



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.26

(21) Номер заявки
202090581

(22) Дата подачи заявки
2018.10.03

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(54) ПРОДУКТЫ СЛИЯНИЯ ТРАНСТИРЕТИНА И ИММУНОГЛОБУЛИНА

(31) **62/568,217**

(32) **2017.10.04**

(33) **US**

(43) **2020.08.31**

(86) **PCT/US2018/054237**

(87) **WO 2019/070901 2019.04.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АМГЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Уолкер Кеннет (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) KRIANGKUM J ET AL: "Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies", BIOMOLECULAR ENGINEER, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 18, no. 2, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 31-40, XP004304464, ISSN: 1389-0344, DOI: 10.1016/S1389-0344(01)00083-1 figure 1
PACK P ET AL: "IMPROVED BIVALENT MINIANTIBODIES, WITH IDENTICAL AVIDITY AS WHOLE ANTIBODIES, PRODUCED BY HIGH CELL DENSITY FERMENTATION OF ESCHERICHIA COLI", BIOTECHNOLOGY, THE INTERNATIONAL MONTHLY FOR INDUSTRIAL BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, US, vol. 11, no. 11, 1 November 1993 (1993-11-01), pages 1271-1277, XP000608190, ISSN: 0733-222X figure 1

DEYEV S M ET AL: "Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC, vol. 21, no. 12, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 1486-1492, XP002372739, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT916 abstract; figure 1

D. M. GOLDENBERG ET AL: "Multifunctional Antibodies by the Dock-and-Lock Method for Improved Cancer Imaging and Therapy by Pretargeting", THE

JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 49, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 158-163, XP055028152, ISSN: 0161-5505, DOI: 10.2967/jnumed.107.046185 cited in the application figure 2

T. R. DANIELS ET AL: "Conjugation of an anti transferrin receptor IgG3-avidin fusion protein with biotinylated saporin results in significant enhancement of its cytotoxicity against malignant hematopoietic cells", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 6, no. 11, 7 November 2007 (2007-11-07), pages 2995-3008, XP055528358, US ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0330 Last paragraph of the article; figure 1

KIPRIYANOV SERGEY M ET AL: "Affinity enhancement of a recombinant antibody: Formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion", PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 9, no. 2, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 203-211, XP002149410, ISSN: 0269-2139 cited in the application figure 1

SCHULTZ J ET AL: "A TETRAVALENT SINGLE-CHAIN ANTIBODY-STREPTAVIDIN FUSION PROTEIN FOR PRETARGETED LYMPHOMA THERAPY", CANCER RESEARCH, & 102ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); ORLANDO, FL, USA; APRIL 02-06, 2011, vol. 60, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 6663-6669, XP001073683, ISSN: 0008-5472 introductory part and last paragraph of the Discussion part; figure 2

CN-A-106977609

WO-A2-2012170438

WO-A1-2007085837

WOLFF E A ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODY HOMODIMERS: ENHANCED ANTITUMOR ACTIVITY IN NUDE MICE", CANCER RESEARCH, & 102ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); ORLANDO, FL, USA; APRIL 02-06, 2011, vol. 53, no. 11, 1 June 1993 (1993-06-01), pages 2560-2565, XP008061639, ISSN: 0008-5472

(57) Настоящее изобретение относится к продуктам слияния на основе транстиретина (TTR), пригодным для димеризации и тетрамеризации антител и фрагментов антител, таких как Fab. Описанные в данном изобретении белки слияния на основе TTR особенно пригодны для повышения avidности антител и для усиления кластеризации антигенов. Способы лечения заболеваний с применением слитых белков по настоящему изобретению описаны в данном документе.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с 35 U.S.C. 119(e) по предварительной заявке на патент США № 62/568217, поданной 4 октября 2017 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к продуктам слияния на основе транстиретина (TTR), пригодным для димеризации и тетрамеризации антител и фрагментов антител, таких как Fab. Описанные в данном документе белки слияния на основе TTR особенно пригодны для повышения avidности антител и для усиления кластеризации антигенов. Способы лечения заболеваний с применением слитых белков по настоящему изобретению описаны в данном документе.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронной форме посредством ePCT. Перечень последовательностей представлен в виде текстового файла под названием A-2196-WO-PCT_Sequence_Listing_ST25.txt, созданного 2 октября 2018 г., размер которого составляет 69791 байт. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки создания изобретения

Транстиретин (TTR) представляет собой нековалентный тетрамерный белок сыворотки крови и спинномозговой жидкости человека, ответственный за увеличение периода полужизни в сыворотке крови ретинол-связывающего белка, а также за перенос части циркулирующего тироксина. Нативный человеческий мономер имеет молекулярную массу приблизительно 14 кДа, хотя TTR обычно присутствует в виде тетрамерного сывороточного белка массой 56 кДа.

