эти виды биологической активности опосредованы рецепторами интерферонов I типа на поверхности раковых клеток, которые при стимуляции инициируют различные пути передачи сигнала, приводящие к снижению пролиферации и/или к индукции терминальной дифференцировки, или к апоптозу. IFN α был одобрен FDA для лечения некоторых форм рака, включая меланому, почечно-клеточную карциному, В-клеточную лимфому, множественную миелому, хронический миелолейкоз (CML) и волосатоклеточный лейкоз. "Прямой" эффект IFN α на опухолевые клетки опосредован связыванием IFN α непосредственно с рецептором интерферонов I типа на этих клетках и стимуляцией апоптоза, терминальной дифференцировки или снижением пролиферации. Одним "косвенным" эффектом IFN α на нераковые клетки является стимуляция иммунной системы, что может оказывать дополнительное противораковое действие, индуцируя отторжение опухоли иммунной системой.

К сожалению, рецептор интерферонов I типа также присутствует на большинстве нераковых клеток. Активация данного рецептора на таких клетках с помощью IFN α вызывает экспрессию многочисленных провоспалительных цитокинов и хемокинов, что приводит к токсичности. Такая токсичность не позволяет вводить IFN α субъекту в количестве, которое оказывает максимальную антитрополиферативную и проапоптотическую активность на раковые клетки.

В статье Ozzello et al. (Breast Cancer Research and Treatment 25:265-76, 1993) в качестве способа снижения темпов роста опухоли описано ковалентное присоединение IFN α человека к опухолеспецифичному антителу, таким образом локализующее прямую ингибирующую активность IFN α на опухоли, и показано, что такие конъюгаты обладают противоопухолевой активностью в ксенотрансплантатной модели рака человека. Механизм наблюдаемой противораковой активности был приписан прямому действию IFN α на раковые клетки, поскольку IFN α человека, используемый в экспериментах, не взаимодействует заметным образом с мышевым рецептором интерферонов I типа, что могло бы обеспечить косвенный противораковый эффект. Однако вследствие этого отсутствия связывания IFN α человека с мышевыми клетками авторы не смогли оценить токсичность конъюгата антитела с IFN α относительно свободного IFN α . Авторы данной статьи использовали химический способ конъюгации IFN α с антителом.

В статье Alkan et al. (Journal of Interferon Research, volume 4, number 3, p. 355-63, 1984) продемонстрировано, что присоединение IFN α человека к антителу, которое связывается с мембранным антигеном (МА) вируса Эпштейна-Барра (EBV), повышало его антитролиферативное действие в отношении клеток, экспрессирующих антиген EBV-МА. Эта повышенная активность зависит от экспрессии антигена как клетками-мишениями, так и от специфичности связывания антитела. Протестированной клеточной линией была раковая клеточная линия QIMR-WIL (миелобластного лейкоза). Авторы предположили, что присоединение IFN α к антителу может быть использовано в качестве средства для лечения рака, поскольку это приведет к снижению роста опухоли. Alkan et al. не исследовали возможную токсичность этих конъюгатов антитела и IFN α , обусловленную их взаимодействием с нормальными, не содержащими антиген клетками.

Также известно, что антитело и IFN α могут быть соединены между собой путем создания слитой белковой конструкции. Например, в принадлежащем IDEC патенте (WO 01/97844) раскрыто прямое слияние IFN α человека с С-концом тяжелой цепи IgG против опухолевого антигена CD20. Другие группы исследователей описали применение различных линкеров между С-концом тяжелой цепи IgG и IFN α . Например, в патенте US 7456257 раскрыто, что С-конец константной области тяжелой цепи антитела может быть соединен с IFN α через промежуточную, богатую серинами и глицинами (S/G-богатую) линкерную последовательность (GGGGS)_n, где n может равняться 1, 2 или 3, и что нет существенных различий в активности IFN α в слитой белковой конструкции независимо от длины линкера.

Morrison и соавт. (US 2011/0104112 A1; и Xuan C., Steward K.K., Timmerman J.M., Morrison S.L. Targeted delivery of interferon- α via fusion to anti-CD20 results in potent antitumor activity against B-cell lymphoma. Blood 2010;115:2864-71) также описали IFN α , связанный с С-концом тяжелой цепи противо-ракового IgG-антитела с промежуточным S/G-линкером, и отметили, что слияние IgG и линкера с IFN α снижает активность IFN α в отношении клеток, которые не экспрессируют соответствующий антиген на клеточной поверхности) Снижение активности IFN α в этих слитых белковых конструкциях было умеренным по сравнению с неслитым белком IFN α человека (свободным IFN α), действующими на клетки человека, но оказалось более выраженным в отношении действия мышьего IFN α на мышиные клетки) Снижение активности IFN α человека, являющееся результатом его слияния с С-концом антитела, отмеченное Morrison и соавт. и в US7456257, является умеренным и в общем считается недостатком, поскольку это снижает силу действия интерферона. На этот недостаток указывали, например, Rossi и соавт. (Blood vol. 114, No. 18, p. 3864-71), которые использовали альтернативную стратегию присоединения IFN α к опухолеспецифичному антителу таким образом, что не наблюдалось никакой потери активности IFN α .

В общем, в предшествующем уровне техники описано использование высокоактивного интерферона и направленное действие этого интерферона на раковые клетки. Хотя этот подход приводит к увеличению активности интерферона в отношении раковых клеток, он не решает вопрос о действии интерферона на нормальные "нечелевые" клетки. В примерах предшествующего уровня техники, указанных выше, участок IFN α человека в слитом белке антитело-IFN α сохраняет высокую степень активности нативного IFN α при воздействии на клетки человека, которые не экспрессируют соответствующий антиген на своей клеточной поверхности. Эта активность может привести к токсичности, возникающей в результате активации нераковых, нормальных ("нечелевых") клеток с помощью участка IFN α слитого белка) Соответственно, существует необходимость снижения "неспецифичной" активности лекарственных средств на основе IFN α при сохранении "специфичного" терапевтического эффекта таких препаратов) Сохранение специфичной активности и одновременное снижение неспецифичной токсичности этих типов терапевтических агентов могут создать большее окно терапевтических концентраций для терапевтических пептидов. Например, было бы желательно использовать IFN α человека в такой форме, чтобы его действие могло бы быть направлено на раковые клетки при минимизации его воздействия на нормальные клетки человека. В идеале, рецептор интерферонов I типа на раковых клетках будет максимально стимулироваться, тогда как такой же рецептор на нераковых клетках будет стимулироваться минимально) Существует необходимость направления IFN α человека на раковые клетки таким образом, чтобы он оказывал значительно большее действие на раковые клетки, которые несут антиген, чем на нормальные клетки, которые не несут антигена. Такая же логика применима и к другим потенциальным терапевтическим молекулам, например другим цитокинам, пептидным и полипептидным гормонам, хемокинам, факторам роста, индуцирующим апоптоз факторам и т.п.

Логика этого подхода была продемонстрирована в WO 2013/059885 и WO 2014/178820, раскрытие которых включено в данное описание путем перекрестной ссылки.

Краткое изложение сущности изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему первый домен и второй домен, где первый домен содержит полипептидный лиганд, который связывается с ассоциированным с клеточной поверхностью антигеном, а второй домен содержит агликозилированный интерферон человека α 2b (IFN α 2b), имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и где

агликозилированный IFN α 2b дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен или делеций, ослабляющих активность агликозилированного IFN α 2b.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, 61-77, 83 и 87, и последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, 82 и 84.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 81.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 85.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 86.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему SEQ ID NO: 78.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей слитый полипептид по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения опухоли у субъекта, включающему введение субъекту слитого полипептида по настоящему изобретению или композиции по настоящему изобретению, где первый домен слитого полипептида связывается с клетками опухоли.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению слитого полипептида по настоящему изобретению для лечения опухоли, где первый домен слитого полипептида связывается с опухолью.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду (выделенным полинуклеотидам), кодирующему слитый полипептид (слитые полипептиды) по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему один или несколько полинуклеотидов по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к трансформированной клетке, содержащей вектор по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения слитого полипептида "полипептидный лиганд-ослабленный IFN α 2b" в клетках млекопитающих, где слитый полипептид "полипептидный лиганд-ослабленный IFN α 2b" имеет сниженную гетерогенность, и/или повышенное связывание с FcR η , и/или увеличенную селективность в отношении мишени, причем способ включает культивирование рекомбинантной клетки млекопитающего, содержащей полинуклеотид, кодирующий слитый полипептид "полипептидный лиганд-ослабленный IFN α 2b", в котором T106 из последовательности IFN α 2b заменен другой аминокислотой или удален, так что при экспрессии в клетках млекопитающих компонент IFN α 2b в слитом белке является агликозилированным.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Антипролиферативная активность при воздействии на клетки (A) ARP1 и (B) NCI-H929 слитых белков анти-CD38-ослабленный IFN α 2b в формате IgG1 или IgG4 с и без О-гликозилирования IFN α 2b.

Фиг. 2A-2E: Антипролиферативная активность слитых белков анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с различными аминокислотными заменами, удаляющими сайт О-гликозилирования в ослабленном IFN α 2b.

Фиг. 3: Специфичная активность слитых белков (A) A10.21 и (B) A10.43 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с (T106T) и без (T106A) О-гликозилирования в IFN α 2b.

Фиг. 4: Неспецифичная активность слитых белков (A) A10.21 и (B) A10.43 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с (T106T) и без (T106A) О-гликозилирования в IFN α 2b.

Фиг. 5: Неспецифичная активность слитых белков анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с (T106T) и без (T106A или ΔT106) О-гликозилирования в IFN α 2b.

Фиг. 6A-6F: Неспецифичная активность слитых белков анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с различными аминокислотными заменами, удаляющими сайт О-гликозилирования в ослабленном IFN α 2b.

Фиг. 7: Неспецифичная активность слитых белков A10.43 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с (T106T) или без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b.

Фиг. 8: Сила действия субоптимальных доз слитых белков анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с (T106T) или без (T106A) О-гликозилирования при лечении опухолей в мышной модели множественной миеломы.

Фиг. 9: Число заряженных вариантов слитых белков A10.21 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с (T106T) или без (T106A, ΔT106, T106S, T106V, T106G, T106E) О-гликозилирования IFN α 2b, оцениваемое по числу полос на IEF-геле.

Фиг. 10: Число заряженных вариантов слитых белков A10.21 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с

(T106T) или без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b и с разными изотипами Fc, оцениваемое по числу полос на IEF-геле.

Фиг. 11: Число заряженных вариантов сливых белков A10.21 (IgG4 с S228P) анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с (T106T) или без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b в присутствии YTE-замен в константной области антитела, оцениваемое по числу полос на IEF-геле.

Фиг. 12: Число заряженных вариантов сливых белков A10.21 (IgG4 с S228P) анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с (T106T) или без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b в присутствии различных интерферон-ослабляющих замен, оцениваемое по числу полос на IEF-геле.

Фиг. 13: Число заряженных вариантов антител с различной специфичностью; анти-CD138 антитело, анти-HLA-антитело и анти-CD38 антитело (A02.12) (все IgG4 с S228P), сливые с ослабленным IFN α 2b с (T106T) или без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b, оцениваемое по числу полос на IEF-геле.

Фиг. 14: Специфичная активность сливых белков анти-CD38-ослабленный IFN α 2b (A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D)) с (T106T) и без (T106A, ΔT106, T106S, T106V, T106G, T106E) О-гликозилирования IFN α 2b.

Фиг. 15: специфичная активность двух различных сливых белков анти-CD38-антитело-ослабленный IFN α 2b (A02.12 и A10.21, оба IgG4 с S228P), которые связывают различные эпитопы на CD38, с (T106T) или без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b.

Фиг. 16: Специфичная активность сливых белков A10.21 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b (A10.21 IgG4 (S228P) IFN) с (T106T) и без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b с различными интерферон-ослабляющими заменами (R33A, R144I, R145Q, A145K или A145G).

Фиг. 17: Специфичная активность антител с различной специфичностью; анти-CD-138-антитела и анти-HLA-антитела (оба IgG4 с S228P), сливых с ослабленным IFN α 2b с (T106T) или без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b.

Фиг. 18: Специфичная активность сливых белков A10.21 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b (A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D)) с (T106T) и без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b в присутствии YTE-замен в тяжелой цепи антитела.

Фиг. 19: Специфичная активность сливых белков A10.21 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b (A145D) с (T106T) и без (T106A) О-гликозилирования IFN α 2b с различными Fc-изотипами иммуноглобулинов.

Фиг. 20: Индекс селективности сливых белков A10.21 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b с и без О-гликозилирования IFN α 2b в присутствии различных аминокислотных замен для удаления гликозилирования интерферона, YTE-замен в константной области иммуноглобулина для увеличения времени полужизни, ослабления интерферона и Fc-изотипов.

Подробное описание изобретения

В данном описании, если контекст не требует иного, слово "содержать" или его вариации, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного элемента или целого числа, либо группы элементов или целых чисел, но не исключение любого другого элемента или целого числа, либо группы элементов или целых чисел.

Ссылка в данном описании на любую предшествующую публикацию (или информацию, полученную от нее) или любые данные, которые являются известными, не является и не должна рассматриваться в качестве подтверждения, принятия или предположения в какой-либо форме, что предшествующая публикации (или информация, полученная из нее) или известные данные образуют часть общей информации в области деятельности, к которой относится данное описание.

Все публикации, указанные в данном описании, включены путем ссылки во всей полноте.

Следует отметить, что используемые в описании изобретения формы единственного числа включают множественные аспекты, если из контекста явно не следует иное. Например, ссылка на "агент" включает в себя один агент, а также два или несколько агентов; ссылка на "молекулу" включает в себя одну молекулу, а также две или несколько молекул и т.д.

Конструкции по настоящему изобретению представляют собой сливые конструкции из полипептидного лиганда и ослабленного агликозилированного IFN α 2b, которые имеют повышенный индекс антигенных селективности в отношении активации сигнальных путей благодаря действию как лиганда, направленного на рецептор клеточной поверхности на клетке, представляющей интерес, так и ослабленного IFN α 2b с пониженной аффинностью к интерфероновому рецептору на клеточной поверхности. Эти конструкции основаны на обнаружении факта, изложенного в документе WO 2013/059885, состоящего в том, что в контексте сливой конструкции антитела и интерферона, интерфероновая часть может быть мутирована таким образом, что интерфероновая активность на не представляющих антиген (антиген-отрицательных) клетках резко ослабляется, тогда как интерфероновая активность на антиген-положительных клетках ослабляется лишь незначительно, либо вообще не ослабляется. Такие конструкции имеют силу действия выше на один, два, три, четыре или пять порядков в отношении антиген-положительных клеток по сравнению с антиген-отрицательными клетками, чем проявляемая свободным интерфероном. В одном варианте осуществления изобретения конструкция антитело-ослабленный ин-

терферон сохраняет по меньшей мере 1%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% силы действия в отношении антиген-положительных клеток по сравнению с неослабленным свободным (т.е. неприсоединенным к антителу) интерфероном. Кроме того, в одном варианте осуществления изобретения конструкция антитело-ослабленный интерферон сохраняет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 90% от максимальной активности неослабленного свободного (т.е. неприсоединенного к антителу) интерферона; в этом контексте "максимальную активность" следует понимать как силу сигнальной активности (или ее нижеследующего эффекта) на высоком плато-участке кривой доза-ответ, где дальнейшее увеличение количества агента не приводит к дополнительному повышению ответа).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что неожиданное преимущество достигается с помощью конструкций, содержащих агликозилированный IFN α 2b, по сравнению с конструкциями, содержащими О-гликозилированный IFN α 2b. В некоторых вариантах осуществления эти преимущества включают в себя одно или несколько из: повышения специфичной активности, повышения селективности к мишени и повышения аффинности к FcR η , одновременно обеспечивая менее гетерогенный продукт, чем О-гликозилированный IFN α 2b, при получении в системе экспрессии в клетках млекопитающих. Улучшенное связывание с FcR η является желательным для улучшения фармакокинетики биотерапевтического агента, который содержит Fc-область. Повышение селективности к мишени является желательным, поскольку это потенциально снижает обусловленную неспецифичностью токсичность, одновременно по существу сохраняя специфичную активность) Снижение гетерогенности позволяет увеличить выход очищенного продукта из системы культивирования в клетках млекопитающих.

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему первый и второй домены, где первый домен содержит полипептидный лиганд, который связывается с ассоциированным с клеточной поверхностью антигеном, а второй домен содержит агликозилированный интерферон α 2b (IFN α 2b), имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и где агликозилированный IFN α 2b дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен или делеций, которые ослабляют активность агликозилированного IFN α 2b.

В варианте осуществления настоящего изобретения последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W или Y. Они представляют собой замену T106, обычно присутствующего в IFN α 2b человека, на природную аминокислоту, которая не позволяет О-гликозилирование в этом положении при получении в культуре клеток млекопитающих. В другом варианте осуществления настоящего изобретения последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 2. Она представляет собой удаление остатка T106, обычно присутствующего в IFN α 2b человека, что также удаляет участок О-гликозилирования, присутствующий в этой молекуле. Как показано в данном документе, каждая из замен или делеций удаляет участок О-гликозилирования у ослабленного IFN α 2b человека и уменьшает гетерогенность молекулы, определяемую в IEF-геле, при экспрессии в клетках СНО, одновременно по меньшей мере сохраняя по существу способность ослабленного IFN α 2b связывать интерфероновые рецепторы на клеточной поверхности и инициировать дальнейшую передачу сигнала в клетке.

В дополнительных вариантах осуществления последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, модифицированная ослабляющей мутацией, выбранной из группы, состоящей из L15A, R22A, R23A, S25A, L26A, F27A, L30A, L30V, K31A, D32A, R33A, R33K, R33Q, H34A, Q40A, D114R, L117A, R120A, R120E, R125A, R125E, K131A, E132A, K133A, K134A, M148A, R149A, S152A, L153A, N156A, (L30A, H57Y, E58N и Q61S), (M148A, H57Y, E58N и Q61S), (L153A, H57Y, E58N и Q61S), (R144A, H57Y, E58N и Q61S), (N65A, L80A, Y85A и Y89A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и D114A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и L117A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и R120A), (Y85A, Y89A и D114A), (D114A и R120A), (L117A и R120A), (L117A, R120A и K121A), (R120A и K121A), (R120E и K121E), замены R в положении 144 на A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V или Y, замены A в положении 145 на D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V или Y, и удаления остатков с L161 по E165.

В дополнительных вариантах осуществления последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 2, модифицированная ослабляющей мутацией, выбранной из группы, состоящей из L15A, R22A, R23A, S25A, L26A, F27A, L30A, L30V, K31A, D32A, R33A, R33K, R33Q, H34A, Q40A, D113R, L116A, R119A, R119E, R124A, R124E, K130A, E131A, K132A, K133A, M147A, R148A, S149A, L152A, N155A, (L30A, H57Y, E58N и Q61S), (M147A, H57Y, E58N и Q61S), (L152A, H57Y, E58N и Q61S), (R143A, H57Y, E58N и Q61S), (N65A, L80A, Y85A и Y89A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и D113A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и L116A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и R1190A), (Y85A, Y89A и D113A), (D113A и R119A), (L116A и R119A), (L116A, R119A и K120A), (R119A и K120A), (R119E и K120E), замены R в положении 143 на A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V или Y, замены A в положении 144 на D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V или Y, и удаления остатков с L160 по E164.