TTR и варианты TTR ранее были слиты с биологически активными средствами для увеличения периода полужизни таких веществ в сыворотке крови. Например, были разработаны по существу гомогенные препараты продуктов слияния TTR (или варианта TTR) с биологически активным средством и продуктов слияния PEG-TTR (или варианта PEG-TTR) с биологически активным средством, которые демонстрируют увеличенный период полужизни в сыворотке крови по сравнению с биологически активным средством в отдельности. См., например, US20030191056, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кроме того, предыдущие попытки осуществить мультимеризацию белков включают применение стрептавидина (Kipriyanov et al., Protein Engineering, 9(2):203-211 (1996)), конструкций типа спираль-петля-спираль (Kriangkum et al., Biomolecular Engineering, 18:31-40 (2001)), лейциновых застёжек (Kruif et al., The Journal of Biological Chemistry, 271(13):7630-7634, 1996 (1996)), комплексов барназа/барстар (Deyev et al., Nature Biotechnology, 21(12): 1486-1492 (2003)) и технологии Dock N Lock (взаимодействия протеинкиназы и якорного домена якорного белка А-киназы) (Goldenberg et al., Journal of Nuclear Medicine, 49(1): 158-163 (2008)).

Однако остается потребность в мультимеризованных белках, таких как мультимеризованные полные антитела и фрагменты антител (например, Fab), которые демонстрируют улучшенные биологические и терапевтические свойства. Например, остается потребность в мультимеризованных белках, которые имеют повышенную avidность антител и улучшенную кластеризацию антигенов по сравнению с их немультимеризованными аналогами.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к гомодимерному слитому белку, содержащему два антигенсвязывающих белка, где антигенсвязывающие белки связаны с белковым комплексом. В конкретном аспекте белковый комплекс представляет собой белковый комплекс на основе TTR (TTR-белковый комплекс). В конкретном аспекте антигенсвязывающий белок представляет собой антитело. В другом конкретном аспекте антигенсвязывающие белки непосредственно слиты без линкера с белковым комплексом. В другом конкретном аспекте С-конец антигенсвязывающего белка непосредственно слит с N-концом, находящимся в белковом комплексе на основе TTR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки слиты с белковым комплексом с помощью линкера. В других вариантах осуществления С-конец антигенсвязывающего белка связан с N-концом, находящимся в белковом комплексе на основе TTR. Линкер может представлять собой аминокислотный линкер, такой как аминокислотный линкер, длина которого составляет 120 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления аминокислотный линкер представляет собой GGGGS, (GGGGS)₂, (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, (GGGGS)₅ или (GGGGS)₆.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к гомотетрамерному слитому белку, содержащему четыре антигенсвязывающих белка, где антигенсвязывающие белки связаны с белковым комплексом. В одном аспекте белковый комплекс представляет собой белковый комплекс на основе TTR. В другом аспекте антигенсвязывающий белок представляет собой антитело. Антигенсвязывающий белок может представлять собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки непосредственно слиты без линкера с указанным белковым комплексом. В конкретных вариантах осуществления С-конец антигенсвязывающего белка непосредственно слит с N-концом, находящимся в белковом

комплексе на основе TTR. В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки слиты с указанным белковым комплексом с помощью линкера. С-конец антигенсвязывающего белка может быть связан с N-концом, находящимся в белковом комплексе на основе TTR. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой аминокислотный линкер, такой как аминокислотный линкер, длина которого составляет 1-20 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления аминокислотный линкер представляет собой GGGGS, (GGGS)₂, (GGGS)₃, (GGGS)₄, (GGGS)₅ или (GGGS)₆.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей любой из гомодимерных или гомотетрамерных слитых белков, обсуждаемых выше.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения рака с применением любого из гомодимерных или гомотетрамерных слитых белков, обсуждаемых выше. Кроме того, настоящее изобретение относится к применению любого из гомодимерных или гомотетрамерных слитых белков, обсуждаемых выше, в лечении рака. В другом аспекте настоящее изобретение относится к любому из гомодимерных или гомотетрамерных слитых белков, обсуждаемых выше, для применения в лечении рака.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к одной или нескольким выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим любой из гомодимерных или гомотетрамерных слитых белков, обсуждаемых выше. Также предполагаются векторы экспрессии, содержащие такие нуклеиновые кислоты, а также рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие обсуждаемые в данном документе нуклеиновые кислоты и/или векторы. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку E5, клетку почки новорожденного хомячка (ВНК), клетку почки обезьяны (COS), клетку гепатоцеллюлярной карциномы человека или клетку эмбриональной почки человека 293 (НЕК 293).

Способы получения любого из гомодимерных или гомотетрамерных слитых белков, обсуждаемых выше, также являются частью настоящего изобретения. Такие способы могут включать а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по пункту 32 или 33 и б) выделение гомодимерного или гомотетрамерного слитого белка из указанной культуры.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. представляет собой схематическое изображение гомомультимерных конструкций по настоящему изобретению. Фиг. 1а представляет собой иллюстративный гомодимерный слитый белок TTR-антитело, где С-конец обеих тяжелых цепей антитела связан с N-концом каждой субъединицы TTR. Фиг. 1b представляет собой иллюстративный гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело, где С-конец одной из двух тяжелых цепей каждого антитела связан с N-концом каждой субъединицы TTR. Знаки "+" и "-" обозначают пары заряженных аминокислот Fc, которые обеспечивают последовательное присоединение одной субъединицы TTR на полное антитело. Фиг. 1с представляет собой иллюстративный гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab, где С-конец каждого фрагмента Fab связан с N-концом каждой субъединицы TTR. На каждой из фиг. 1а-1с показан необязательный линкер между тяжелой цепью и TTR.

Фиг. 2 представляет собой серию гелей SDS-PAGE, которые демонстрируют, что гомодимерные белки TTR-антитело к СВ1 без линкера и с различной длиной линкера (фиг. 2а), гомотетрамерные белки TTR-антитело к СВ1 без линкера (фиг. 2b) и гомотетрамерные белки TTR-Fab к СВ1 без линкера (фиг. 2с), соответственно, устойчиво экспрессируются в клетках НЕК 293. Фиг. 2 дополнительно обсуждается в примере 2.

Фиг. 3 представляет собой серию анализов с использованием эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC) HPLC гомодимерного слитого белка TTR-антитело к СВ1 без линкера, с линкером (G₄S), линкером (G₄S)₂, линкером (G₄S)₃ или линкером (G₄S)₄. Фиг. 3 дополнительно обсуждается в примере 2.

На фиг. 4 показано, что гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело к СВ1 и гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к СВ1 улучшают EC₅₀ по сравнению с исходным Ab к СВ1. Фиг. 4 дополнительно обсуждается в примере 3.

Фиг. 5 представляет собой гель SDS-PAGE, который демонстрирует, что гомодимерные белки TTR-антитело к GITR (дорожка 1), гомотетрамерные белки TTR-антитело к GITR (дорожка 2) и гомотетрамерные белки TTR-Fab к GITR (дорожка 3), соответственно, экспрессируются в клетках НЕК 293. Дорожки 4-7 представляют собой антитело к динитрофенильной группе (антитело к DNP). Фиг. 5 дополнительно обсуждается в примере 4.

Фиг. 6 представляет собой гель SDS-PAGE, который демонстрирует, что гомодимерные белки TTR-антитело к GITR (дорожки 1 и 4), гомотетрамерные белки TTR-антитело к GITR (дорожки 2 и 5) и гомотетрамерные белки TTR-Fab к GITR (дорожки 3 и 6) правильно собираются, исходя из дорожек в ненагреваемых, невозстанавливаемых условиях. При нагревании и восстановлении три конструкции слитых белков распадаются на их ожидаемые составляющие цепи (верхняя(-ие) полоса(-ы) представляют собой тяжелые цепи, а самая нижняя полоса представляет собой легкую цепь) Фиг. 6 дополнительно обсуждается в примере 4.

Фиг. 7 представляет собой анализ посредством HPLC SEC каждого из гомодимерного слитого белка TTR-антитело к GITR (средний пик), гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к GITR (левый пик) и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR (правый пик). Фиг. 7 дополнительно обсуждается в примере 4.

Фиг. 8 представляет собой анализ посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) исходного слитого белка TTR-mAb к GITR ("1"), гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к GITR ("2"), гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR ("3") и гомодимерного слитого белка TTR-антитело к GITR ("4"). На фиг. 8 продемонстрировано, что значения температуры плавления слитых белков на основе TTR сопоставимы или лучше, чем у исходного Ab, указывая на то, что образованные слитые белки на основе TTR являются устойчивыми.

Фиг. 9a) представляет собой результат фармакокинетического (ПК) анализа *in vivo* (у мышей) всех видов антител к GITR. Фиг. 9b) представляет собой результат ПК анализа *in vivo* (у мышей) интактных слитых белков TTR-антитело к GITR.