В другом варианте осуществления последовательность агликозилированного IFN α 2b, модифицированную ослабляющей мутацией, выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-30 и

SEQ ID NO: 32-47.

В другом варианте осуществления ассоциированный с клеточной поверхностью антиген выбирают из группы, состоящей из CD38, CD138, RANK-лиганд, HM1.24, CD56, CS1, CD20, CD74, IL-6R, BLYS (BAFF), BCMA, HLA-SR, HLA-DR, кининогена, бета2-микроглобулина, FGFR3, ICAM-1, матриптазы, CD52, EGFR, GM2, альфа-4-интегрина, IFG-1R, KIR, CD3, CD4, CD8, CD24, CD44, CD69, CD71, CD79, CD83, CD86, CD96, HLA, PD-1, ICOS, CD33, CD115, CD11c, CD19, CD52, CD14, FSP1, FAP, PDGFR-альфа, PDGFR-бета, ASGR1, ASGR2, FSP1, RTI140/Ti-альфа, HTI56, рецептора VEGF, CD241 (продукта гена RHAG), CD-117 (c-Kit), CD71 (рецептора трансферрина), CD36 (рецептора тромbosпондина), CD34, CD45RO, CD45RA, CD115, CD168, CD235, CD236, CD237, CD238, CD239 и CD240.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий участок.

В другом варианте осуществления полипептидный лиганд представляет собой антитело, которое связывает CD38. Предпочтительно, чтобы последовательность V_H антитела выбирали из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48-56 и 58, и чтобы последовательность V_L антитела выбирали из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, 82 и 84.

В другом варианте осуществления изобретения полипептидный лиганд представляет собой антитело, которое связывает CD138. Предпочтительно, чтобы последовательность V_H антитела представляла собой последовательность SEQ ID NO: 59 и чтобы последовательность V_L антитела представляла собой последовательность SEQ ID NO: 85.

В другом варианте осуществления полипептидный лиганд связывается с RANK-лигандом. Предпочтительно, чтобы последовательность полипептидного лиганда представляла собой SEQ ID NO: 57.

В другом варианте осуществления первый домен соединен со вторым доменом через пептидную связь. Первый домен может быть соединен со вторым доменом напрямую пептидной связью ("линкером с нулевой длиной") или через пептидный линкер от 1 до 20 аминокислот в длину. Линкер может представлять собой (SGGGGS)_n, где n равно от 1 до 3. Примеры линкеров включают в себя SGGGGS и SGGGGSGGGSGGGGS.

В другом варианте осуществления изобретения C-конец первого домена соединен с N-концом второго домена.

В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность первого домена является гликозилированной.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, 61-77, 83 и 87, и последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, 82 и 84.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 81.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 85.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 86.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему SEQ ID NO: 78.

Как будет понятно из приведенного выше обсуждения, конкретными формами слитого полипептида по настоящему изобретению являются следующие:

a) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является A.

b) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является C.

c) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является D.

d) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является E.

e) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является F.

f) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является G.

g) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является H.

h) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является I.

i) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, где остатком в положении 106 является K.

SEQ ID NO: 1, модифицированная мутациями R120A и K121A, или SEQ ID NO: 2, модифицированная мутациями R119A и K120A.

fff) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, модифицированная мутациями R120E и K121E, или SEQ ID NO: 2, модифицированная мутациями R119E и K120E.

ggg) Слитый полипептид, в котором последовательность агликозилированного IFN α 2b SEQ ID NO: 1 модифицируют путем замены R в положении 144 на A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V или Y, или SEQ ID NO: 2 модифицируют путем замены R в положении 143 на A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V или Y.

hhh) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, модифицированная путем замены A в положении 145 на D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V или Y, или SEQ ID NO: 2, модифицированная путем замены A в положении 144 на D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V или Y.

iii) Слитый полипептид, в котором последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, модифицированная путем удаления остатков с L161 по E165, или SEQ ID NO: 2, модифицированная путем удаления остатков с L161 по E165.

jjj) Слитый полипептид по п.1, где последовательность агликозилированного IFN α 2b выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-30 и SEQ ID NO: 32-47.

Термин "антитело", используемый в данном описании, относится в широком смысле к любой молекуле иммуноглобулина (Ig), состоящей из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, или к любому функциональному фрагменту, мутанту, варианту или их производному, которые сохраняют важные признаки молекулы Ig по связыванию эпитопа. Такие форматы антител (мутант, вариант или производное) известны в данной области техники, не ограничивая варианты осуществления, которые рассматриваются ниже.

В полноразмерном антителе каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно указывается в данном документе как HCVR или V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно указывается в данном документе как LCVR или V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена - CL, который у человека может относится к κ или λ классу. V_H- и V_L-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющие комплементарность областями (CDR), чередующимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CD и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Молекулы иммуноглобулинов могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Термин "антителосвязывающий домен" или "антителосвязывающий участок" антитела, используемый в настоящем описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела или белка, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном (например, с CD38). Было показано, что антителосвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Такие варианты антител могут также иметь биспецифичные, с двойной специфичностью или полиспецифичные форматы, которые специфично связываются с двумя или несколькими различными антигенами. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антителосвязывающий участок" антитела, включают: (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменом V_L, V_H, CL и CH1; (ii) с F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента в дополнение к участку шарнирной области, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) доменное антитело (dAb) (Ward et al. 1989 Nature 341 544-6, Winter et al., PCT-публикация WO 90/05144 A1, включенные в данное описание путем ссылки), которое содержит один вариабельный домен; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов синтетическим линкером, который позволяет им синтезироваться в виде одной белковой цепи, в которой области V_L и V_H образуют пару с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. 1988 Science 242 423-6; Huston et al. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 5879-83). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антителосвязывающий участок" антитела. Также охвачены другие формы одноцепочечных антител, такие как диантитела. Диантитела представляют собой двухвалентные, биспецифичные антитела, в которых домены V_H и V_L экспрессируются в одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить образование пары между двумя доменами одной цепи, тем самым заставляя домены образовывать пары с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антителосвязывающих участка (см., например, Hollinger, P., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al., 1994, *Structure*, 2:1121-1123). Такие связывающие участки антител известны в данной области техники (Kontermann and Dubel eds., *Antibody Engineering* 2001 Springer-Verlag, New York. 790 р., ISBN 3-540-41354-5). В одном варианте осуществления связывающий участок антитела представляет собой Fab-фрагмент.

Антитело, описанное в настоящем документе, может представлять собой гуманизированное антитело. Термин "гуманизированное антитело" следует понимать, как обозначающий белок, содержащий вариабельные области, подобные вариабельным областям антитела человека, которые включают CDR из антитела животного (например, мыши или крысы, или примата кроме человека), пересаженные или вставленные в FR антитела человека (этот тип антитела также указывается как "антитело с пересаженными CDR"). Гуманизированные антитела также включают в себя белки, в которых один или несколько остатков белка человека модифицированы в результате одной или нескольких аминокислотных замен и/или один или несколько остатков в FR белка человека заменены соответствующими остатками из белка животного. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которые не найдены ни в антителе человека, ни в антителе животного. Любые дополнительные области белка (например, Fc-область) обычно принадлежат человеку. Гуманизация может быть выполнена с использованием способа, известного в данной области техники, например, приведенного в US 5225539 US 6054297 US 7566771 или US 5585089. Термин "гуманизированное антитело" также включает в себя супергуманизированное антитело, например, описанное в US 7732578.

Антитело, описанное в данном документе, может принадлежать человеку. Термин "антитело человека", используемый в данном описании, относится к белкам, имеющим вариабельные и, необязательно, константные области антител, найденные у человека, например, в зародышевой линии человека или в соматических клетках, или в библиотеках, полученных с использованием таких областей. Антитела "человека" могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека, например, мутации, введенные случайным или сайт-направленным мутагенезом *in vitro* (в частности, мутации, которые включают консервативные замены, или мутации в небольшом числе остатков белка, например в 1, 2, 3, 4 или 5 остатках белка). Эти "антитела человека" необязательно должны быть получены в результате иммунного ответа у человека, а напротив, они могут быть получены с использованием рекомбинантных способов (например, скрининга библиотеки фагового дисплея) и/или с использованием трансгенного животного (например, мыши), содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую константные и/или вариабельные области антител человека, и/или с использованием направленного отбора (например, описанного в US 5565332). Этот термин также включает в себя аффинно зрелые формы таких антител. Для целей настоящего изобретения белок человека также будет рассматриваться как включающий белок, содержащий FR из антитела человека или FR, включающие последовательности из консensusной последовательности FR человека, и в котором одна или несколько из CDR являются случайными или полуслучайными, например, как описано в US 6300064 и/или в US 6248516.

Участок антитела в полипептидах по настоящему изобретению может представлять собой полноразмерное антитело любого класса, предпочтительно, IgG1, IgG2 или IgG4. Константные домены таких антител, предпочтительно, принадлежат человеку. Вариабельные области таких антител могут иметь животное происхождение или предпочтительно принадлежат человеку либо являются гуманизированными. Вместо полноразмерных антител также могут быть использованы фрагменты антител.

Термин "антитело" также включает сконструированные антитела. Будет очевидно, что существует множество вариантов сконструированных антител (например, мышиные моно克лональные, химерные, гуманизированные и человеческие моно克лональные антитела, одноцепочечные фрагменты вариабельных областей антител (scFv), мини-антитела, аптамеры, а также биспецифичные антитела и диантитела, описанные выше).

Одиночные домены вариабельной области (называемые dAb) описаны, например, в (Ward et al., 1989, *Nature*, 341:544-546; Hamers-Casterman et al., 1993, *Nature*, 363: 446-448; Davies & Riechmann, 1994, *FEBS Lett.* 339:285-290).

Мини-антитела представляют собой низкомолекулярные версии полноразмерных антител, которые кодируют в одной цепи необходимые элементы полноразмерного антитела. Соответственно, мини-антитело состоит из доменов V_H и V_L нативного антитела, слитых с шарнирной областью и СН3-доменом молекулы иммуноглобулина, как, например, раскрыто в патенте США № 5837821.

В альтернативном варианте осуществления сконструированное антитело может содержать неиммуноглобулиновые белковые каркасы. Например, можно упомянуть статью Ku & Schutz, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6552-6556, в которой раскрыт белок цитохром b562 с четырехспиральным пучком, имеющий две петли, рандомизированных для создания CDR, которые были выбраны для связывания с антигеном.

Существует множество не относящихся к антителам распознающих белков или каркасных белковых доменов, которые могут использоваться в качестве антигенсвязывающих доменов в конструкциях по настоящему изобретению. Они включают каркасы, основанные на ассоциированном с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигене 4 (CTLA-4) (Evibody; US7, 166697); трансферрине человека (Trans-body); трехспиральном пучке из Z-домена белка A (Affibody); мономерном или тримерном домене человеческого

лектина С-типа (Tetranectin); десятом домене человеческого фибронектина III типа (AdNectin); домене Кунитц-типа из ингибитора трипсина человека или крупного рогатого скота; дефензине А насекомых (IICA29), APPI (Кунитц-домены); липокалинах, FABP, билин-связывающем белке, аполипопротеине D (антикалинах); молекуле α -кристаллина или убиквитина человека (Afilin); ингибиторе трипсина II (Microbody); α 2p8 или анкириновом повторе (белках с повторяющимися мотивами), чаридотоксine (токсинах скорпионов), Min-23, целлюлозосвязывающем домене (Knottin); неокарциностатине, CBM4-2 и тен-дамистате.

Кроме того, в дополнение к описанным выше каркасам на основе доменов антител или других белковых укладок, не относящихся к антителам, существуют природные лигандсвязывающие белки или белковые домены, которые могут быть использованы в качестве лиганд-связывающих доменов в данном изобретении. Например, белковые домены, которые обладают лигандсвязывающими свойствами, включают внеклеточные домены рецепторов, PDZ-модули сигнальных белков, таких как Ras-связывающий белок AF-6, молекулы адгезии и ферменты.

Используя способы, хорошо известные в данной области техники, можно усилить связывание, например, путем созревания аффинности или снизить иммуногенность путем удаления предсказанных мотивов, связывающих молекулы МНС II класса. Терапевтическая полезность антител, описанных в данном документе, может быть дополнительно повышена за счет модуляции их функциональных характеристик, таких как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), время полужизни в сыворотке, биораспределение и связывание с рецепторами Fc, или сочетание любой из них. Эти модуляции могут быть осуществлены с помощью белково-инженерных, гликоинженерных или химических способов. В зависимости от требуемого терапевтического применения может быть выгодным увеличить или уменьшить любой из этих типов активности.

Пример гликоинженерии с использованием способа Potelligent® описан в Shinkawa T. et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278: 3466-73.

В данной области техники известно множество способов созревания аффинности антител. Многие из них основаны на общей стратегии создания панелей или библиотек вариантов белков путем мутагенеза с последующим отбором и/или скринингом по увеличению аффинности. Мутагенез часто выполняется на уровне ДНК, например, с помощью подверженной ошибкам ПЦР (Thie, Voedisch et al. 2009, *Methods Mol. Biol.* 525:309-322), с помощью перетасовки генов (Kolkman and Stemmer 2001, *Nat. Biotechnol.* May; 19(5):423-8), с использованием мутагенных химических соединений или излучения, с использованием "мутагенных" штаммов с подверженным ошибкам механизмом репликации (Greener, 1996, *In Vitro Mutagenesis Protocols*. Humanpress, NJ) или с помощью подходов соматического гипермутагенеза, в которых используются природные механизмы созревания аффинности (Peled, Kuang et al. 2008, *Annu Rev. Immunol.* 26:481-511). Мутагенез также может быть выполнен на уровне РНК, например, путем использования 0|3-репликаз (Kopsidas, Roberts et al. 2006, *Immunol. Lett.* 2006 Nov. 15; 107(2):163-8)). Способы на основе библиотек, позволяющие скрининг на улучшенные варианты белков, могут быть основаны на различных методиках представления (дисплея), таких как представление на фагах, дрожжевых клетках, рибосомах, бактериальных клетках или клетках млекопитающих, и они хорошо известны в данной области техники (Benhar 2007, *Expert. Opin. Biol. Ther.* May; 7(5):763-79)). Созревание аффинности может быть достигнуто с помощью более направленных/прогностических способов, например сайты-направленного мутагенеза или синтеза генов, руководствуясь результатами 3D-моделирования белков (см., например, Queen, Schneider et al. 1989, *PNAS*, 86(24):10029-33; или патенты США 6180370 или 5225539).

Способы повышения ADCC были описаны в статьях Ferrara, Brunker et al. 2006, *Biotechnol. Bioeng.*; 93:851-61; Li, Sethuraman et al. 2006, *Nat. Biotechnol.*; 24:210-5; Stavenhagen, Gorlatov et al. 2007, *Cancer Res.* 67:8882-90; Shields, Namenuk et al. 2001, *J. Biol. Chem.*; 276:6591-604; Shinkawa, Nakamura et al. 2003, *J. Biol. Chem.*; 278:3466-73 и в WO 2008/006554.

Способы повышения CDC были описаны в статьях Idusogie, Wong et al. 2001, *J. Immunol.*; 176:346-56; Dall' Acqua, Cook et al. 2006, *J. Biol. Chem.*; 281:23514-24; Michaelsen, Aase et al. 1990, *Scand. J. Immunol.*; 32:517-28; Brekke, Bremnes et al. 1993, *Mol. Immunol.*; 30:1419-25; Tan, Shopes et al. 1990, *PNAS*; 87:162-6 и Norderhaug, Brekke et al. 1991, *Eur. J. Immunol.*; 21:2379-84.

Ссылки на описание способов повышения ADCC и CDC, включают Natsume, In et al. 2008, *Cancer Res.* 68:3863-72. Раскрытие каждой из этих ссылок включено в настоящее описание посредством перекрестной ссылки. В некоторых вариантах осуществления может быть выгодно уменьшить или устраниить ADCC- и CDC-виды активности компонентов антитела в полипептиде по изобретению, так чтобы активность IFN α 2b являлась основной активностью полипептида, которая модулирует выживаемость клеток-мишеней.

Ряд способов модуляции времени полужизни антител в сыворотке и биораспределения основан на модификации взаимодействия между антителом и неонатальным Fc-рецептором (FcRn)-рецептором, имеющим ключевую роль в защите от катаболизма IgG, а также в поддержании концентрации антител в сыворотке крови. Dall'Acqua и др. описывают замены в Fc-области IgG1, которые повышают аффинность

связывания с FcRn, тем самым увеличивая время полужизни в сыворотке (Dall'Acqua, Woods et al. 2002, J. Immunol.; 169:5171-80) и дополнительно демонстрируя улучшенную биодоступность и модуляцию ADCC-активности с помощью тройной замены M252Y/S254T/T256E (с нумерацией остатков в соответствии с системой нумерации EU) или тройной замены M265Y/S267T/T269 (с нумерацией остатков в соответствии с системой нумерации Кабата) (Dall'Acqua, Kiener et al. 2006, J. Biol. Chem.; 279:6213-6)) См. также патенты США № 6277375, 6821505 и 7083784. Hinton и др. описали аминокислотные замены в положениях 250 и 428 константного домена, которые обуславливают увеличение времени полужизни *in vivo* (Hinton, Johlfs et al. 2004, J. Biol. Chem.; 279:6213-6; Hinton, Xiong et al. 2006, J. Immunol.; 176:346-56)) См. также патент США № 7217797. Petkova и др. описали аминокислотные замены в положениях 307, 380 и 434 константного домена, которые обуславливают увеличение времени полужизни *in vivo* (Petkova, Akilesh et al. 2006, Int. Immunol.; 18:1759-69)) См. также Shields et al. 2001, J. Biol. Chem.; 276:6591-604 и WO 2000/42072. Другие примеры аминокислотных замен в константном домене, которые модулируют связывание с Fc-рецепторами и последующие функции, опосредованные этими рецепторами, включая связывание с FcRn и время полужизни в сыворотке, описаны в патентных заявках США № 20090142340, 20090068175 и 20090092599. Замена, указываемая в данном документе как "S228P", которая пронумерована в соответствии с системой нумерации EU, у Кабата также указывается как "S241P" в соответствии с Rabat и др. (1987 Sequences of proteins of immunological interest. United States Department of Health and Human Services, Washington DC). Эта замена стабилизирует шарнирную область молекул IgG4, обеспечивая такой же эффект создания последовательности ядра шарнирной области, как и в изотипах IgG1 или IgG2 антител. Это приводит к снижению спонтанной диссоциации и реассоциации тяжелых цепей, что часто приводит к образованию гетеродимерных IgG4-антител.

Гликаны, связанные с молекулами антител, как известно, влияют на взаимодействие антитела с Fc-рецепторами и рецепторами гликанов, и, таким образом, влияют на активность антител, в том числе на время полужизни в сыворотке (Kaneko, Nimmerjahn et al. 2006, Science; 313:670-3; Jones, Papas et al. 2007, Glcobiology; 17:529-40 и Kanda, Yamada et al. 2007, Glycobiology; 17:104-18). Поэтому некоторые гликоформы, которые модулируют желательную активность антител, могут обеспечивать терапевтическое преимущество.