На фиг. 10a) продемонстрировано, что аффинность связывания гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR ("2"), гомодимерного слитого белка TTR-антитело к GITR ("3") и гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к GITR ("4") лучше, чем у исходного mAb к GITR ("1"). На фиг. 10b) продемонстрировано, что более высокая аффинность не приводила к более высокой активности в клеточных анализах.

Фиг. 11 представляет собой серию гелей SDS-PAGE, которые демонстрируют, что гомодимерные белки TTR-антитело к TRAILR2 (1) и гомотетрамерные белки TTR-Fab к TRAILR2 (2), соответственно, хорошо экспрессируются и правильно собираются в клетках млекопитающих.

Фиг. 12 представляет собой серию гелей SDS-PAGE, которые демонстрируют, что гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 хорошо экспрессируется и правильно собирается в клетках CHO-K1.

Фиг. 13 представляет собой серию гелей SDS-PAGE, которые демонстрируют, что гомотетрамер TTR-Fab к TRAILR2, гомодимер TTR-антитело к TRAILR2 и гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 правильно собираются, исходя из дорожек в ненагреваемых, невозстанавливающих условиях. При нагревании и восстановлении молекулы распадаются на их ожидаемые составляющие цепи (верхняя(-ие) полоса(-ы) представляют собой тяжелые цепи, а самая нижняя полоса представляет собой легкую цепь)

Фиг. 14 представляет собой анализ посредством HPLC SEC каждого из гомодимерного слитого белка TTR-антитело (средняя хроматограмма), гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело (правая хроматограмма) и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab (левая хроматограмма) к TRAILR2.

Фиг. 15a) представляет собой результат ПК анализа *in vivo* (у мышей) всех видов антител к TRAILR2. Фиг. 15b) представляет собой результат ПК анализа *in vivo* (у мышей) интактных слитых белков TTR-антитело к TRAILR2.

На фиг. 16 показана активность слитых белков TTR-антитело к TRAILR2 по сравнению с исходным mAb (конатумумаб) в анализе уничтожения клеток WM35.

На фиг. 17 показана активность гомотетрамера TTR-Fab ("2") и гомотетрамера TTR-антитело ("3") к TRAILR2 по сравнению с исходным mAb (конатумумаб; "1") в анализе уничтожения первичных кератиноцитов человека.

На фиг. 18 показана способность слитых белков TTR-антитело к TRAILR2 подавлять рост опухоли по сравнению с исходным mAb (конатумумаб) в мышинной модели colo205.

На фиг. 19 показана способность слитых белков TTR-антитело к TRAILR2 подавлять рост опухоли по сравнению с исходным mAb (конатумумаб) в мышинной модели SW403.

На фиг. 20 показано, что вес тела мышей мышинной модели colo205 и мышей мышинной модели SW403 является схожим для всех тестируемых соединений.

Подробное описание изобретения

Применяемые в данном документе заголовки разделов служат только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый объект изобретения.

Если в данном документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в рамках настоящей заявки, имеют значения, которые общеизвестны рядовым специалистам в данной области техники. Кроме того, если контекст не предусматривает иное, термины в единственном числе будут включать их формы во множественном числе, а термины во множественном числе будут включать их формы в единственном числе.

В целом, номенклатура, применяемая в рамках культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации и связанные с ними методики, описанные в данном документе, являются общеизвестными и общепринятыми в данной области техники. Способы и методики из настоящей заявки, в целом, осуществляются в соответствии с традиционными способами, общеизвестными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных источниках, которые приводятся и обсуждаются на протяжении всей настоящей заявки, если не указано иное. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены в данный документ посредством ссылки. Ферментативные реакции и методики очистки осуществляются в соответствии с инструкциями производителя, как обычно выполняется в данной области техники или как описано в данном документе. Терминология, применяемая в рамках аналитической хи-

мии, химии органического синтеза и медицинской и фармацевтической химии и связанные с ними лабораторные процедуры и методики, описанные в данном документе, являются общеизвестными и общепринятыми в данной области техники. Стандартные методики можно применять для химических синтезов, химических анализов, получения, составления и доставки фармацевтических средств, а также лечения пациентов.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами и т.д., описанными в данном документе, и, ввиду этого, может изменяться. Используемая в данном документе терминология служит только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

Кроме случая рабочих примеров или случае, где указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакций, применяемые в данном документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях с помощью термина "приблизительно." Термин "приблизительно" при использовании в сочетании с процентами может означать $\pm 1\%$.