Способы получения генно-инженерных гликоформ антител известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, те, которые описаны в патентах США № US 6602684, US 7326681, US 7388081 и в WO 2008/006554.

Увеличение времени полужизни путем добавления полиэтиленгликоля (ПЭГ) широко используется для увеличения времени полужизни белков в сыворотке, что описано, например, в Fishburn 2008, J. Pharm. Sc.i; 97:4167-83.

Будет понятно, что в последовательностях по настоящему изобретению можно будет осуществить консервативные аминокислотные замены. Под "консервативной заменой" понимаются аминокислоты, имеющие аналогичные свойства. В контексте данного описания, в качестве консервативных замен следует рассматривать следующие группы аминокислот: H, R и K; D, E, N и Q; V, I и L; C и M; S, T, P, A и G и F, Y и W. Однако не предполагается, что в сайтах ослабления и/или гликозилирования выполняются замены, кроме тех, что указаны специально.

Термин "антитело, ассоциированный с клеточной поверхностью", используемый в данном описании, относится в широком смысле к любому антителу, экспрессируемому на поверхности клеток, включая, без ограничения, злокачественные клетки, или инфицированные или чужеродные клетки.

В некоторых аспектах настоящего изобретения, конструкции слитого полипептида или композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения пациентов с раковыми заболеваниями. Виды раковых заболеваний, рассматриваемые в данном описании, включают группу заболеваний и расстройств, которые характеризуются неконтролируемым клеточным ростом (например, образованием опухоли) без какой-либо дифференцировки этих клеток в специализированные и отличающиеся друг от друга клетки. Такие заболевания и расстройства включают: ABL1-протоонкоген, связанные со СПИДом виды рака, невриному слухового нерва, острый лимфолейкоз, острый миелолейкоз, аденокистозную карциному, адренокортикальный рак, идиопатическую миелоидную метаплазию, алопецию, альвеолярную саркому мягких тканей, анальный рак, ангиосаркому, апластическую анемию, астроцитому, атаксиотелангиэктазию, базально-клеточный рак (кожи), рак мочевого пузыря, раковые заболевания костной ткани, рак толстой кишки, глиому ствола мозга, опухоли мозга и ЦНС, рак молочной железы, карциноидные опухоли, рак шейки матки, опухоли мозга у детей, детские раковые заболевания, детскую лейкемию, детскую саркому мягких тканей, хондросаркому, хориокарциному, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, колоректальный рак, кожную Т-клеточную лимфому, возникающуюся дерматофиброзаркому, десмопластическую мелкокругл клеточную опухоль, протоковую карциному, раковые заболевания эндокринной системы, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга, рак внепеченочных желчных путей, рак глаза, глаз: меланому, ретинобластому, рак фалlopьевых труб, анемию Фанкони, фиброзаркому, рак желчного пузыря, рак желудка, желудочно-кишечные раковые заболевания, желудочно-карциноидную опухоль, рак мочеполовой системы, герминальноклеточную опухоль, гестационную трофобластическую болезнь, глиому, гинекологические рако-

вые заболевания, гематологические злокачественные новообразования, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, наследственный рак молочной железы, гистиоцитоз, болезнь Ходжкина, вирус папилломы человека, пузырный занос, гиперкальциемию, рак гипофаринкса, внутриглазную меланому, рак островковых клеток, саркому Капоши, рак почки, гистиоцитоз клеток Лангерганса, рак гортани, лейомиосаркому, лейкоз, синдром Ли-Фраумените, рак губы, липосаркому, рак печени, рак легкого, лимфедему, лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, мужской рак молочной железы, злокачественную палочковидную опухоль почки, медуллобластому, меланому, рак клеток меркеля, мезотелиому, метастатический рак, рак рта, множественную эндокринную неоплазию, грибовидный микоз, миелодиспластические синдромы, множественную миелому, миелопролиферативные расстройства, назальный рак, рак носоглотки, нефробластому, нейробластому, нейрофиброматоз, синдром хромосомной нестабильности Ниймегена, немеланомный рак кожи, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), глазные раковые заболевания, рак пищевода, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак придаточных пазух, рак парашитовидной железы, рак околоушной железы, рак полового члена, периферическую нейроэктодермальную опухоль, рак гипофиза, истинную полицитемию, рак предстательной железы, редкие раковые заболевания и связанное расстройства, почечноклеточную карциному, ретинобластому, рабдомиосаркому, синдром Ротмунда-Томсона, рак слюнной железы, саркому, шванному, синдром Сезари, рак кожи, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак кишечника, саркому мягких тканей, опухоли спинного мозга, сквамозноклеточную карциному (кожи), рак желудка, синовиальную саркому, рак яичек, рак тимуса, рак щитовидной железы, переходноклеточный рак (мочевого пузыря), переходноклеточный рак (почек-таза-мочеточника), трофобластный рак, уретральный рак, рак мочевой системы, уроплакины, саркому матки, рак матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса. В одном варианте осуществления опухоль выбрана из группы из множественной миеломы или неходжкинской лимфомы.

Как предусмотрено для лечения ракового заболевания, участки антитела из слитых конструкций по настоящему изобретению могут связываться с опухоле-ассоциированными антигенами, т.е. антигенами клеточной поверхности, которые избирательно экспрессируются раковыми клетками или сверхэкспрессируются в раковых клетках по сравнению с большинством нормальных клеток. Существует множество опухоле-ассоциированных антигенов (ТАА), известных в данной области техники. Неограничивающие примеры ТАА включают: фермент тирозиназу; меланомный антиген GM2; альфа-фетопротеин (AFP); карциноэмбриональный антиген (CEA); муцин 1 (MUC1); рецептор эпидермального фактора роста человека (HER2/Neu); онкобелок Т-клеточный лейкемии/лимфомы 1 (TCL1). Примерами ТАА, ассоциированных с рядом различных видов раковых заболеваний, являются теломераза (hTERT); простат-специфический мембранный антиген (PSMA); урокиназный активатор плазминогена и его рецептор (uPA/uPAR); фактор роста сосудистого эндотелия и его рецептор (VEGF/VEGFR); внеклеточной индуктор матриксных металлопротеиназ (EMMPRIN/CD147); рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); тромбоцитарный фактор роста и его рецептор (PDGF/PDGFR), а также c-kit (CD117).

Список других ТАА содержится в US 2010/0297076, раскрытие которого включено в настоящее описание путем ссылки. Особый интерес представляют антигены клеточной поверхности, ассоциированные с клетками множественной миеломы, лейкоза или лимфомы, включая, но не ограничиваясь ими, CD38, CD138, CD79, CS1 и HM1.24. В одном варианте осуществления изобретения антигеном для конструкций лиганд-ослабленный интерферон, например для конструкции антитело-ослабленный интерферон, является CD38.

CD38 представляет собой трансмембранный гликопротеин II типа весом 46 кД. Он имеет короткий N-концевой цитоплазматический хвост из 20 аминокислот, одну трансмембранную спираль и длинный внеклеточный домен из 256 аминокислот (Bergsagel, P., Blood; 85:436, 1995 and Liu, Q., Structure, 13:1331, 2005). Он экспрессируется на поверхности многих клеток иммунной системы, включая CD4- и CD8-положительные Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, моноциты, плазматические клетки и на значительной части нормальных клеток-предшественников из костного мозга (Malavasi, F., Hum. Immunol. 9:9, 1984). Однако в лимфоцитах экспрессия, по-видимому, зависит от состояния дифференцировки и активации клетки. Покоящиеся Т- и В-клетки являются отрицательными по этому антигену, тогда как незрелые и активированные лимфоциты являются преимущественно положительными по экспрессии CD38 (Funaro, A., J. Immunol. 145:2390, 1990). Дополнительные исследования указывают на экспрессию мРНК в органах, не относящихся к гемопоэтической системе, таких как поджелудочная железа, мозг, селезенка и печень (Koguma, T., Biochim. Biophys. Acta 1223:160, 1994).

CD38 представляет собой многофункциональный эктофермент, который участвует в трансмембранный передаче сигнала и клеточной адгезии. Он также известен в качестве гидролазы циклической ADP-рибозы, поскольку он может превращать NAD⁺ и NADP⁺ в cADPR, ADPR и NAADP, в зависимости от внеклеточного pH. Эти продукты индуцируют внутриклеточную мобилизацию Ca²⁺, что может привести к фосфорилированию тирозина и активации клетки. CD38 также является рецептором, который может взаимодействовать с лигандом, CD31. Активация рецептора через CD31 приводит к внутриклеточным событиям, включая мобилизацию Ca²⁺, активацию клеток, пролиферацию, дифференцировку и миграцию (обзор приведен в Deaglio, S., Trends in Mol. Med. 14:210, 2008).

CD38 экспрессируются на высоком уровне на клетках множественной миеломы, в большинстве случаев Т- и В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, некоторых острых миелоцитарных лейкозов, лимфом клеток фолликулярного центра и Т-лимфобластных лимфом. (Malavasi F., J. Clin Lab Res., 22:73, 1992). Недавно экспрессия CD38 стала надежным прогностическим маркером В-клеточного хронического лимфобластного лейкоза (B-CLL) (Ibrahim, S., Blood. 98:181, 2001 and Durig, J., Leuk. Res. 25:927, 2002). Независимыми группами было продемонстрировано, что пациенты с B-CLL, имеющие с CD38-положительный клон, характеризовались неблагоприятным клиническим течением с более продвинутой стадией болезни, плохой восприимчивостью к химиотерапии и более коротким временем выживаемости (Morabito, F., Haematologica. 87:217,2002). Постоянная и усиливающаяся экспрессия CD38 на лимфоидных опухолях делает его привлекательной мишенью для технологий терапевтических антител.

Предпочтительными антигенами для разработки конструкций противораковых слитых белков из антитела и ослабленного агликозилированного IFN α 2b являются такие антигены, которые селективно или большей степени экспрессируются на раковых клетках, чем на большинстве других, нетрансформированных клеток в организме. Небелковые примеры таких антигенов включают сфинголипиды, ганглиозид GD2 (Saleh et al., 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), ганглиозид GD3 (Shitara et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), ганглиозид GM2 (Livingston et al., 1994, J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), ганглиозид GM3 (Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53:5244-5250) и углеводные антигены Lewis x , Lewis y и Lewis xy , которые могут быть представлены на белках или гликолипидах. Примерами белковых антигенов являются HER-2/Neu, папилломавирус-Е6 или -E7 человека, MUC-1; панкарциномный антиген KS 1/4 (Perez and Walker, 1990, J. Immunol. 142:3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4):407-415); антиген карциномы яичника CA125 (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51(2):468-475); фосфат простатической кислоты (Tailor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18 (16):4928); простат-специфичный антиген (Henttu and Viiko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(2):903-910; Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53:227-230); ассоциированный с меланомой антиген p97 (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Inst. 81(6):445-446); меланомный антиген gp75 (Vijayasaradahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171(4):1375-1380); простат-специфичный мембранный антиген; карциноэмбриональный антиген (CEA) (Foon et al., 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13:294), MUC16 (антитела включают MJ-170, MJ-171, MJ-172 и MJ-173 [US 7202346], 3A5 [US 7723485]), NMB (US 8039593), злокачественный лимфоцитарный антиген человека APO-1 (Bernhard et al., 1989, Science 245:301-304); высокомолекулярный меланомный антиген (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, Cancer 59:55-63; Mittelman et al., 1990, J. Clin. Invest. 86:2136-2144); антиген лимфомы Беркита 38.13; CD19 (Ghetie et al., 1994, Blood 83:1329-1336); антиген В-лимфомы человека, CD20 (Reff et al., 1994, Blood 83:435-445); GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol. 2:135), CTA-1 и LEA; CD33 (Sgouros et al., 1993, J. Nucl. Med. 34:422-430); онкофетальные антигены, такие как альфа-фетопротеин для рака печени или онкофетальный антиген опухолей мочевого пузыря (Hellstrom et al., 1985, Cancer. Res. 45:2210-2188); антигены дифференцировки, такие как антиген карциномы легкого человека L6 или L20 (Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46:3917-3923); антигены фибросаркомы; антиген Т-клеточного лейкоза человека, gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. Immunol. 141:1398-1403); опухолеспецифичный трансплантационный тип антигена клеточной поверхности (TSTA), такой как антигены индуцируемых вирусами опухолей, включая Т-антиген, опухолевый ДНК-вирус и оболочечные антигены опухолевых РНК-вирусов; неогликопротеины, антигены рака молочной железы, такие как EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), полиморфный эпителиальный муцин (PEM) (Hilkens et al., 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359), полиморфный эпителиальный муциновый антиген; глобулярный антиген молочного жира человека; ассоциированные с колоректальными опухолями антигены, такие как TAG-72 (Yokata et al., 1992, Cancer, Res. 52:3402-3408), CO 17-1 A (Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer, 53:751-758); антигены дифференцировки (Feizi, 1985, Nature, 314:53-57), такие как I(Ma), обнаруженный в желудочных adenокарциномах, SSEA-1, обнаруженный в миелоидных клетках, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, M18 и M39, обнаруженные в эпителиальных раках молочной железы, D₁₅₆₋₂₂, обнаруженный в колоректальном раке, TRA-1-85 (группа крови Н), C14, обнаруженный в adenокарциноме ободочной кишки, F3, обнаруженный в adenокарциноме легкого, AH6, обнаруженный в раке желудка, Y-гаптен, обнаруженный в клетках эмбриональной карциномы, TL5 (группа крови А), антигены серии E1 (группа крови В), обнаруженные при раке поджелудочной железы, FC10.2, обнаруженный в клетках эмбриональной карциномы, антиген adenокарциномы желудка, CO-514 (группа крови Le^a), обнаруженный в adenокарциноме, NS-10, обнаруженный в adenокарциномах, CO-43 (группа крови Le^b), G49, обнаруженный в клетках A431, 19.9, обнаруженный в клетках рака толстой кишки; муцины рака желудка; R₂₄, обнаруженный в меланоме, MH2 (группа крови ALe^b/Le^y), обнаруженный в ободочной adenокарциноме, 4.2, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2 и M1:22:25:8, обнаруженные в клетках эмбриональной карциномы, и SSEA-3 и SSEA-4. HMW-MAA (SEQ ID NO: 433), также известный как меланомный хондроитин-сульфатный протеогликан, представляет собой мембрально-связанный белок из 2322 остатков, который сверхэкспрессируется более чем на 90% хирургически удаленных доброкачественных невусах и меланомных выростах (Camplois, et. al., Crit. Rev. Immunol.; 24:267, 2004).

Соответственно, он может представлять собой потенциальный целевой антиген, ассоциированный с

клеточной поверхностью.

Другие примеры раковых антигенов для направленного воздействия с использованием конструкций слитых белков по настоящему изобретению включают (примеры видов рака указаны в скобках): CD5 (Т-клеточный лейкоз/лимфома), CA15-3 (карциномы), CA19-9 (карциномы), L6 (карциномы), CA 242 (колоректальный рак), плацентарную щелочную фосфатазу (карциномы), кислую фосфатазу представительной железы (рак простаты), MAGE-1 (карциномы), MAGE-2 (карциномы), MAGE-3 (карциномы), MAGE-4 (карциномы), трансферриновый рецептор (карциномы), p97 (меланома), MUC1 (рак молочной железы), MART1 (меланома), CD20 (недожкинская лимфома), CD52 (лейкоз), CD33 (лейкоз), хорионический гонадотропин человека (карцинома), CD38 (множественная миелома), CD21 (В-клеточная лимфома), CD22 (лимфома), CD25 (В-клеточная лимфома), CD37 (В-клеточная лимфома), CD45 (острый миелобластный лейкоз), HLA-DR (В-клеточная лимфома), рецептор IL-2 (Т-клеточный лейкоз и лимфомы), CD40 (лимфома), CD79 (В-клеточный лейкоз или лимфома, лимфома Ходжкина), различные муцины (карциномы), P21 (карциномы), MPG (меланома), Ep-CAM (эпителиальные опухоли), фолат-рецептор альфа (рак яичников), A33 (колоректальный рак), G250 (рак почек), ферритин (лимфома Ходжкина), de2-7 EGFR (gliобластома, рак молочной железы и легких), белок активации фибробластов (рак эпителиалия) и тенасциновые металлопротеиназы (gliобластомы). Некоторые конкретные, полезные антитела включают, но не ограничиваются ими, BR64 (Trail et al., 1997, *Cancer Research*, 57:100-105), моноклональное антитело BR96 (Trail et al., 1993, *Science*, 261:212-215), моноклональные антитела против CD40-антитела, такие, как S2C6 (Francisco et al., 2000, *Cancer Res.* 60:3225-3231), или другие анти-CD40-антитела, такие как раскрытие в публикациях патентов США № 2003-0211100 и 2002-0142358; моноклональные антитела против CD30-антитела, такие как AC10 (Bowen et al., 1993, *J. Immunol.* 151:5896-5906; Wahl et al., 2002 *Cancer Res.* 62(13):3736-42) или MDX-0060 (публикация патента США № 2004-0006215), и моноклональные антитела против CD70-антитела, такие как моноклональные антитела 1F6 и 2F2 (см., например, публикацию патента США № 2006-0083736) или антитела 2H5, 10B4, 8B5, 18E7, 69A7 (US 8124738). Другие антитела были описаны в других публикациях (Franke et al., 2000, *Cancer Biother. Radiopharm.* 15:459-76; Murray, 2000, *Semin. Oncol.* 27:64-70; Breitling, F., and Dubel, S., *Recombinant Antibodies*, John Wiley, and Sons, New York, 1998).

В некоторых вариантах осуществления изобретения полезные антитела могут связываться с рецептором или комплексом рецепторов, экспрессирующихся на клетке-мишени. Рецепторный комплекс или рецептор могут включать представителя суперсемейства иммуноглобулиновых генов, белок главного комплекса гистосовместимости, рецептор цитокина, представителя суперсемейства TNF-рецепторов, рецептор хемокина, интегрин, лектин, белок контроля системы комплемента, рецептор фактора роста, гормональный рецептор или нейротрансмиттерный рецептор. Неограничивающими примерами подходящих представителей иммуноглобулинового суперсемейства являются CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1, B7-H4, B7-H3 и ICOS. Неограничивающими примерами подходящих представителей суперсемейства TNF-рецепторов являются TAC1, BCMA, CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNFR1, TNFR2, RANK, остеопротегерин, APO 3, Apo2/TRAIR R1, TRAIL R2, TRAIL R3 и TRAIL R4. Неограничивающими примерами подходящих интегринов являются CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 и CD104. Неограничивающими примерами подходящих лектинов являются лектины S-типа, C-типа и I-типа. Примеры антител к CEA приведены в табл. 1.

Таблица 1

Антитела к CEA			
Клон антитела	Патент	Кому принадлежит	Комментарии
COL-1	US 6417337	The Dow Chemical Company	Гуманизированно
806.077	US 6903203	AstraZeneca UK Ltd.	Гуманизированно
T84.66	US 7776330	City of Hope	Гуманизированно

Антитела, которые связываются с антигеном CD22, экспрессирующимся на В-клетках человека, включают, например, HD6, RFB4, UV22-2, To15, 4KB128 и гуманизированное анти-CD22 антитело (hLL2) (см., например, Li et al. (1989), *Cell. Immunol.* 111: 85-99; Mason et al. (1987), 69:836-40; Behr et al. (1999), *Clin. Cancer Res.* 5:3304s-3314s; Bonardi et al. (1993), *Cancer Res.* 53:3015-3021).

Антитела к CD33 включают, например, HuM195 (см., например, Kossman et al. (1999), *Clin. Cancer Res.* 5:2748-2755; US 5693761) и CMA-676 (см., например, Sievers et al., (1999), *Blood*, 93:3678-3684).

Иллюстративные анти-MUC-1 антитела включают, но не ограничиваются ими, MC5 (см., например, Peterson et al. (1997), *Cancer Res.* 57:1103-1108; Ozzello et al. (1993), *Breast Cancer Res. Treat.* 25:265-276) и hCTMO1 (см., например, Van Hof et al. (1996), *Cancer Res.* 56:5179-5185).

Иллюстративные анти-TAG-72 антитела включают, но не ограничиваются ими, СС49 (см., например, Pavlinkova et al. (1999), Clin. Cancer Res. 5:2613-2619), B72.3 (см., например, Divgi et al. (1994), Nucl. Med. Biol. 21:9-15) и раскрытие в патенте США № 5976531.

Примеры анти-HM1.24 антител включают, но не ограничиваются ими, мышью моноклональное анти-HM1.24 антитело и гуманизированное анти-HM1.24 IgG1-каппа антитело (см., например, Ono et al. (1999), Mol. Immunol. 36:387-395).

В некоторых вариантах осуществления направляющий элемент включает анти-HER2 антитело. Ген ErbB2, более известный как (Her-2/neu), представляет собой онкоген, кодирующий трансмембранный рецептор. Против Her-2/Neu были получены несколько антител, и некоторые из них находятся в клиническом применении. К ним относятся трастузумаб (например, HERCEPTIN™; Fornir et al. (1999), Oncology (Huntingt), 13:647-58), TAB-250 (Rosenblum et al. (1999), Clin. Cancer Res. 5: 865-874), BACH-250 (Id.), TA1 (Maier et al. (1991), Cancer Res. 51:5361-5369) и моноклональные антитела, описанные в патентах США № 5772997, 5770195 (моноклональное антитело 4D5; ATCC CRL 10463); и в патенте США № 5677171.

Другие полностью человеческие анти-HER2/Neu антитела хорошо известны специалистам в данной области техники. Такие антитела включают, но не ограничиваются ими, С6-антитела, такие как С6.5, DPL5, G98A, С6MH3-B1, B1D2, C6VLB, C6VLD, C6VLE, C6VLF, С6MH3-D7, С6MH3-D6, С6MH3-D5, С6MH3-D3, С6MH3-D2, С6MH3-D1, С6MH3-C4, С6MH3-C3, С6MH3-B9, С6MH3-B5, С6MH3-B48, С6MH3-B47, С6MH3-B46, С6MH3-B43, С6MH3-B41, С6MH3-B39, С6MH3-B34, С6MH3-B33, С6MH3-B31, С6MH3-B27, С6MH3-B25, С6MH3-B21, С6MH3-B20, С6MH3-B2, С6MH3-B16, С6MH3-B15, С6MH3-B11, С6MH3-B1, С6MH3-A3, С6MH3-A2 и С6ML3-9. Эти и другие анти-HER-2/Neu антитела описаны в патентах США №№ 6512097 и 5977322, в PCT-публикации WO 97/00271, в Schier et al. (1996), J. Mol. Biol. 255:28-43, Schier et al. (1996), J. Mol. Biol. 263: 551-567 и в других источниках.

В целом, антитела к различным представителям семейства рецептора эпидермального фактора роста хорошо подходят для использования в качестве направляющих антител или их антигенсвязывающих участков в конструкциях по настоящему изобретению. Такие антитела включают, но не ограничиваются ими, анти-EGFR антитела, описанные в патентах США № 5844093 и 5558864, а также в Европейском патенте № 706799A. Другие иллюстративные антитела к белкам EGFR-семейства включают, но не ограничиваются ими, антитела, такие как С6.5, С6ML3-9, С6MH3-B1, С6-B1D2, F5, HER3.A5, HER3.F4, HER3.H1, HER3.H3, HER3.E12, HER3.B12, EGFR.E12, EGFR.C10, EGFR.B11, EGFR.E8, HER4.B4, HER4.G4, HER4.F4, HER4.A8, HER4.B6, HER4.D4, HER4.D7, HER4.D11, HER4.D12, HER4.E3, HER4.E7, HER4.F8 и HER4.C7 и т.п. (см., например, публикации патентов США US 2006/0099205 A1 и US 2004/0071696 A1, которые включены в данное описание путем ссылки).

CD38 представляет особый интерес в качестве направленного на мишень антитела в конструкциях слитых белков по настоящему изобретению. Антитела к CD38 включают, например, AT13/5 (см., например, Ellis et al. (1995), J. Immunol. 155:925-937), HB7 и т.п.

Настоящее изобретение также относится к композициям, включающим слитые полипептиды по настоящему изобретению. Эти композиции могут дополнительно содержать по меньшей мере одно из любых подходящих вспомогательных веществ, таких как, но не ограниченных ими, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адьювант или т.п. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Неограничивающие примеры и способы получения таких стерильных растворов хорошо известны в данной области техники, такие как, например, приведенные в Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990, но не ограниченные ими) Стандартно могут быть выбраны фармацевтически приемлемые носители, которые являются подходящими для способа введения, растворимости и/или стабильности композиции антител, как хорошо известно в данной области или как описано в данном документе.

Фармацевтические вспомогательные вещества и добавки, используемые в композиции по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; дериватизированные сахара, такие как многатомные спирты, альдоновые кислоты, этирифицированные сахара и т.п., и полисахариды или сахарные полимеры), которые могут присутствовать по отдельности или в комбинации, включающей единственное вещество или их комбинацию в диапазоне 1-99,99% по весу или объему. Типичные белковые вспомогательные вещества включают сывороточный альбумин, такой как сывороточный альбумин человека (HSA), рекомбинантный альбумин человека (RHA), желатин, казеин и т.п. Типичные аминокислоты, которые также могут обеспечивать буферную емкость, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т.п. Одной из предпочтительных аминокислот является гистидин. Вторая предпочтительная аминокислота представляет собой аргинин.

Углеводные вспомогательные вещества, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т.п.; полисахариды, такие

как раффиноза, мелецитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и т.п. Предпочтительными углеводными вспомогательными веществами для применения в настоящем изобретении являются маннит, трегалоза и раффиноза.

Композиции антител могут также включать буфер или агент, регулирующий pH; как правило, буфер представляет собой соль, полученную из органической кислоты или основания. Типичные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; Трис, трометамина гидрохлорид, фосфатные буферы или аминокислотные буферы. Предпочтительные буферы для применения в композициях по настоящему изобретению представляют собой соли органических кислот, такие как цитрат, или аминокислоты.

Кроме того, композиции по изобретению могут включать полимерные вспомогательные вещества/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фиколлы (полимерный сахар), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин), полиэтиленгликоль, отдушки, противомикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатики, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как "TWEEN® 20" и "TWEEN® 80"), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие агенты (например, EDTA).

Эти и другие известные фармацевтические вспомогательные вещества и/или добавки, подходящие для применения в композициях антител по изобретению, известны в данной области техники, например, перечислены в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), и в "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998), содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки. Предпочтительными носителями или вспомогательными веществами являются углеводы (например, сахарины и альдиты) и буферы (например, цитрат) или полимерные агенты.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что изобретение, описанное в данном документе, может подвергаться изменениям и модификациям, отличающимся от непосредственно описанных. Следует понимать, что изобретение включает все такие вариации и модификации, которые находятся в пределах сущности и объема изобретения. Изобретение также включает все стадии, признаки, композиции и соединения, упомянутые или указанные в данном описании, индивидуально или коллективно, а также любые и все комбинации любых двух или нескольких из указанных стадий или признаков.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно среднему специалисту в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя любые материалы и способы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы на практике или для проверки настоящего изобретения, предпочтительные материалы и способы описаны ниже.

Примеры

Общие способы.

Получение слитых конструкций с антителами в клетках HEK-293E.

ДНК-последовательности ряда доменов в слитых полипептидах по настоящему изобретению приведены в прилагаемом списке последовательностей, включенном в данное описание. ДНК плазмид, кодирующих белковые конструкции (слитые конструкции антитело-ослабленный IFN α 2b), получали с использованием HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA), и затем ей трансфицировали клетки HEK293E (CNRC, Montreal, Canada), выращенные в синтетической среде F17 с добавлением 0,45% (вес/объем) D-(+)-глюкозы (Sigma, Castle Hill, NSW), 25 г/мл генетицина (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 1xGlutaMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA), с использованием коммерчески доступного реагента для трансфекции и среды OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). После предоставления возможности для экспрессии в течение 6 дней в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ и при встряхивании 120 об/мин собирали культуральную среду и проводили аффинную очистку с использованием агарозных шариков Protein A Mab Select SuRe™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Буфер для очищенных белковых конструкций заменяли на 0,2 М аргинин*HCl, 25 мМ лимонную кислоту, 71,5 мМ гидроксид натрия с pH 6,0, используя колонку PD Midi-Trap G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) или обессоливающую колонку HiPrep 26/10 (HiTrap Desalting HiPrep 26/10 Desalting). Очищенные белковые конструкции затем концентрировали с использованием центрифужных фильтрующих устройств 50 kDa Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA) с последующим определением концентрации белка путем измерения оптической плотности при длине волны 280 нм.

Получение слитых конструкций антител в клетках EXPI293. ДНК плазмид, кодирующих белковые конструкции (конструкции, родственные конструкциям антитело-IFN α 2b), получали с использованием HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA), а затем ей трансфицировали клетки EXPI293 (Life Technologies, Carlsbad, CA), выращенные в среде EXPI Expression medium (Life Technologies, Carlsbad, CA), с использованием реагента для трансфекции, входящего в набор для трансфекции EXPI293, и среды

OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). После предоставления возможности для экспрессии в течение 3 дней в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ и при встряхивании 125 об/мин собирали культуральную среду и проводили аффинную очистку с использованием агарозных шариков Protein A Mab Select SuRe™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Буфер для очищенных белковых конструкций заменяли на 0,2 М аргинин*HCl с pH 6,0, используя колонку PD Midi-Trap G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) или обессоливающую колонку HiPrep 26/10 ((HiTrap Desalting HiPrep 26/10 Desalting). Очищенные белковые конструкции затем концентрировали с использованием центрифужных фильтрующих устройств 50 kDa Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA) с последующим определением концентрации белка путем измерения оптической плотности при длине волны 280 нм.

Получение слитых конструкций антител в клетках CHO.

ДНК плазмид, кодирующие белковые конструкции (конструкции, родственные конструкциям антитело-IFN α 2b), получали с использованием HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA), и затем ей трансфицировали клетки CHO (Lonza), выращенные в Freestyle™ CHO Expression Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), с использованием коммерчески доступного реагента для трансфекции и среды OptiPro SFM™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). После предоставления возможности для экспрессии в течение 6 дней в инкубаторе в атмосфере 10% CO₂ и при встряхивании 120 об/мин собирали культуральную среду и проводили аффинную очистку с использованием агарозных шариков Protein A Mab Select SuRe™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Буфер для очищенных белковых конструкций заменяли на 0,2 М аргинин*HCl, 25 мМ лимонную кислоту, 71,5 мМ гидроксид натрия с pH 6,0, используя колонку PD Midi-Trap G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) или обессоливающую колонку HiPrep 26/10 ((HiTrap Desalting HiPrep 26/10 Desalting). Очищенные белковые конструкции затем концентрировали с использованием центрифужных фильтрующих устройств 50 kDa Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA) с последующим определением концентрации белка путем считывания оптической плотности при длине волны 280 нм.

Способ измерения антиген-направленной активности слитых белковых конструкций антитело-IFN α 2b.

"Анализ специфичности (на клетках Daudi)": этот анализ был использован для количественного определения антипролиферативной активности IFN α 2b и слитых белковых конструкций антитело-IFN α 2b в отношении клеток, которые представляют как рецептор интерферона, так и антигенную мишень антитела, с которым слит IFN α 2b. Клетки Daudi экспрессируют оба CD20 и CD38, в качестве антигенов, ассоциированных с клеточной поверхностью, а также экспрессируют IFN-рецепторы на поверхности клеток. Жизнеспособность клеток Daudi измеряли с использованием реагента CellTiter-Glo®, кат. № G7570, от Promega (Madison, Wisconsin). Он представляет собой люминесцентный метод анализа, который определяет жизнеспособность клеток в культуре на основе количественного анализа АТФ. Интенсивность сигнала пропорциональна числу жизнеспособных клеток в лунке микротитровочного планшета.

Подробное описание метода анализа приведено далее.

Клетки Daudi (полученные из ATCC, Manassas, VA), культивировали в флаконе T75 (TPP, Trasadingen, Switzerland, кат. № 90076) с предпочтительной плотностью между $0,5 \times 10^5$ и $0,8 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл в среде RPMI 1640 (Mediatech, Inc., Manassas, VA, кат. № 10-040-CV) с 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS, Hyclone, Logan, UT, кат. № SH30070.03). Клетки собирали центрифугированием при 400г в течение 5 мин, декантировали супернатант и ресуспендировали осадок клеток в среде RPMI 1640+10% FBS. Затем клетки подсчитывали и плотность доводили до $3,0 \times 10^5$ клеток/мл в среде RPMI 1640+10% FBS. Затем 50 мкл клеточной суспензии добавляли в каждую лунку 96-луночного культурального круглодонного планшета (далее "экспериментальный планшет") (TPP, кат. № 92067). В отдельном стерильном 96-луночном планшете (далее "планшет для разведения"; Costar, Corning, NY, кат. № 3879) тестируемые соединения серийно разводили в дупликатах в RPMI 1640+10% FBS. Затем, из планшета для разведения переносили по 50 мкл на лунку в экспериментальный планшет. Экспериментальный планшет затем инкубировали в течение четырех дней при 37°C с 5% CO₂.

Смесь поставляемых производителем буфера для анализа и аналитического субстрата (далее "реагент CellTiterGlo", смешанный в соответствии с инструкциями изготовителя) добавляли к экспериментальному планшету в объеме 100 мкл/лунку. Планшет встряхивали в течение 2 мин. Затем по 100 мкл/лунку переносили из экспериментального планшета в 96-луночный плоскодонный белый непрозрачный планшет (далее "аналитический планшет"; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, кат. № 353296).

Содержимое аналитического планшета затем оставляли для стабилизации в темноте в течение 15 мин при комнатной температуре. Излучение из лунок планшета измеряли с использованием фотометра Victor 3V Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, model# 1420-041) на люминесцентном канале, и определяли люминесценцию. Результаты представлены в виде "относительных единиц люминесценции (RLU)".

Данные были проанализированы с использованием Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA) с использованием нелинейной регрессии и подгонки трехпараметрической кривой, чтобы определить среднюю точку на кривой (EC₅₀). Для каждого тестируемого соединения активность по отношению к свободному

IFN α 2b (или какой-либо другой форме интерферона с известной силой действия относительно IFN α 2b) рассчитывали как соотношение EC₅₀.

Среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что существует множество других широко используемых методов анализа для измерения жизнеспособности клеток, которые также могут быть использованы.

"Метод анализа специфичной активности (на клетках ARP)" (также иногда называемый в данном документе как "метод анализа специфичности"). Клеточная линия множественной миеломы ARP-1 была подарена Bart Barlogie MD, PhD, директором Института миеломы в Медицинском центре университета Арканзаса (Little Rock, AK). Она описана в Hardin J. et al. (Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood*; 84:3063, 1994). Клетки ARP-1 (CD38⁺) были использованы для проверки сливых белковых конструкций направленного против CD38 антитела и интерферона. Условия культивирования и метода анализа были такими же, как для метода анализа на основе клеток Daudi, описанного выше, со следующими исключениями:

ARP-1 культивировали до плотности 4,0×10⁵-6,0×10⁵ клеток/мл. Концентрацию ARP-1 доводили до 1,0×10⁴ клеток/мл перед анализом.

Пример 1. Изоэлектрические точки сливых белков анти-CD38 антитело-ослабленный IFN α 2b.

Различные транзиентно трансфицированные клетки, экспрессирующие сливые конструкции анти-CD38 антитело-ослабленный IFN α 2b (табл. 2), собирали и очищали с использованием колонки Mab Select Sure Protein A. Образцы обессоливали в 200 мМ аргинине, 25 мМ гистидине с pH 6,5, используя колонку HiLoad Superdex 200.

Таблица 2

Таблица конструкций

Конструкции антител	SEQ ID No.			
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	IFN	VH+IFN
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	48	81	25	87, 31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, ΔT106)	48	81	110	61
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T)	50	81	107	
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106A)	50	81	25	68
A10.21 IgG1 IFN (A145D, ΔT106)	50	81		83
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	55	81	107	
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	55	81	25	74
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN	48	81	25	31

(A145D, T106E)				
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106A)	48	81	24	63
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106T)	53	81	107	
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106A)	53	81	25	72

A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106T)		81	107	
A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106A)		81	25	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	58	84	107	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	58	84	25	77
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	59	85	107	
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	59	85	25	
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	60	86	107	
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	60	86	25	

Изоэлектрофокусирующие (IEF) гели были использованы для определения изоэлектрической точки (рI) слитого полипептида и обнаружения незначительных изменений в белке вследствие посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование и гликозилирование.

Покупной IEF-гель помещали в резервуар для геля, гарантируя герметичное соединение между гелем и буфером. Затем 200 мл 1× катодного буфера наливали во внутреннюю камеру, гарантируя непоступление буфера в наружную камеру. В наружную камеру затем наливали 500 мл анодного буфера, так чтобы было заполнено 3/4 резервуара. После нанесения образцов и маркера на гель его прогоняли в течение 1 ч при 100 В, 1 ч при 200 В и 0,5 ч при 500 В. После прогона гель извлекали и фиксировали в растворе TCA в стеклянной емкости в течение 30 мин. Гель затем сразу же промывали деионизированной водой 3 раза. Гель окрашивали в SimplyBlue SafeStain (Invitrogen Life Technologies) в течение 1 ч и оставляли на ночь в воде для отмычки. Окончательное изображение сканировали с помощью сканера.

Сайт О-гликозилирования участка IFN α 2b в слитых конструкциях антитело-ослабленный интерферон удаляли либо путем замены 106-го треонина в интерфероне (T106) на аланин (показано как T106A), серин (T106S), валин (T106V), глицин (T106G) или глутаминовую кислоту (T106E) или путем удаления T106 (показано как ΔT106). Влияние этих изменений на рI и гетерогенность слитых конструкций исследовали путем сравнения конструкций с и без О-гликозилирования путем разделения в IEF-гелях.