Все варианты осуществления, более узкие по объему, чем вариации, определенные конкретными абзацами в данном документе, должны рассматриваться как включенные в настоящее изобретение. Например, некоторые аспекты описываются как род, и следует понимать, что каждый член рода может быть отдельно вариантом осуществления. Также следует понимать, что аспекты, описываемые как род, или выбирающие член рода, включают в себя комбинации двух или более членов рода. Следует также понимать, что хотя различные варианты осуществления в настоящем описании представлены с использованием формулировки "содержащие", при различных обстоятельствах связанный вариант осуществления также может быть описан с использованием формулировок "состоящий из" или "состоящий, по существу, из".

В настоящем изобретении использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включая", а также других форм, таких как "включает" и "включенный", не ограничено. Кроме того, такие термины как "элемент" или "компонент" охватывают как элементы, так и компоненты, содержащие одну единицу, так и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если конкретно не указано иное.

Определения.

Термин "аминокислота" включает его стандартное значение в данной области техники. Двадцать встречающихся в природе аминокислот и их аббревиатуры соответствуют общепринятой практике. См., *Immunology-A Synthesis*, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Green, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991), включенный в данный документ посредством ссылки для любых целей. Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати стандартных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как [альфа]-, [альфа]-дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты и другие нестандартные аминокислоты также могут представлять собой подходящие компоненты для полипептидов и включены в термин "аминокислота". Примеры нестандартных аминокислот включают 4-гидроксипролин, [гамма]-карбоксиглутамат, [эпсилон]-N,N,N-триметиллизин, [эпсилон]-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, [сигма]-N-метиларгинин и другие аналогичные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В системе обозначений полипептидов, используемой в данном документе, левое направление представляет собой направление в сторону аминоконца, а правое направление представляет собой направление в сторону карбоксильного конца в соответствии со стандартной практикой и правилами.

Термин "антагонист", используемый в данном документе, как правило, относится к молекуле, например антигенсвязывающему белку, такому как белок, представленный в данном документе, который может связывать антиген и ингибировать, уменьшать или устранять биологическую передачу сигналов, связанную с антигеном.

Термин "антитело" относится к иммуноглобулину любого изотипа или его фрагменту, которые могут конкурировать с интактным антителом за связывание с целевым антигеном. "Антитело" представляет собой тип антигенсвязывающего белка. Термин "антитело" включает без ограничения моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, химерные антитела и антиидиотипические (анти-Id) антитела. Антитела могут принадлежать к любому изотипу/классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи. В других вариантах осуществления антитело включает меньше цепей, например, антитела, встречающиеся в природе у верблюдовых, которые могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут быть получены исключительно из одного источника или могут быть "химерными", где различные части антитела получены из двух различных антител, как дополнительно описано ниже. Антигенсвязывающие белки, антитела или связывающие фрагменты могут быть получены, например, с помощью гибридом посредством методик рекомбинантной ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител.

Термин "антиген" относится к молекуле или части молекулы, которые может связывать связываю-

шее средство, такое как антигенсвязывающий белок (включая, например, антитело), и которые дополнительно можно применять для выработки в организме животного антител, способных связываться с данным антигеном. Антиген может содержать один или несколько эпитопов, которые способны взаимодействовать с различными антигенсвязывающими белками, например, антителами.

Термин "антигенсвязывающий белок", используемый в данном документе, означает любой белок, который специфически связывает определенный целевой антиген. Термин включает полипептиды, которые включают по меньшей мере одну антигенсвязывающую область. Термин также охватывает антитела, которые содержат по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, а также их производные, варианты, фрагменты и мутации. Антигенсвязывающий белок также включает фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, доменные антитела, такие как Nanobodies®, и одноцепочечные антитела, как более подробно описано ниже.

"Антигенсвязывающая область" или "антигенсвязывающий домен" означает часть белка, такого как антитело или его фрагмент, производное или вариант, которая специфически связывается, взаимодействует или распознает данный эпитоп или сайт на молекуле (например, антиген). Например, часть антигенсвязывающего белка, которая содержит аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном и придают антигенсвязывающему белку его специфичность и аффинность в отношении антигена, называется "антигенсвязывающей областью". Антигенсвязывающая область может включать одну или несколько "областей, определяющих комплементарность" ("CDR"). Определенные антигенсвязывающие области также включают одну или несколько "каркасных" областей. "Каркасные" области могут вносить непосредственный вклад в специфическое связывание антигенсвязывающего белка, но обычно содействуют в поддержании правильной конформации CDR для стимуляции связывания между антигенсвязывающей областью и антигеном.

Термины "рак", "опухоль", "раковый" и "злокачественный" относятся к физиологическому состоянию млекопитающих, которое, как правило, характеризуется неконтролируемым клеточным ростом, или описывают его. Примеры рака включают без ограничения карциному, в том числе аденокарциному, лимфому, бластому, меланому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких видов рака включают меланому, рак легкого, рак головы и шеи, почечно-клеточный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, желудочно-кишечный рак, ходжкинские и неходжкинские лимфомы, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, такой как печеночная карцинома и гепатома, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак эндометрия, миелому (такую как множественная миелома), рак слюнной железы, рак почки, такой как почечно-клеточный рак и опухоли Вильмса, базальноклеточную карциному, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак яичка и рак пищевода.

Термин "CDR" и его множественное число (также называемый "гипервариабельными областями") относится к определяющей комплементарности области белка, такого как антитело или его фрагмент, производное или вариант. Вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи содержат по три CDR. Например, вариабельная область легкой цепи содержит следующие CDR: CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; а вариабельная область тяжелой цепи содержит следующие CDR: CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. CDR содержат большую часть остатков, ответственных за специфические взаимодействия антитела с антигеном, и, следовательно, вносят вклад в функциональную активность молекулы антитела. CDR являются основными детерминантами антигенной специфичности.

Точные границы и длины определения CDR зависят от различных систем классификации и нумерации. Следовательно, CDR могут упоминаться по Kabat, Chothia, месту контакта или любым другим определениям границ, включая систему нумерации, описанную в данном документе. Схема (система) нумерации согласно Kabat является широко распространенным стандартом для последовательной нумерации аминокислотных остатков вариабельного домена антитела и является предпочтительной схемой, применяемой в настоящем изобретении, как также упоминалось в другом месте данного документа. Дополнительные структурные соображения также могут быть использованы для определения канонической структуры антитела. Например, те различия, которые не полностью отражены в нумерации согласно Kabat, могут быть описаны системой нумерации согласно Chothia et al. и/или выявлены другими методиками, например, кристаллографией и двумерным или трехмерным компьютерным моделированием. Несмотря на различные границы, каждая из этих систем имеет некоторую степень совпадения в том, что составляет CDR в вариабельных последовательностях. Поэтому определения CDR в соответствии с этими системами могут отличаться по длине и граничным областям относительно прилегающей каркасной области. См., например, Kabat (подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательности), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело) и/или MacCallum (Kabat et al., loc. cit; Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987, 196: 901-917 и MacCallum et al., J. Mol. Biol., 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для характеристики антигенсвязывающего сайта является определение AbM, используемое в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. В Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Для обзора структуры антител см. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labora-

tory, eds. Harlow et al., 1988.

Как правило, CDR образуют структуру петли, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, которая принимается антигенсвязывающими (CDR) петлями. Из сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют только ограниченный набор доступных конформаций. Каждая каноническая структура может характеризоваться торсионными углами полипептидного остова. Следовательно, соответствующие петли между антителами могут иметь очень похожие трехмерные структуры, несмотря на высокую вариабельность аминокислотной последовательности в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia et al., *Nature*, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Кроме того, существует связь между принятой структурой петли и аминокислотными последовательностями, окружающими ее. Конформация определенного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях внутри петли, а также в консервативном каркасе (т.е. вне петли). Следовательно, присвоение определенному каноническому классу может быть осуществлено на основании присутствия этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "конкурировать", когда он применяется в контексте антигенсвязывающих белков (например, антител или их фрагментов), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками и определяется с помощью анализа, в котором подвергается тестированию антигенсвязывающий белок (например, антитело или его фрагмент) предотвращает или ингибирует специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном. Можно применять многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуоферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см., например, Stahl et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой EIA с биотин-авидином (см., например, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный анализ с применением прямого мечения, твердофазный сэндвич-анализ с применением прямого мечения (см., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный RIA с применением прямого мечения с использованием в качестве метки I-125 (см., например, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой EIA с биотин-авидином (см., например, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552) и RIA с применением прямого мечения (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Как правило, такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, экспрессирующих антиген, немеченого исследуемого антигенсвязывающего белка и меченого эталонного антигенсвязывающего белка. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связывающейся с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого антигенсвязывающего белка. Обычно тестируемый антигенсвязывающий белок присутствует в избытке. Антигенсвязывающие белки, идентифицированные с помощью конкурентного анализа, включают антигенсвязывающие белки, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонные антигенсвязывающие белки, и антигенсвязывающие белки, связывающиеся с прилегающим эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому эталонным антигенсвязывающим белком, чтобы возникло стерическое несоответствие. Дополнительные подробности, касающиеся способов определения конкурентного связывания, предусмотрены в данном документе. Например, в одном варианте осуществления конкуренция определяется в соответствии с анализом ViaCote. Обычно, когда конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать специфичное связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном на по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75%. В некоторых случаях, связывание ингибируется на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, или 97% или больше.