В каждом случае, удаление T106 или замена T106 на аланин, серин, валин, глицин или глутаминовую кислоту снижали число наблюдаемых заряженных частиц на IEF-геле, о чем свидетельствует уменьшение числа полос при прямом сравнении с конструкцией с немодифицированным T106, и, таким образом, уменьшалась гетерогенность слитой конструкции (фиг. 9).

Уменьшенное число заряженных частиц на IEF-геле и, следовательно, уменьшенная гетерогенность молекулы, включающей T106S, согласуется с удалением О-гликозилирования в 106-м остатке IFN α 2b.

Удаление сайта О-гликозилирования в участке ослабленного IFN в слитых конструкциях с антителом приводило к повышению рI относительно О-гликозилированных белков) С использованием одной и той же N-коцевой части антитела (A10.21) эта тенденция сохранялась независимо от изотипа антитела IgG4, IgG1, IgG1 AA (IgG1 L235A, G237A, форма IgG1 со сниженной эффекторной функцией), IgG2 или IgG2 SS (IgG2 (A330, P331S)), используемого в конструкциях (фиг. 10).

Было показано, что YTE-замены (M252Y, S254T, T256E) придают повышенное сродство к FcRn, предположительно увеличивая время полужизни антител. В дополнительных экспериментах было исследовано, будут ли замены в других частях слитых конструкций антитело-IFN влиять на снижение гетерогенности, получаемое в результате удаления или замены T106. Гетерогенность гликозилированной слитой конструкции "A10.21 анти-CD38-ослабленный IFN α 2b (YTE, T106T)" и негликозилированной интерфероновой слитой конструкции с YTE-заменами (YTE, T106A) оценивали в IEF-гелях. Удаление гликозилирования IFN α 2b-компонента в слитых конструкциях, несущих YTE-мутации, снижало гетерогенность (фиг. 11).

Ослабление IFN α 2b достигается за счет замен ключевых аминокислотных остатков, которые отвечают за связывание с рецепторами IFN. Оценивали число заряженных вариантов конструкций A10.21 IgG4 (S228P) IFN с различными ослабляющими аминокислотными заменами в IFN α 2b вместе с О-гликозилированием (T106T) или без О-гликозилирования (T106A) компонента IFN α 2b. Индивидуальные аминокислотные остатки Arg33, Arg144 и Ala145 в IFN α 2b замещали по одному на аланин для 33-го

остатка (R33A), изолейцин для 144-го остатка (R144I) или лизин, глицин или глутамин для 145-го остатка (A145K, A145G, A145Q). При прямом сравнении слитых конструкций агликазилированного IFN, они были воспроизведимо менее гетерогенными, чем их гликозилированные аналоги (фиг. 12).

Полученное снижение гетерогенности не зависело от участка антитела в конструкции. Удаление сайта О-гликозилирования в участке ослабленного IFN α 2b в слитых конструкциях "антитело (IgG4 (S228P)) ослабленный IFN" со специфичностью в отношении HLA, CD138 и CD38 (узнаваемого антителом A02.12 другого эпитопа на CD38, чем для антитела A10.21,) также приводило к снижению гетерогенности (фиг. 13), что было обнаружено с помощью изоэлектрофокусирования (IEF).

Пример 2. Антипролиферативная активность слитых белков антитело-ослабленный интерферон- α 2b.

Антипролиферативные эффекты IFN α 2b обусловлены его прямым и непрямым действием. Прямое действие происходит за счет ингибиции роста раковых клеток путем остановки клеточного цикла (Matsui et al. 2003), за счет зависимого (Crowder et al. 2005) и независимого (Otsuki et al. 1998) от рецептора смерти апоптоза или дифференцировки (Matsui et al. 2003). Мишень-специфичную прямую цитотоксичность слитых белков "антитело-ослабленный интерферон" измеряли в отношении положительных по экспрессии белков-мишеней клеточных линий с использованием люминесцентного метода анализа жизнеспособности клеток.

Образцы последовательностей наиболее перспективных конструкций анти CD38-IFN.

Конструкции (табл. 3) стабильно клонировали или трансфицировали и собирали и очищали с использованием колонки Mab Select Sure Protein A. Образцы обессоливали в 200 мМ аргинине, 25 мМ гистидине с pH 6,5, используя колонку HiLoad Superdex 200.

Таблица 3

Таблица конструкций

Конструкции антитела	Seq Id No.			
	Тяжела я цепь	Легкая цепь	IFN	VH+IFN
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	48	81	25	87, 31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, ΔT106)	48	81	110	61
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN	48	81	24	63

(R144I, T106A)				
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T)	50	81	107	
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106A)	50	81	25	68
A10.21 IgG1 IFN (A145D, ΔT106)	50	81	110	83

A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	52	81	25	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)		81	25	70
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106T)	53	81	107	
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106A)	53	81	25	72
A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106T)		81	107	
A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106A)		81	25	
A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	54	81	107	
A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	54	81	25	73
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	55	81	107	
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	55	81	25	74
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	75	82	107	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN	75	82	25	

(A145D, T106R)				
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106N)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106D)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106C)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Q)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106H)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106I)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106L)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106K)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106M)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106F)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106P)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106W)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Y)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	75	82	25	

A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	58	84	107	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	58	84	25	77
OPG-Fc (IgG2) IFN (A145D, T106T)	57		107	
OPG-Fc (IgG2) IFN (A145D, T106A)	57		25	78
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	59	85	107	
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	59	85	25	
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	60	86	107	
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	60	86	25	

Коммерческий IFN α 2b.

В качестве положительного контроля был использован INTRON® A, коммерческий продуцируемый в бактериях IFN α 2b от Schering-Plough.

Измерение антитромиферативной активности.

Антитромиферативную активность измеряли с использованием описанных выше способов "метода анализа пролиферации клеток Daudi" и "метода анализа пролиферации клеток ARP-1". Метод анализа пролиферации клеток ARP-1 использовали с дополнительной клеточной линией NCI-H929 для измерения антитромиферативной активности слитого белка антитело-ослабленный IFN α 2b. В некоторых экспериментах планшеты считывали на специальном люминометре GloMax® 96 Microplate Luminometer и использовали реагенты CellTiter-Glo® 2.0 вместо исходного CellTiter-Glo, что никак не влияло на результаты. Метод анализа пролиферации клеток ARP-1/NCI-H929 или Daudi использовали для количественной оценки антитромиферативной активности интерферонов и слитых белковых конструкций антитело-ослабленный IFN α 2b в отношении клеток, которые представляют на поверхности CD38. Клетки Daudi, ARP-1 и NCI-H929 экспрессируют CD38 в виде антигена, ассоциированного с клеточной поверхностью.

Подробное описание анализов приведено далее.

В методе анализа пролиферации клеток ARP-1/NCI-H929 жизнеспособность клеток измеряли с использованием реагента CellTiter-Glo® 2.0, кат. № G9242 от Promega (Madison, Wisconsin). Метод представляет собой люминесцентный метод анализа, который определяет жизнеспособность клеток в культуре на основе количественного анализа АТФ. Интенсивность сигнала пропорциональна числу жизнеспособных клеток в лунках микротитровочного планшета. Клетки (NCI-H929 от ATCC, Manassas, VA) и ARP-1, которые были подарены Bart Barlogie MD, PhD, директором Института миеломы в Медицинском центре университета Арканзаса (Little Rock, AK), культивировали в флаконе T75 (TPP, Trasadingen, Switzerland, кат. № 90076) с предпочтительной плотностью между $0,5 \times 10^5$ и $0,8 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл в среде RPMI 1640 (Mediatech, Inc., Manassas, VA, кат. № 10-040-CV) с 10%-й фетальной бычьей сывороткой (FBS; Hyclone, Logan, UT, кат. № SH30070.03). Клетки собирали центрифугированием при $400 \times g$ в течение 5 мин, декантировали супернатант и ресуспенсировали осадок клеток в среде RPMI 1640 + 10% FBS. Затем клетки подсчитывали, и плотность доводили до $3,0 \times 10^5$ клеток/мл в среде RPMI 1640 + 10% FBS. 50 мкл клеточной суспензии добавляли в каждую лунку 96-луночного культурального круглодонного планшета (далее "экспериментальный планшет") (TPP, кат. № 92067). Клетки инкубировали 1 ч при 4°C перед добавлением тестируемых соединений. В отдельном стерильном 96-луночном планшете (далее "планшет для разведения"; Costar, Corning, NY, кат. № 3879) тестируемые соединения серийно разводили в дупликатах в RPMI 1640+10% FBS. Из планшета для разведения переносили по 50 мкл/лунку в экспериментальный планшет. Экспериментальный планшет затем инкубировали в течение четырех дней при 37°C с 5% CO₂. Реагент CellTiterGlo® 2.0 добавляли к экспериментальному планшету в объеме 100 мкл/лунку. Планшет встраивали в течение 2 мин. По 100 мкл/лунку переносили из экспериментального планшета в 96-луночный плоскодонный белый непрозрачный планшет (далее "аналитический планшет"; BD Biosciences, Franklin 5 Lakes, NJ, кат. № 35 3296). Содержимое аналитического планшета затем оставляли для стабилизации в темноте в течение 15 мин при комнатной температуре. Излучение из лунок планшета считывали с использованием планшетного люминометра GloMax® 96 Microplate Luminometer. Результаты представлены в виде "относительных единиц люминесценции (RLU)".

Данные были проанализированы с использованием Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA) с использованием нелинейной регрессии и подгонки четырехпараметрической кривой, чтобы определить IC_{50} .

Сайт О-гликозилирования слитых конструкций анти-CD38 антитела с ослабленным интерфероном были удален либо заменой 106-го треонина (T106) на аланин (T106A), серин (T106S), валин (T106V), глицин (T106G) или глутаминовую кислоту (T106E), либо удалением T106 (показано как $\Delta T106$). Эффект на пролиферацию клеток исследовали путем сравнения анти-CD38 антитела A10.21, слитого с ослабленным IFN α 2b с и без О-гликозилирования. Удаление сайта О-гликозилирования в участке ослабленного интерферона в слитых с антителами конструкциях приводило к повышению антитрополиферативной активности, на что указывает более низкая IC_{50} (нМ) относительно соответствующих О-гликозилированных слитых белков, а именно A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T) и A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T), на двух типах клеток ARP-1 (фиг. 1A) и NCI-H929 (фиг. 1B). Эта тенденция сохраняется независимо от изотипа антитела - IgG4 или IgG1.

Замена 106-го треонина (T106) на аланин (T106A), серин (T106S), валин (T106V), глицин (T106G) или глутаминовую кислоту (T106E) приводила к увеличению антитрополиферативной активности, что показано более низкой IC_{50} (нМ) относительно О-гликозилированных слитых белков. Все негликозилированные конструкции имели более сильное специфичное действие относительно их гликозилированных аналогов в клетках NCI-H929 (фиг. 14).

Влияние на антитрополиферативную активность удаления сайта О-гликозилирования из компонента ослабленного IFN α 2b исследовали на ряде слитых белков "анти-CD38-антитело-ослабленный IFN α 2b". Были исследованы варианты слитого белка антитело-ослабленный IFN α 2b (R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D)), несущие различные аминокислотные замены T106 для удаления сайта О-гликозилирования в интерфероновом компоненте (T106A, T106G, T106N, T106F, T106R, T106D, T106E, T106Q, T106H, T106I, T106L, T106K, T106M, T106F, T106P, T106S, T106V, T106Y и T106W (табл. 4)), и результаты показаны на фиг. 2.

Хотя уровень активности варьировал между различными заменами в сайте T106, все замены, которые согласно предсказанию приводили к удалению О-гликозилирования, имели повышенную активность относительно соответствующего О-гликозилированного белка (фиг. 2).

Таблица 4

Слитая конструкция R10A2 анти-CD38 антитело-ослабленный IFN с различными вариантами аминокислотных замен в T106 для удаления О-гликозилирования

Название конструкции	Seq Id No.		
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	IFN
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	75	82	107
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106R)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106N)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106D)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106C)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25

R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Q)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106H)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106I)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106L)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106K)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106M)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106F)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106P)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106W)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Y)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	75	82	25

Аналогичным образом оценивали относительные изменения в уровне активности между конструкциями интерферона, слитого с двумя различными анти-CD38 антителами (A02.12 и A10.21), которые связывают разные эпитопы на CD38, с или без О-гликозилирования (A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T), A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A), A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T) и A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)). Удаление сайта О-гликозилирования в участке ослабленного IFN в конструкциях, слитых с антителами (IgG4 (S228P)) с различной специфичностью в отношении CD38, приводит к увеличению антитрополиферативной активности, независимо от мишени антитела в конструкции (фиг. 15).

Ослабление IFN α 2b достигается за счет различных ослабляющих замен. Также оценивали антитрополиферативную активность конструкций A10.21 IgG4 (S228P)-IFN с различными ослабляющими заменами в IFN α 2b с (T106T) и без (T106A) О-гликозилирования (табл. 5). Удаление сайта О-гликозилирования в компоненте IFN α 2b конструкций с различными ослабляющими заменами во всех случаях давало более высокую эффективность, чем их гликозилированный аналог (фиг. 16).

Таблица 5
Конструкции A10.21 IgG4 (S228P)-IFN с различными ослабляющими заменами в IFN α 2b с (T106T) и без (T106A) О-гликозилирования

Название конструкции	Seq Id No.			
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	IFN	VH+IFN
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106A)	48	81	24	63
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106A)	48	81	24	67

Для исследования того, будет ли у других слитых с ослабленным IFN α 2b антител/белков, имеющих различные мишени связывания, модулироваться антитрополиферативная активность в результате удаления О-гликозилирования, были созданы две конструкции (из анти-CD138 антитела и анти-HLA-антитела, слитых с IFN (A145D) с или без О-гликозилирования (табл. 6)) и протестированы на антитрополиферативную активность.

Удаление сайта О-гликозилирования в участке ослабленного IFN конструкций, слитых с антителами (IgG4 (S228P)) со специфичностью в отношении HLA и CD138, приводило к увеличению антитрополиферативной активности вне зависимости от мишени антитела в конструкции. Это было продемонстрировано на слитых конструкциях с антителами против HLA и CD138 (фиг. 17).

Таблица 6

Конструкции различных интерфероновых слитых белков - анти-CD138 антитела и анти-HLA-антитела, слитых с IFN (A145D) с или без О-гликозилирования

Конструкции антител	Seq Id No.			
	Тяжела я цепь	Легкая цепь	IFN	VH+IFN
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	59	85	107	59
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	59	85	25	59
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	60	86	107	
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	60	86	25	

Влияние на антитрополиферативную активность удаления О-гликозилирования из слитых белков, содержащих замены в Fc-областиах, для увеличения времени полужизни или снижения эффекторной функции.

Было показано, что YTE-замены повышают сродство к FcR_n, предположительно увеличивая время полужизни антител) Слитые с интерфероном антитела, содержащие YTE-замены, были протестированы на антитрополиферативную активность в присутствии и в отсутствии О-гликозилирования) Следующие варианты были созданы из слитого белка A10.21 анти-CD38 антитело-ослабленный IFN (табл. 7).

Введение YTE-замен в A10.21 IgG4 (S228P) (A145D, T106A) не повлияло на повышение уровня активности, вызванное удалением О-гликозилирования в ослабленном IFN (фиг. 18).

Замены L235A и G237A в Fc-участке IgG1-вариантов и замены A330 и P331S в Fc-участке IgG2-вариантов приводят к снижению эффекторной функции) Слитые с ослабленным IFN IgG1-антитела, содержащие замены L235A и G237A, и слитые с ослабленным IFN IgG2-антитела, содержащие замены A330 и P331S, тестировали на антитрополиферативную активность в присутствии и в отсутствие О-гликозилирования. Эти варианты были созданы из слитого белка A10.21 анти-CD38 антитело-ослабленный IFN (табл. 7). Удаление сайта О-гликозилирования в участке ослабленного IFN в слитых с антителами конструкциях приводило к увеличению уровня активности, независимо от того, какой изотип антитела присутствовал в конструкциях - IgG1 или IgG1 AA (IgG1 (L235A, G237A)), IgG2 или IgG2 SS (IgG2 (A330, P331S)) (фиг. 19).

Таблица 7

А10.21-слитые белки, содержащие замены в Fc-областях
для увеличения времени полужизни или снижения эфекторной функции

Конструкции антител	Seq Id No.			
	Тяжела я цепь	Легкая цепь	IFN	VH+IFN
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	52	81	25	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	111	81	25	70
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106T)	53	81	107	
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106A)	53	81	25	72
A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106T)	112	81	107	
A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106A)	112	81	25	
A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	54	81	107	
A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	54	81	25	73

Удаление сайта О-гликозилирования из участка ослабленного интерферона сливых белков "анти-CD38 антитело-интерферон" с помощью аминокислотной замены или делеции T106 приводило к увеличению антипролиферативной активности в отношении целевых CD38, CD138 или HLA-положительных клеток (в 1,3-12 раз).

Пример 3. Специфичная и неспецифичная активность сливых белков антитело-ослабленный IFN α 2b.

Проводили метод анализа с использованием гена-репортера iLiteTM для количественного определения биологической активности человеческого интерферона-альфа (IFN α 2b) (МЕ/мл) с использованием генерируемой люциферазой биолюминесценции. Клетки, применяемые в этом методе анализа, экспрессируют CD38 и использовались для измерения специфичной активности сливых белков анти-CD38-ослабленный IFN α 2b. Эти клетки также могут быть использованы для измерения неспецифичной активности, когда CD38 блокируется анти-CD38 антителами, распознающими тот же эпипотоп. Эти методы анализа могут быть использованы для определения индекса селективности (SI), который является мерой того, насколько избирательно активны сливые белки анти-CD38-IFN в отношении CD38⁺-клеток-мишени и неактивны в отношении клеток, где CD38 блокируется (имитация CD38⁻-клеток). Чем выше SI, тем более селективными являются агенты в отношении мишени, тогда как число, близкое к 1, указывает на отсутствие избирательности между мишенью и не мишенью. В качестве положительного контроля был использован препарат Intron A, поскольку он активен в отношении клеток, которые экспрессируют рецепторы интерферона-альфа, IFNAR1/2, но не селективен в отношении других экспрессирующихся на клеточной поверхности антигенов (а именно, CD38), имея SI приблизительно равный 1.

Конструкции антитело-ослабленный IFN.

Последовательности для используемых конструкций приведены в списке последовательностей и перечислены в табл. 8.

Таблица 8

Конструкции антител	Seq Id №.			
	Тяжел ая цепь	Легка я цепь	IFN	VH+IF N
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D,	48	81	107	
T106T)				
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	48	81	25	87, 31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, ΔT106)	48	81	110	61
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106A)	48	81	24	63
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T)	50	81	107	
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106A)	50	81	25	68
A10.21 IgG1 IFN (A145D, ΔT106)	50	81	110	83
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	52	81	25	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	111	81	25	70
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106T)	53	81	107	
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106A)	53	81	25	72

A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	54	81	107	
A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	54	81	25	73
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	55	81	107	
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	55	81	25	74
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	75	82	107	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106R)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106N)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106D)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106C)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Q)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106H)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106I)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106L)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106K)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106J)	75	82	25	

T106M)				
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106F)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106P)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106W)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Y)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	75	82	25	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	58	84	107	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	58	84	25	77
OPG-Fc (IgG2) IFN (A145D, T106T)	57		107	
OPG-Fc (IgG2) IFN (A145D, T106A)	57		25	78
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	59	85	107	
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	59	85	25	
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	60	86	107	
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	60	86	25	

В качестве положительного контроля был использован INTRON® A.

Измерение специфичной и неспецифичной активности Специфичную и неспецифичную активность измеряли с использованием того же способа, как описанный выше "метод анализа гена-репортера iLite".

Метод анализа с использованием репортерного гена iLite (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ, кат. № 51100) проводили в целом, как описано производителем, с добавлением стадии блокирования IgG человека. Клеточная линия iLite описывается производителем, как "стабильно трансфицированная клеточная линия, полученная из коммерчески доступной клеточной линии промоноцитов человека, характеризующихся экспрессией антигенов МНС класса II, в частности человеческого лимфоцитарного антигена (HLADR), на клеточной поверхности". Клеточная линия экспрессирует CD38 и содержит стабильно трансфицированный ген люциферазы, экспрессия которого запускается интерферон-отвечающим элементом (IRE), что позволяет количественно определять активность интерферона, исходя из выходного сигнала люминесценции.

Поставляемые производителем, планшет iLite (далее аналитический планшет) и разбавитель вынимали из морозильника на -80°C и уравновешивали до комнатной температуры. 50 мкл разбавителя добавляли в каждую лунку аналитического планшета. Ампулу поставляемых производителем репортерных клеток вынимали из морозильника на -80°C и размораживали на водяной бане при 37°C. Аликвоты клеток по 25 мкл разливали в каждую лунку аналитического планшета. Далее в каждую лунку добавляли по 12,5 мкл человеческого IgG (8 мг/мл), разбавленного в среде RPMI 1640 + 10% FBS (Sigma Chemicals, St. Louis, MO; кат. № 14506)) Содержимое перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. В отдельном "планшете для разведения" тестируемые соединения серийно разводили в дупликатах в RPMI 1640 + 10% FBS. Затем по 12,5 мкл тестируемых соединений переносили из планшета для разведения в аналитический планшет. Аналитический планшет затем инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 17 ч. Поставляемые производителем аналитический буфер и субстрат вынимали из морозильника на -80°C и уравновешивали до комнатной температуры в течение 2 ч. Поставляемый производителем аналитический буфер добавляли в пробирку с поставляемым производителем субстратом и хорошо перемешивали в соответствии с инструкциями производителя, чтобы получить "люминесцентный раствор". Затем

по 100 мкл люминесцентного раствора добавляли в каждую лунку аналитического планшета. Планшет встряхивали в течение 2 мин. Затем планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин в темноте и считывали на Victor 3V Multilabel Counter в люминесцентном канале, и люминесценцию измеряли и представляли в виде RLU.

Для того чтобы проверить неспецифичную активность слитых белковых конструкций "анти-CD38 антитело-IFN" в методе анализа iLite, поставляемый производителем разбавитель дополняли 0,25 мг/мл анти-CD38-антитела (антитела, распознающего тот же эпипот на CD38, что и тестируемая слитая белковая конструкция антитела и IFN, чтобы блокировать любое связывание слитых белковых конструкций анти-CD38 антитело-IFN с CD38 экспрессирующимся на клетках iLite). За этой стадией блокировки следовала стадия обработки клеток слитым белком "анти-CD38 антитело-IFN" или просто IFN α 2b.

Данные были проанализированы с использованием Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA) с использованием нелинейной регрессии и подгонки трехпараметрической кривой, чтобы определить среднюю точку на кривой (EC₅₀). Индекс селективности (SI) рассчитывали как соотношение EC₅₀ (неспецифичная активность)/EC₅₀ (специфичная активность). Индекс селективности (SI) является мерой того, насколько избирательно активны конструкции анти-CD38 IFN в отношении экспрессирующих CD38 клеток и неактивны в отношении клеток, не несущих CD38. Чем больше это число, тем более избирательно соединение в отношении мишени, тогда как число, близкое к 1, указывает на отсутствие селективности по отношению к мишени. Intron A, используемый в качестве положительного контроля, имеет SI приблизительно равный 1.

Сайт О-гликозилирования слитых конструкций анти-CD38 антитело-ослабленный интерферон был удален путем замены 106-го треонина (T106) на аланин (показано, как T106A). Активность была исследована путем сравнения анти-CD38 антител A10.21 и A10.43, слитых с IFN α 2b с и без О-гликозилирования.

Удаление сайта О-гликозилирования в участке ослабленного IFN в слитых с антителами конструкциях (показано как T106A) приводило к небольшому увеличению специфичной активности (фиг. 3 и табл. 9), а также приводило к небольшому или не приводило к увеличению неспецифичной активности относительно О-гликозилированных белков. Оба О-гликозилированные и негликозилированные белки показывали высокую селективность по отношению к CD38 $^+$ -клеткам, тогда как Intron A был неселективным.

Таблица 9
EC₅₀ и SI для слитых белков анти-CD38 антитело A10.21 и
A10.43-ослабленный IFN α 2b с и без О-гликозилирования

Тестируемое соединение	EC ₅₀ (нМ)		SI
	Специфичная активность	Неспецифичная активность	
Intron A	0,00017	0,00016	0,90
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	0,00240	2,33	972
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	0,00182	2,23	1223
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	0,00560	2,31	412
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	0,00124	2,25	1822

Эффект удаления сайта О-гликозилирования из ослабленного IFN в слитых белках на специфичную/неспецифичную в отношении мишени активность также может быть исследован аналогичным образом.

Проводили анализ специфичной/неспецифичной активности с помощью репортерного гена iLiteTM для того, чтобы продемонстрировать избирательную активность слитых белков анти-CD38-ослабленный IFN в отношении клеток-мишени CD38 $^+$ и ограниченную активность в отношении клеток, когда CD38 блокировали с помощью анти-CD38 антитела (распознающего этот же эпипот), имитируя активность, ожидаемую в отношении не несущих мишень клеток.

Удаление сайта О-гликозилирования на участке ослабленного IFN в слитых с антителом конструкциях (путем замены T106A) приводило к небольшому увеличению специфичной активности, а также приводило к небольшому увеличению или не приводило к увеличению неспецифичной активности относительно О-гликозилированных белков. Оба О-гликозилированный и негликозилированный слитые белки анти-CD38 антитело-ослабленный интерферон имели высокую селективность по отношению к CD38 $^+$ -клеткам, тогда как Intron A не проявлял селективности.

Для дальнейшего изучения модуляции индекса селективности в результате удаления сайта О-гликозилирования в участке ослабленного IFN в слитых с антителами конструкциях, специфичную активность исследовали на ряде конструкций. Исследуемые изменения были основаны на конструкции A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T). Они включали удаление треонина 106 (Δ T106), замещение T106 на серии (T106S), YTE-замены (YTE T106T и YTE T106A), ослабление IFN путем замены 145-го аланина на глутамин (A145Q) и изменение изотипа антитела на IgG1 (IgG1 T106T и IgG1 T106A).

Большинство конструкций имело индекс селективности >1 , степень селективности относительно клеток-мишений CD38⁺ варьировалась в зависимости от анти-CD38-IFN слитой конструкции (фиг. 20). Высокая селективность наблюдалась для A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A).

Пример 4. Неспецифичная активность слитых белков антис-CD38 антитело-ослабленный IFN α 2b.

Клетки HEK-BlueTM IFN- α/β позволяют обнаруживать биологически активные человеческие интерфероны I типа путем мониторинга активации ISGF3-пути) Стимуляция клеток HEK-BlueTM IFN- α/β с IFN- α человека активирует JAK/STAT/ISGF3-путь, а затем индуцирует продукцию SEAP (ген-репортера под контролем индуцируемого IFN- α/β промотора ISG54). Уровень SEAP в надосадочной жидкости можно легко определить с использованием QUANTI-BlueTM. Эффекты удаления О-гликозилирования из участка ослабленного интерферона в слитых белках антител с интерфероном оценивали с использованием этого гена-репортера.

Получение слитых белковых конструкций антитело/Fc Различные транзиентно трансфицированные клетки, экспрессирующие слитые с интерфероном белки, собирали и очищали с использованием колонки Mab Select Sure Protein A. Образцы обессоливали в 200 мМ аргинине, 25 мМ гистидине с pH 6,5, используя колонку HiLoad Superdex 200.

Таблица 10

Конструкции антител	Seq Id No.			
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	IFN	VH+IFN
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	48	81	25	87, 31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, Δ T106)	48	81	110	61
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106A)	48	81	24	63

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T)	50	81	107	
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106A)	50	81	25	68
A10.21 IgG1 IFN (A145D, ΔT106)	50	81	110	83
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69

A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	52	81	25	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)		81	25	70
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106T)	53	81	107	
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106A)	53	81	25	72
A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	54	81	107	
A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	54	81	25	73
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	55	81	107	
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	55	81	25	74
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	75	82	107	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106R)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106N)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106D)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106C)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106)	75	82	25	

T106Q)				
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106H)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106I)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106L)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106K)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106M)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106F)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106P)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106W)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Y)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	75	82	25	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	58	84	107	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	58	84	25	77
OPG-Fc (IgG2) IFN (A145D, T106T)	57		107	
OPG-Fc (IgG2) IFN (A145D, T106A)	57		25	78
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	59	85	107	
Анти-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	59	85	25	
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	60	86	107	
Анти-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	60	86	25	

INTRON® A был использован в качестве положительного контроля.

Измерение неспецифичной активности методом анализа HEK-Blue.

Неспецифичную активность слитых белков антитело-IFN измеряли, используя тот же метод, как описанный в "методе анализа неспецифичной активности HEK-Blue", за исключением используемых объемов посевянных клеток, разведенных антител и супернатанта. Подробное описание анализа приведено ниже.

Анализ неспецифичной активности HEK-Blue использовали для количественной оценки способности слитых конструкций антитело-IFN связывать рецептор интерферона- α/β (IFNAR) с использованием клеток линии HEK-Blue™ IFN- α/β (Invivogen, Сан Диего, CA). "Метод анализ неспецифичной активности (HB-IFN)" проводили в целом, как описано производителем клеточной линии HEK-Blue™ IFN- α/β . Клетки HEK-Blue™ IFN- α/β специально разработаны для мониторинга активации JAK-STAT-пути, который индуцируется интерферонами I типа. Клетки были получены путем введения генов STAT2 и IRF9

человека в клетки HEK293, чтобы получить полностью активный сигнальный путь интерферонов I типа. Клетки HEK-Blue™ IFN- α/β стабильно экспрессируют репортерный ген - секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP) под контролем промотора ISG54. ISG54 является хорошо известным ISG, активируемым через ISRE-зависимый механизм интерферонами I типа. При стимуляции IFN- α или IFN- β , клетки HEK-Blue™ IFN- α/β активируют JAK-STAT-путь, а затем экспрессию гена-репортера SEAP. SEAP секретируется в среду и может быть количественно определен с помощью колориметрического реагента QUANTI-Blue™.

Кратко, клетки HEK-Blue™ IFN- α/β (Invivogen, San Diego CA, кат. № HKB-IFNAB) размораживали и культивировали в среде DMEM (Mediatech, Manassas VA, кат. № 10-013-CV) +10% FBS (Hyclone, Logan UT, кат. № SH30070.03), которая была инактивирована нагреванием (HI FBS). Когда клетки достигали 60-80% конфлюентности, их снимали с помощью Cell Stripper (Mediatech, кат. № 25-056-Cl). Клетки дважды промывали в DMEM+HI FBS и подсчитывали их число. Концентрацию клеток доводили до $2,77 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл в DMEM+HI FBS и высевали по 180 мкл/лунку в плоскодонный 96-луночный культуральный планшет (далее "экспериментальный планшет"). Затем в каждую лунку добавляли по 20 мкл IFN α 2b или слитых белковых конструкций, разведенных в DMEM+HI FBS. Планшет инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 16-24 ч. QUANTI-Blue (Invivogen, кат. № гер-ф1) подготавливали в соответствии с рекомендациями производителя. QUANTI-Blue (180 мкл) добавляли в каждую лунку плоскодонного планшета (далее "аналитического планшета"). Затем по 20 мкл супернатанта на лунку из экспериментального планшета переносили в аналитический планшет. Затем аналитический планшет инкубировали при 37°C в течение 1-3 ч. Оптическую плотность для аналитического планшета при 620 нм определяли на модели SpectraMaxPlus 384 микропланшетного спектрофотометра от Molecular Devices. Данные были проанализированы с помощью Graph Pad Prism.

Оценивали влияние наличия или отсутствия О-гликозилирования в IFN α 2b на неспецифичную активность анти-CD38 антител, слитых с ослабленным IFN.

Сайт О-гликозилирования в слитых конструкциях анти-CD38 антитела с ослабленным интерфероном удаляли либо заменой 106-го треонина (T106) на аланин (показано, как T106A), либо удалением T106 (показано, как ΔT106). Влияние на неспецифичную активность исследовали путем сравнения X10.21 анти-CD38 антител, слитых с ослабленным IFN α 2b с и без О-гликозилирования.

Удаление сайта О-гликозилирования в участке ослабленного IFN в слитых с антителами конструкциях приводило к небольшому увеличению неспецифичной активности по сравнению с О-гликозированными белками, а именно с A10.21 IgG4 IFN (145D, T106T) и A10.21 IgG1 IFN (145D, T106T) (фиг. 5). Эта тенденция сохранялась вне зависимости от изотипа антитела (фиг. 5). Однако IFN α 2b (A145D) является настолько ослабленным, что уровень индукции SEAP в этом анализе ограничен даже при самых высоких используемых дозах. Поэтому EC50 является лишь приблизительной.

Была исследована неспецифичная активность антител, слитых с ослабленным IFN (R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D)), несущих различные аминокислотные замены для удаления О-гликозилирования. Были протестированы все возможные аминокислотные замены, а конструкции приведены в табл. 11.

Таблица 11

Название конструкции	Seq Id No.		
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	IFN
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	75	82	107
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106R)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106N)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106D)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106C)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Q)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106H)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106I)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106L)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106K)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106M)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106F)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106P)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106W)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Y)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	75	82	25

Было показано, что каждая из этих замен давала аналогичную или немного меньшую неспецифичную активность (увеличение EC₅₀) относительно О-гликозилированного IFN-слитого антитела R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T). Однако IFN α 2b (A145D) является настолько ослабленным, что уровень индукции SEAP в этом анализе ограничен даже при самых высоких используемых дозах. Поэтому EC₅₀ является лишь приблизительной.

Исследовали неспецифичную активность конструкции с другим анти-CD38 антителом и ослабленным IFN α 2b и влияние удаления О-сцепленного гликозилирования путем замены T106A. A10.43 имеет 7

аминокислотных замен в тяжелой цепи по сравнению с A10.21, при этом обе конструкции имеют одну последовательность легкой цепи (см. список последовательностей). Результаты показали, что удаление сайта О-гликозилирования путем замены T106A немножко увеличивало неспецифичную активность A10.43. Однако IFN α 2b (A145D) является настолько ослабленным, что уровень индукции SEAP в этом анализе ограничен даже при самых высоких используемых дозах. Поэтому EC₅₀ является лишь приблизительной.

Удаление сайта О-гликозилирования в участке ослабленного IFN в слитых конструкциях интерферона с антителом приводит к небольшому или не приводит к увеличению неспецифичной активности, а также дает небольшое увеличение специфичной активности по сравнению с О-гликозилированными белками. Оба О-гликозилированный и негликозилированный варианты слитых белков анти-CD38 антитело-ослабленный интерферон показывали высокую избирательность по отношению к CD38⁺-клеткам, тогда как Intron A не проявлял селективности.

Пример 5. Оценка связывания неонатального Fc-рецептора человека (FcRn) с анти-CD38-ослабленным IFN.

Поли-His-меченный FcRn был иммобилизован на указанные рабочие проточные ячейки сенсорного чипа CM5 в усовершенствованном приборе Biacore T200 с использованием протокола присоединения по аминогруппам, тогда как отрицательную контрольную иммобилизацию проводили на референсных проточных ячейках. Поли-His-меченный FcRn наносили импульсно на рабочую поверхность, чтобы гарантировать предварительное концентрирование раствора на проточной ячейке. Поверхности затем промывали 50 mM NaOH. Обе референсную и рабочую поверхности активировали в течение 7 мин смесью 50:50 EDC/NHS. После чего поли-His-меченный FcRn вводили серией импульсов в количестве 2 мкг/мл в 10 mM ацетате натрия, pH 5,0 только на рабочие поверхности. После достижения целевого значения 150 RU, обе поверхности были деактивированы 1 M этаноламином с pH 8,5 в течение 7 мин. Этот протокол обеспечивал иммобилизацию примерно 150 RU поли-His-меченого FcRn на рабочих поверхностях. Каждая рабочая поверхность использовалась для одного прогона.

Тестируемые антитела обессоливали в рабочем буфере PBS-P (DPBS, pH 7,4 и 0,005% Tween-20 подводили до pH 6,0 с помощью HCl при 25°C) с использованием обессоливающих колонок Zeba Spin, 7K MWCO, 0,5 мл (Pierce, кат. № 89882). После обессоливания концентрацию каждого образца доводили до 1 мг/мл.

В день анализа 1 мг/мл растворы дополнительно разводили в рабочем буфере, чтобы получить самую высокую концентрацию, а затем разводили в соотношении 1:2, чтобы создать серию концентраций. Тестируемые образцы пропускали над поверхностью при скорости потока 50 мкл/мин. Фаза ассоциации составляла 100 с, а фаза диссоциации составляла 300 секунд для всех тестируемых концентраций. Рабочие и референсные поверхности регенерировали путем 60-секундной второй инъекции 100 mM Трис, 50 mM NaCl с pH 8,0 для удаления тестируемого антитела. Константы связывания были определены при 25°C.

Связывание антител и поли-His-FcRn оценивали с использованием модели двухстадийной реакции, где R_{max} был установлен локально, и параметр RI (показатель преломления) был установлен локально. Для всех данных проводили двойное вычитание референсных значений: во-первых, вычитали сигнал из референсной ячейке (отрицательная контрольная иммобилизация) в результате связывания антитела с декстрановой матрицей и, во-вторых, вычитали сигнал от нулевой (0 нМ) концентрации антитела на рабочей поверхности.

Константы связывания были определены по меньшей мере для двух отдельных прогонов для каждого антитела. Для каждого прогона в качестве положительного контроля тестировали антитело Prolia (партия № 1035726) вместе с образцом анти-CD38/IFN. Были определены средние значения для k_{a1}, k_{d1}, k_{a2}, k_{d2} и K_D.

Были измерены средние значения скорости и аффинности связывания с FcRn для четырех слитых белков анти-CD38/IFN (A10.21 IgG4 четырех (S228P) IFN (A145D, T106A), A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T), A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A), A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)). В данном наборе образцов клон A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A) проявлял самое высокое средство к FcRn.