Термин "регуляторная последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, которая может воздействовать на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми она лигирована. Природа таких регуляторных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах осуществления регуляторные последовательности для прокариот могут включать промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. Например, регуляторные последовательности для эукариот могут включать промоторы, содержащие один или множество сайтов распознавания транскрипционных факторов, последовательности транскрипционных энхансеров и последовательности терминации транскрипции. "Регуляторные последовательности" могут включать лидерные последовательности и/или последовательности партнеров по слиянию.

"Производное" полипептида представляет собой полипептид, который был подвергнут химической модификации посредством способа, отличного от образования вариантов со вставками, делециями или заменами, например, путем конъюгации с другим химическим фрагментом.

"Доменное антитело" представляют собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи. Примеры доменных антител включают Nanobodies®. В некоторых случаях две или более областей VH соединены ковалентной связью с помощью пептидного линкера для создания бивалентного доменно-

го антитела. Данные две области V_H бивалентного доменного антитела могут нацеливаться на одинаковые или различные антигены.

Как правило, "эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для уменьшения выраженности и/или частоты возникновения симптомов, устранения симптомов и/или основной причины, предупреждения возникновения симптомов и/или их основной причины и/или улучшения или устранения повреждения, которое является результатом или связано с раком. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. "Терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для излечения болезненного состояния (например, рака) или симптомов, в частности, состояния или симптомов, ассоциированных с болезненным состоянием, или иного предупреждения, препятствования, замедления или обращения прогрессирования болезненного состояния или любого другого нежелательного симптома, ассоциированного с заболеванием в какой бы то ни было форме. "Профилактически эффективное количество" представляет собой количество фармацевтической композиции, которое при введении субъекту будет оказывать желаемый профилактический эффект, например, предупредить или задерживать возникновение (или повторное появление) рака, или снижать вероятность возникновения (или повторного появления) рака или симптомов рака. Полный терапевтический или профилактический эффект не обязательно возникают при введении одной дозы, и они могут возникать только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений.

Термин "эпитоп" относится к части антигена, способной распознаваться и специфически связываться с антигенсвязывающим белком (например антителом). В контексте полипептидов эпитопы могут быть образованы смежными аминокислотами или несмежными аминокислотами, сближенными за счет укладки белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, как правило, сохраняются при денатурации белка, в то время как эпитопы, образованные посредством укладки в третичную структуру, как правило, утрачиваются при денатурации белка. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3, а чаще всего по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. "Линейный эпитоп" или "непрерывный эпитоп" представляет собой эпитоп, который распознается антигенсвязывающим белком (например, антителом) по его линейной последовательности аминокислот или первичной структуре. "Конформационный эпитоп" или "непоследовательный эпитоп" представляет собой эпитоп, который распознается антигенсвязывающим белком (например, антителом) по его третичной структуре. Остатки, которые составляют эти эпитопы, могут быть несмежными в первичной аминокислотной последовательности, но сближены в третичной структуре молекулы. Линейные и конформационные эпитопы обычно ведут себя по-разному, когда белок денатурируется, фрагментируется или восстанавливается.

Термин "вектор экспрессии" или "конструкция экспрессии" относится к вектору, который подходит для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновой кислоты, которые управляют (вместе с клеткой-хозяином) экспрессией одной или нескольких гетерологических кодирующих областей, функционально связанных с ними, и/или контролируют ее. Конструкция экспрессии может включать без ограничения последовательности, которые воздействуют на транскрипцию, трансляцию или контролируют их, и, в случае наличия интронов, воздействуют на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ними.

"Fab-фрагмент" или "Fab" состоит из одной легкой цепи, а также C_H1 и вариabельной областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

"Фрагмент Fab'" или "Fab'" содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен V_H и домен C_H1, а также область между доменами C_H1 и C_H2, так что между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')₂.

"Фрагмент F(ab')₂" или "F(ab')₂" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C_H1 и C_H2, так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом фрагмент F(ab')₂ состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

"Область Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены C_H2 и C_H3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и посредством гидрофобных взаимодействий доменов C_H3.

"Область Fv" содержит вариabельные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но не содержит константных областей.

Термин "тяжелая цепь", используемый в отношении антигенсвязывающего белка, антитела или их фрагмента, включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, содержащие последовательность вариabельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен вариabельной области (V_H) и три домена константной области (C_H1, C_H2 и C_H3). Домен V_H находится на аминоконце полипептида, а домены C_H находятся на карбоксильном конце, при-

чем C_{H3} находится ближе всего к карбоксиконцу полипептида. Тяжелые цепи могут относиться к любому изотипу, такому как IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

"Гемобластомы" представляют собой рак, который происходит из кроветворной ткани, такой как костный мозг, или из клеток иммунной системы. Примерами гемобластомов являются лейкоз, лимфома и множественная миелома.