Пример 6. Эффективность анти-CD38 антител, слитых с ослабленным интерфероном-альфа2в с и без О-гликозилирования, в мышиной модели множественной миеломы NCI-H929

Таблица 12
Лекарственные соединения и схема воздействия

Группа	Число животных (N)	Схема 1			
		Агент	мкг/животное	Путь введения	Схема
1*	8	Носитель	20	внутрибрюшинно	Дважды в неделю x 5
2	8	A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	20	внутрибрюшинно	Дважды в неделю x 5
3	8	A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	20	внутрибрюшинно	Дважды в неделю x 5
4	8	A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	20	внутрибрюшинно	Дважды в неделю x 5
5	8	A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	20	внутрибрюшинно	Дважды в неделю x 5
#	- контрольная группа				

Процедуры.

Введение CR-самкам SCID-мышей СВ.17 по 1×10^7 опухолевых клеток H929 в 50%-ном Матригеле подкожно в бок.

Объем инъекции клеток составляет 0,2 мл/мышь.

Возраст на момент начала эксперимента: от 8 до 12 недель.

Подбор соответствующих пар, когда опухоли достигают среднего размера 170-350 mm^3 , и начало лечения.

Объем вводимой дозы = 0,2 мл/мышь. Не регулировать относительно массы тела.

Измерения веса тела: ежедневно 5 дней, затем дважды в неделю до конца эксперимента.

Измерения штангенциркулем: дважды в неделю до конца эксперимента.

Конечная точка задержки роста опухоли (TGD). Животные должны проверяться по отдельности. Конечной точкой эксперимента является объем опухоли 2000 mm^3 или 60 дней в зависимости от того, что наступит первым. За отвечающими на лечение животными можно наблюдать дольше. По достижении конечной точки животные должны быть умерщвлены в соответствии с SOP #687.

Результаты показаны на фиг. 8. Примерно эквивалентная эффективность наблюдалась для сливых белков с и без О-гликозилирования, причем агликозилированная форма была немного более активной в отношении торможения роста опухоли.

Пример 7.

В оценке связывания с неонатальным Fc-рецептором человека (FcRn) анти-CD38 антител, сливых с ослабленным IFN с и без О-гликозилирования, белки без О-гликозилирования проявляли самое высокое сродство к FcRn. Влияние агликозилирования может быть оценено на обезьянах и мышах с гуманизированным FcRn.

Исследование на яванских макаках.

Схема исследования на макаках для сравнения эффекта присутствия и отсутствия гликозилирования (+/- O-glyc).

Однократная внутривенная инфузия 3 мг/кг (1 ч) через стационарный катетер:

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106A) (n=4),

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106T) (n=4),

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106A) (n=4),

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106T) (n=4).

Сравнить фармакокинетику (PK) и фармакодинамику (PD) (биологический эффект, а именно сывороточный уровень неоптерина).

PK: все обезьяны, ≤ 1 мл, 11 временных точек (перед введением, 0-я минута (сразу после окончания инфузии), 2, 6, 12, 24, 48, 96, 120, 168 и 240 ч после инфузии. Образцы (80) анализируют с помощью ELISA.

PK-моделирование: WinNonlin Table Assembly (некомпартментный анализ).

Клиническая патология: общий и биохимический анализ крови - для всех обезьян, 3 раза (до введения, через 24 ч после введения и на 8-й день).

Сывороточный неоптерин - для всех обезьян, ~0,5 мл 3 раза в 5 временных точках (перед введением, через 12, 24, 96, 168 ч после введения дозы).

Фармакокинетические исследования на мышах с гуманизированным FcRn

1. 32 самкам мышей B6. Cg-Fcgr^{tm1Dcr}Tg (CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ (JAX партия № 004919) вводили в день "1" с помощью внутрибрюшинной инъекции 1 мг/кг:

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106A) (n=8),
 A10.21 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106T) (n=8),
 A10.43 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106A) (n=8),
 A10.43 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106T) (n=8).

2. Массу тела измеряли за 3 дня до введения дозы, в день введения дозы и затем еженедельно.

3. Наблюдения за животными в клетках проводятся ежедневно, и клинические наблюдения проводятся еженедельно.

4. Сбор крови для фармакокинетического анализа: у мышей собирают кровь (по 25 мкл) за 3 дня до введения дозы и после введения через 1, 12, 24, 48 и 72 ч и через 5, 7, 10 и 14 дней. У мышей собирают кровь в 2 когортах (4 мыши/группу/когорту).

5. Всех мышей умерщвляют на 14-й день. Для сбора крови проводят терминальную пункцию сердца.

6. Кровь собирают в пробирки с гепарином лития и центрифугируют 2 мин при 10000 об/мин при 4°C.

7. Образцы плазмы разводят 1:10 в PBS и замораживают до анализа связывания с помощью ELISA с белками A10.21 IgG4 IFN (145D), A106, A10.21 IgG4 IFN (145D) T106, A10.43 IgG4 IFN (145D) A106 или A10.43 IgG4 IFN (145D) T106.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый полипептид, способный к связыванию с CD38, содержащий первый и второй домены, где первый домен содержит антитело или его антигенсвязывающий участок, который связывается с CD38;

второй домен содержит агликозилированный интерферон- α 2b (IFN α 2b), имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, где

агликозилированный IFN α 2b дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен или делеций, ослабляющих активность агликозилированного IFN α 2b; и

антитело или его антигенсвязывающий участок включает комплементарные области CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи V_H, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48-56 и 58, и комплементарные области CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи V_L, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, 82 и 84.

2. Слитый полипептид по п.1, где последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, в которой остаток в положении 106 выбран из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W и Y.

3. Слитый полипептид по п.1 или 2, где последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, в которой остатком в положении 106 является A.

4. Слитый полипептид по любому одному из пп.1-3, где последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 1, модифицированная посредством мутации, выбранной из группы, состоящей из L15A, R22A, R23A, S25A, L26A, F27A, L30A, L30V, K31A, D32A, R33A, R33K, R33Q, H34A, Q40A, D114R, L117A, R120A, R120E, R125A, R125E, K131A, E132A, K133A, K134A, M148A, R149A, S152A, L153A, N156A, (L30A, H57Y, E58N и Q61S), (M148A, H57Y, E58N и Q61S), (L153A, H57Y, E58N и Q61S), (R144A, H57Y, E58N и Q61S), (N65A, L80A, Y85A и Y89A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и D114A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и L117A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и R120A), (Y85A, Y89A и D114A), (D114A и R120A), (L117A и R120A), (L117A, R120A и K121A), (R120A и K121A), (R120E и K121E), замены R в положении 144 на A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V или Y, замены A в положении 145 на D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V или Y и удаления остатков с L161 по E165.

5. Слитый полипептид по любому одному из пп.1-3, где последовательностью агликозилированного IFN α 2b является SEQ ID NO: 2, модифицированная мутацией, выбранной из группы, состоящей из L15A, R22A, R23A, S25A, L26A, F27A, L30A, L30V, K31A, D32A, R33A, R33K, R33Q, H34A, Q40A, D113R, L116A, R119A, R119E, R124A, R124E, K130A, E131A, K132A, K133A, M147A, R148A, S149A, L152A, N155A, (L30A, H57Y, E58N и Q61S), (M147A, H57Y, E58N и Q61S), (L152A, H57Y, E58N и Q61S), (R143A, H57Y, E58N и Q61S), (N65A, L80A, Y85A и Y89A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и D113A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и L116A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A и R119A), (Y85A, Y89A и D113A), (D113A и R119A), (L116A и R119A), (L116A, R119A и K120A), (R119A и K120A), (R119E и K120E), за-

мены R в положении 143 на A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V или Y, замены A в положении 144 на D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V или Y и удаления остатков с L160 по E164.

6. Слитый полипептид по любому одному из пп.1-5, где последовательность агликозилированного IFN α 2b выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-30 и SEQ ID NO: 32-47.

7. Слитый полипептид по любому одному из пп.1-6, где V_H-последовательность антитела выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48-56 и 58.

8. Слитый полипептид по любому одному из пп.1-7, где V_L-последовательность антитела выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, 82 и 84.

9. Слитый полипептид по любому одному из пп.1-8, где первый домен соединен со вторым доменом через пептидную связь.

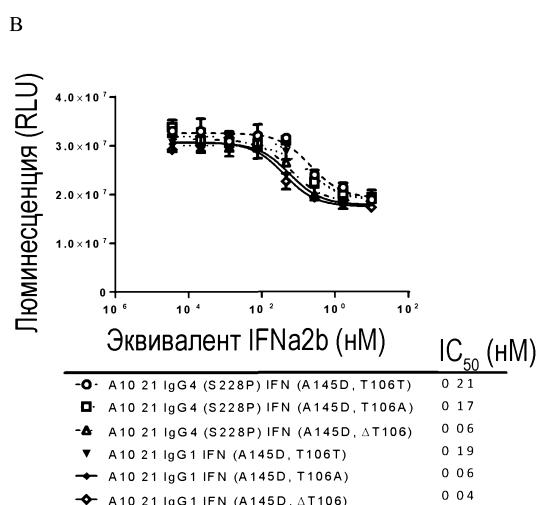
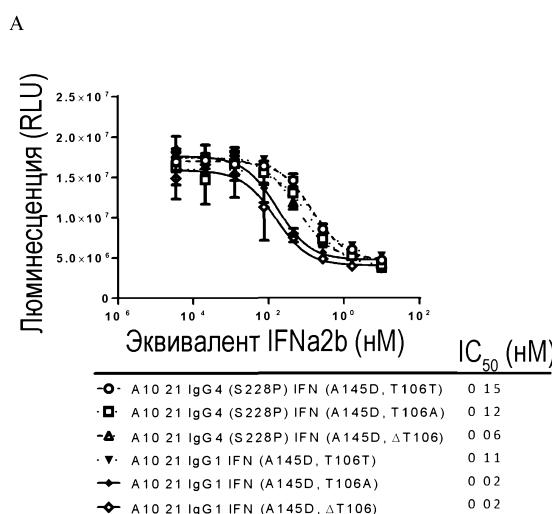
10. Слитый полипептид по любому одному из пп.1-8, где первый домен соединен со вторым доменом напрямую через пептидную связь.

11. Слитый полипептид по любому одному из пп.1-8, где С-конец первого домена связан с N-концом второго домена.

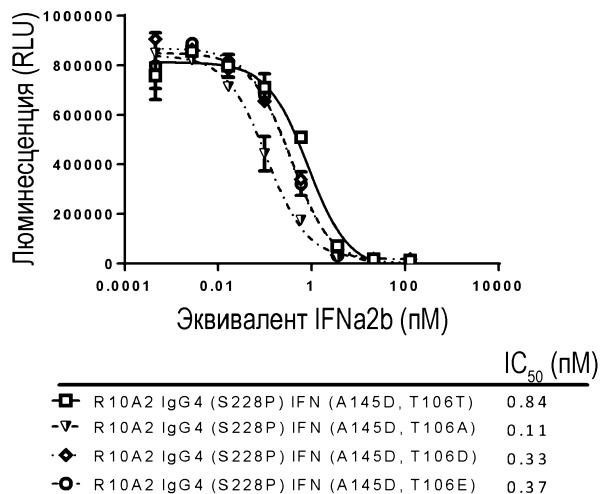
12. Применение слитого полипептида по любому одному из пп.1-11 для лечения опухоли, где первый домен слитого полипептида связывается с клетками опухоли.

13. Применение слитого полипептида по п.12 в лечении рака, который является множественной миеломой или неходжкинской лимфомой.

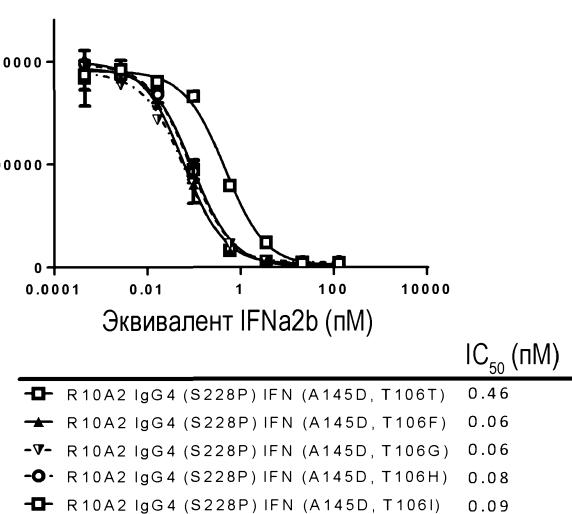
14. Выделенный полинуклеотид, кодирующий слитый полипептид по любому одному из пп.1-11.



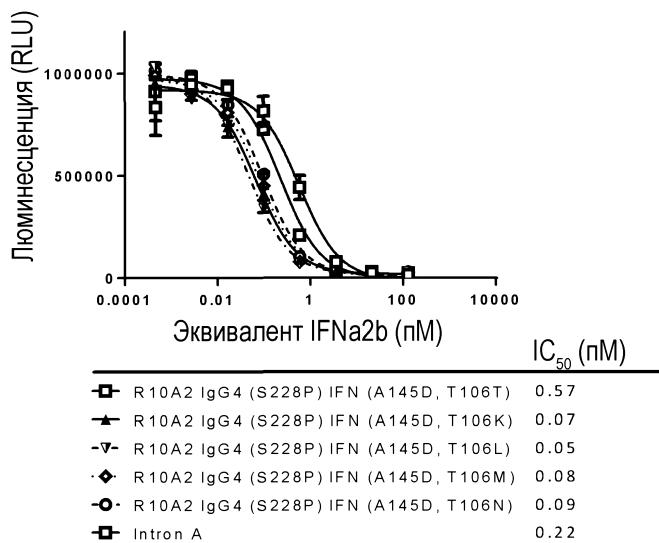
Фиг. 1



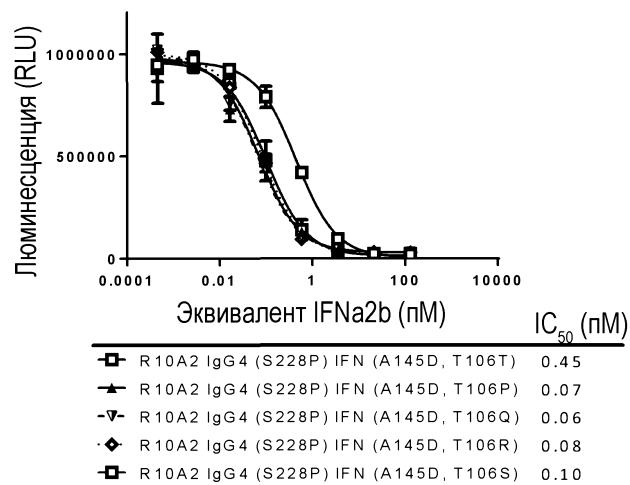
Фиг. 2А



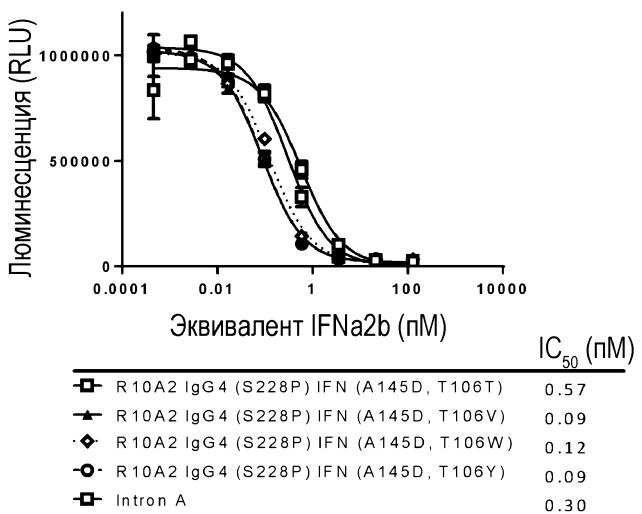
Фиг. 2В



Фиг. 2С

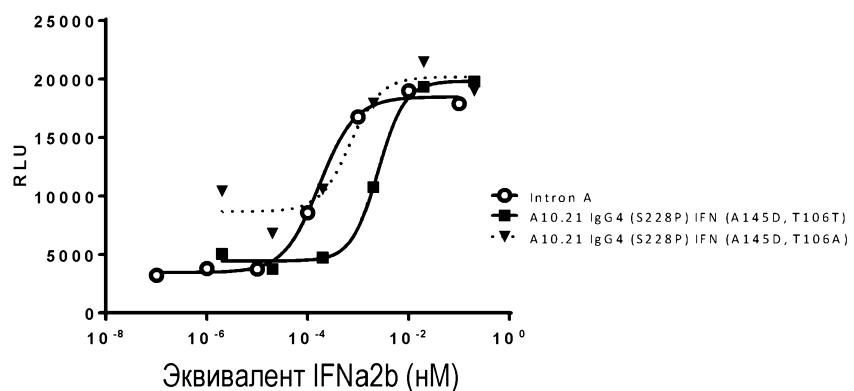


Фиг. 2D

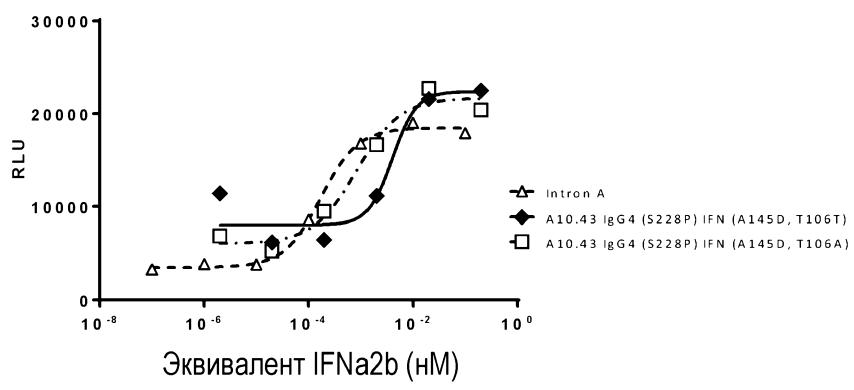


Фиг. 2E

A.

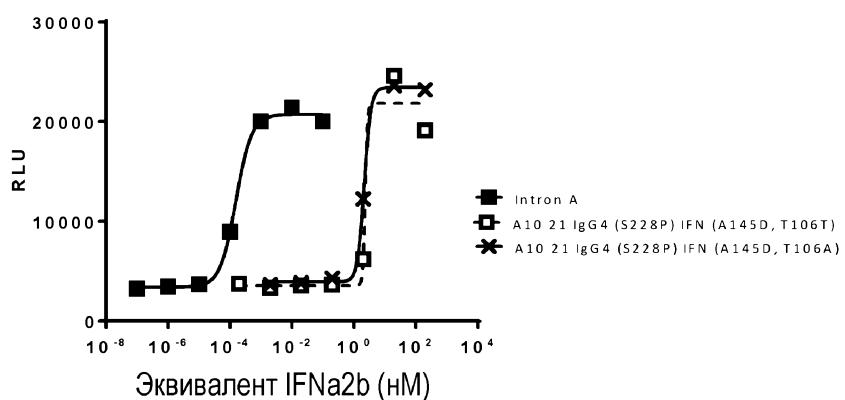


B.

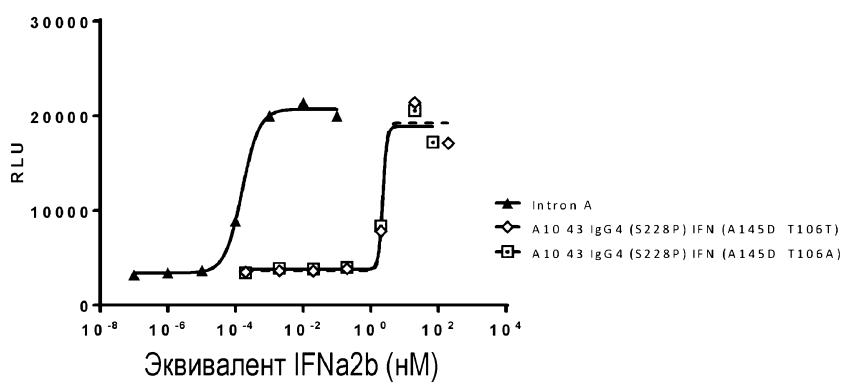


Фиг. 3

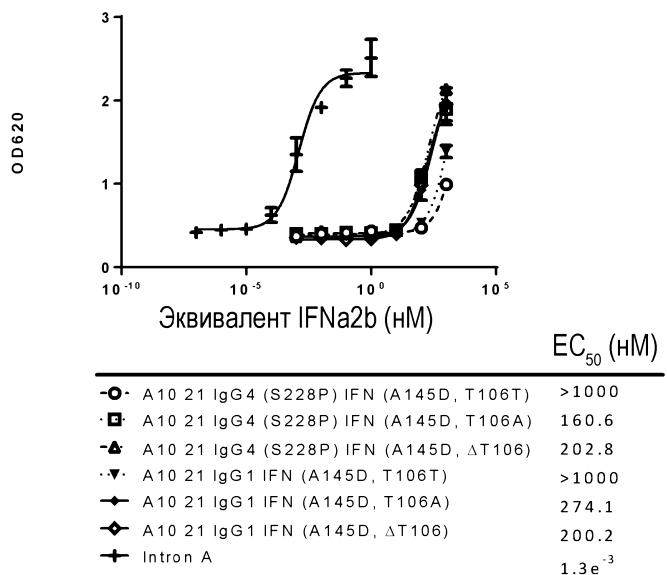
A



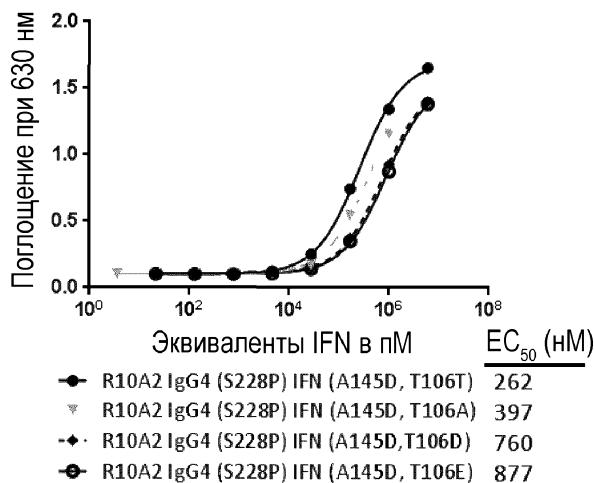
B



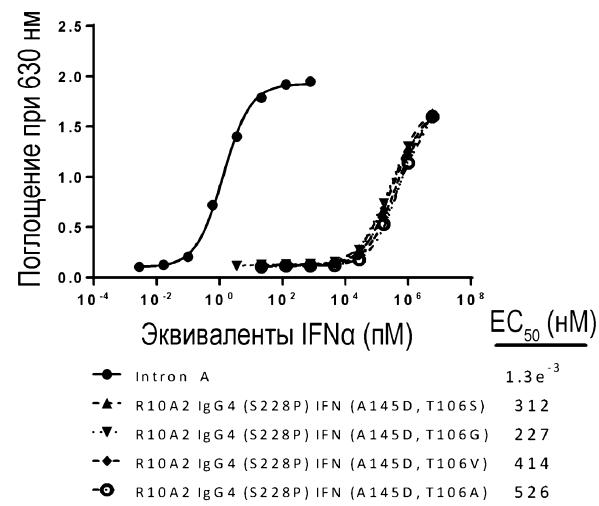
ФИГ. 4



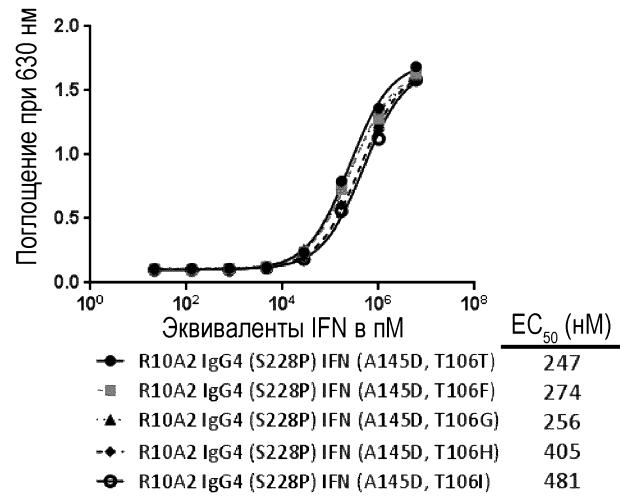
ФИГ. 5



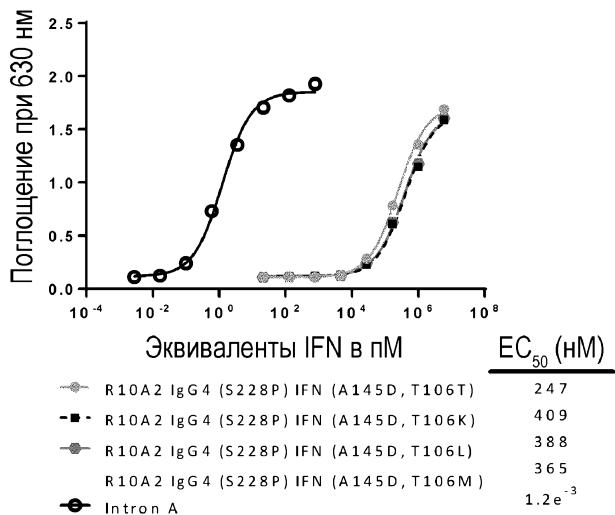
Фиг. 6А



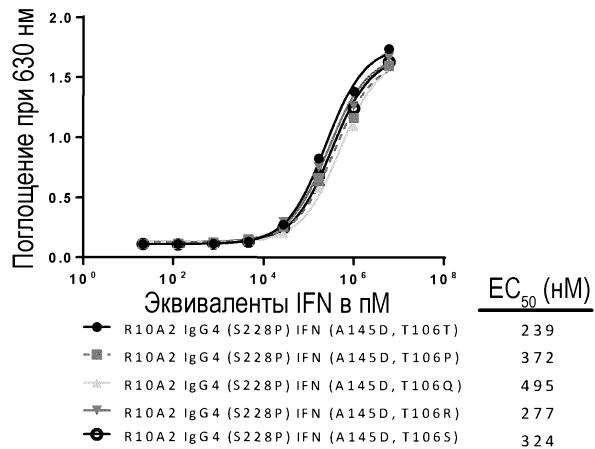
Фиг. 6В



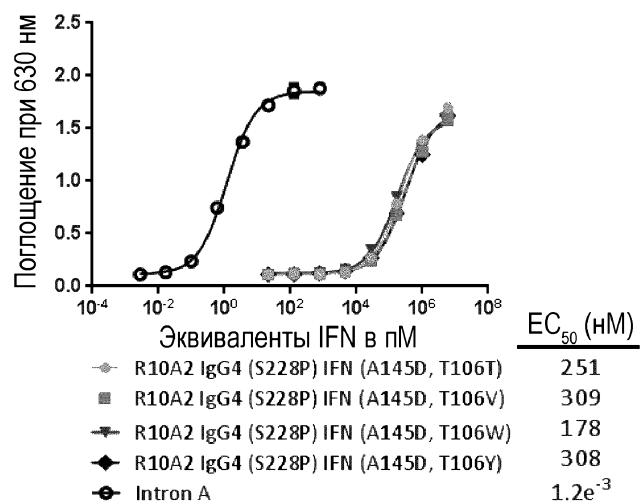
Фиг. 6С



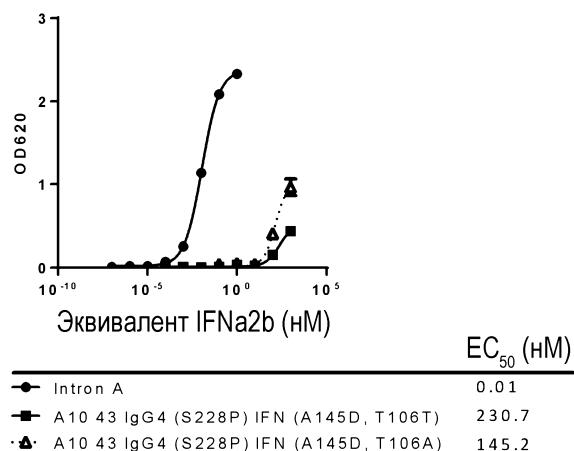
Фиг. 6Д



Фиг. 6Е



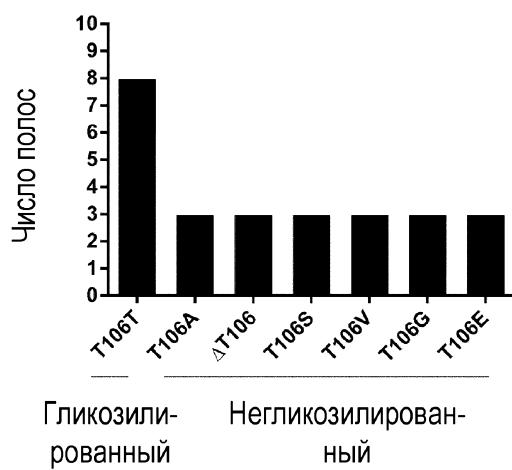
Фиг. 6F



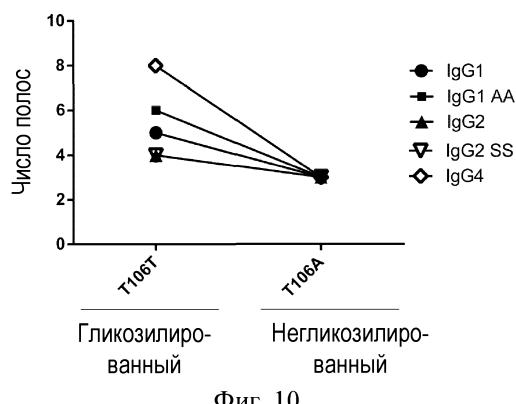
Фиг. 7



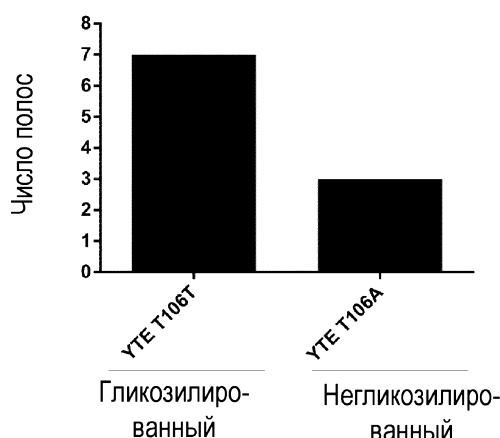
Фиг. 8



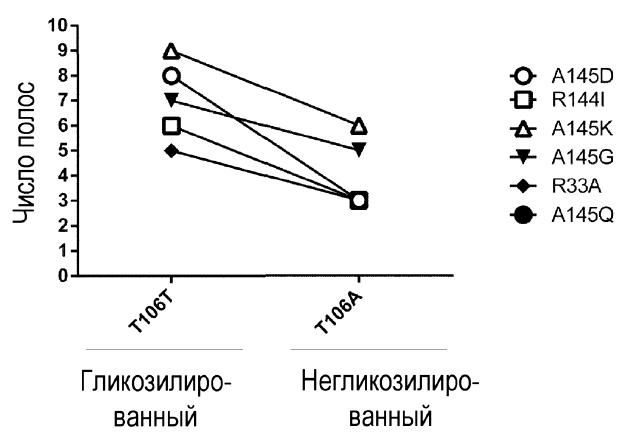
Фиг. 9



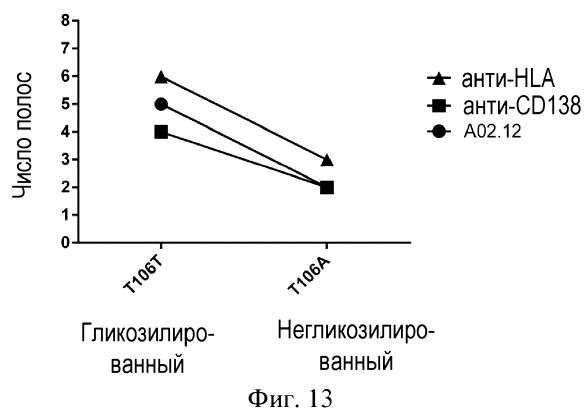
Фиг. 10



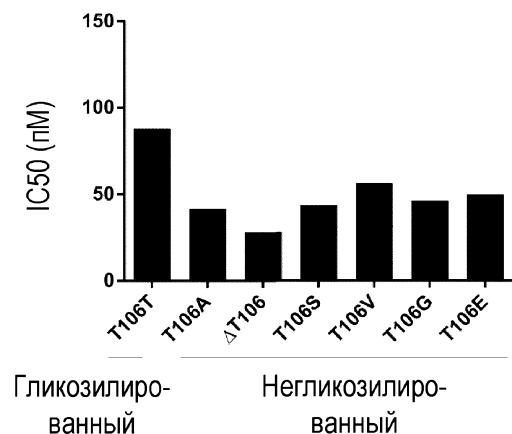
Фиг. 11



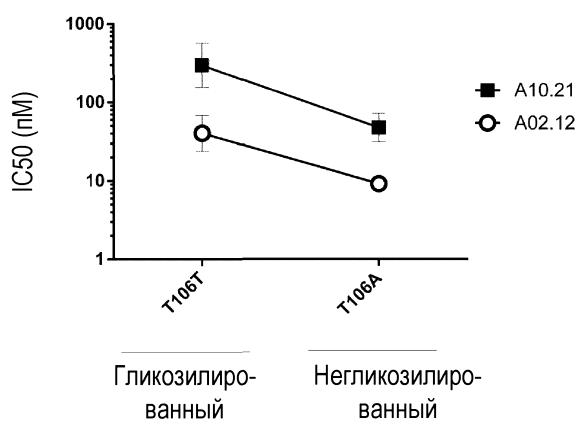
Фиг. 12



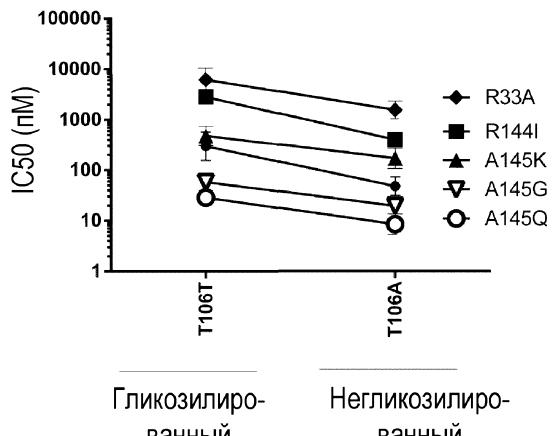
Фиг. 13



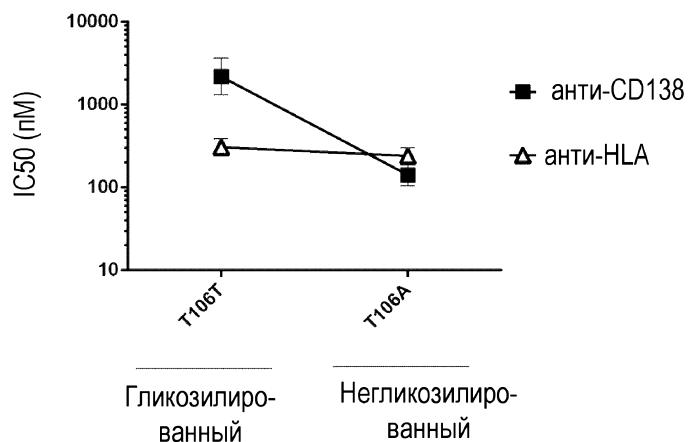
Фиг. 14



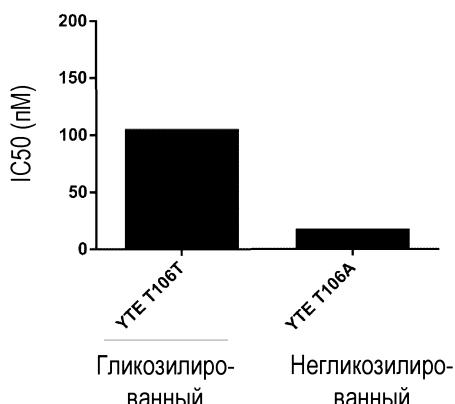
Фиг. 15



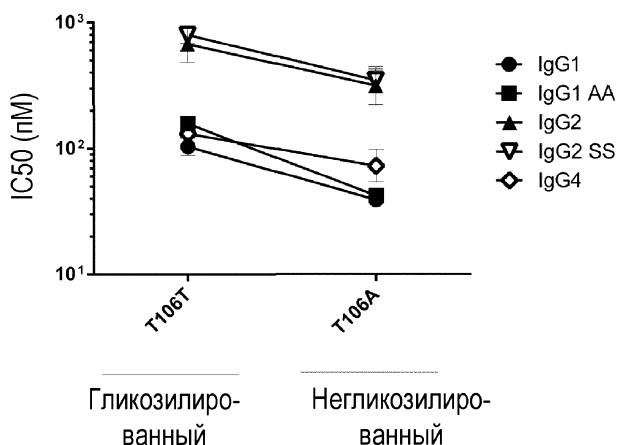
И



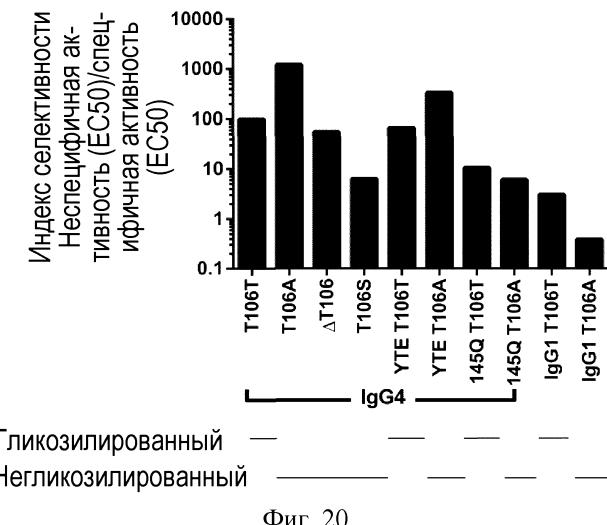
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