Термин "гомодимерный слитый белок" относится к слитому белку, содержащему два одинаковых антигенсвязывающих белка. Например, гомодимерный слитый белок антитела относится к слитому белку, содержащему два одинаковых антитела. В конкретном примере гомодимер может представлять собой гомодимерный слитый белок на основе TTR, который содержит два одинаковых антитела, связанных посредством белка TTR, как описано в данном документе.

Термин "гомотетрамерный слитый белок" относится к слитому белку, содержащему четыре одинаковых антигенсвязывающих белка. Например, гомотетрамерный слитый белок на основе антитела относится к слитому белку, содержащему четыре одинаковых антитела. В другом примере гомотетрамерный слитый белок на основе Fab относится к слитому белку, содержащему четыре одинаковых фрагмента Fab. В конкретном примере гомотетрамер может представлять собой гомотетрамерный слитый белок на основе TTR, который содержит два одинаковых антигенсвязывающих белка (например, два одинаковых антитела или два одинаковых фрагмента Fab), связанных посредством белка TTR, как описано в данном документе.

Термин "клетка-хозяин" означает клетку, которая была трансформирована с помощью последовательности нуклеиновой кислоты и, таким образом, этого экспрессирует ген, представляющий интерес. Данный термин охватывает потомство родительской клетки вне зависимости от того, идентично ли данное потомство по морфологии или по генетической структуре исходной родительской клетке или нет, при условии, что присутствует ген, представляющий интерес.

Термин "идентичность" относится к сходству между последовательностями двух или более полипептидных молекул или двух или больше молекул нуклеиновых кислот, как определено при выравнивании и сравнении последовательностей. "Процент идентичности" означает процент идентичных остатков аминокислот или нуклеотидов у сравниваемых молекул, и его рассчитывают на основании размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для этих расчетов гэпы в выравниваниях (если таковые имеются) должны быть учтены с помощью определенной математической модели или компьютерной программы (т.е. "алгоритма"). Способы, которые могут применяться для расчета идентичности выравниваемых нуклеиновых кислот или полипептидов, включают описанные в Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press и Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073.

При расчете процента идентичности сравниваемые последовательности выравнивают способом, который дает наибольшее совпадение между последовательностями. Компьютерная программа, применяемая для определения процента идентичности, представляет собой пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). Компьютерный алгоритм GAP применяют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых должен быть определен процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для получения оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов ("охват совпадения", определяемый алгоритмом). Штраф за открытие гэпа (который рассчитывается как 3х средняя диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднее значение диагонали применяемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой балл или число, присваиваемое каждому идеальному совпадению аминокислоты в соответствии с конкретной матрицей сравнения) и штраф за продление гэпа (который обычно составляет 1/10 часть от штрафа за открытие гэпа), а так же матрицу сравнения, такую как PAM 250 или BLOSUM 62, применяют вместе с данным алгоритмом. В определенных вариантах осуществления в этом алгоритме также используется стандартная матрица сравнения (см., Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 касательно матрицы сравнения BLOSUM 62).

Рекомендуемые параметры для определения процента идентичности полипептидов или нуклеотидных последовательностей с применением программы GAP являются следующими:

Алгоритм: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453;

Матрица сравнения: BLOSUM 62 из Henikoff et al., 1992, выше;

Штраф за открытие гэпа: 12 (но без штрафа за концевые гэпы);

Штраф за продление гэпа: 4

пороговое значение степени сходства: 0.

Использование определенных схем выравнивания для выравнивания двух аминокислотных после-

довательностей может приводить к совпадению только короткой области в этих двух последовательностях, и эта небольшая выровненная область может характеризоваться очень высокой идентичностью последовательности, даже если отсутствует значительное сходство между двумя полноразмерными последовательностями. Соответственно, выбранный способ выравнивания (программа GAP) может быть, если требуется, адаптирован для обеспечения выравнивания, которое охватывает по меньшей мере 50 смежных аминокислот целевого полипептида.

Фраза "иммуномодулятор" относится к молекуле, которая индуцирует, усиливает или подавляет иммунный ответ. Иммунный активатор представляет собой молекулу, которая индуцирует или усиливает иммунный ответ. Иммуносупрессор представляет собой молекулу, которая уменьшает или подавляет иммунный ответ. Таким образом, активационная иммунотерапия представляет собой терапию, которая включает введение молекулы (молекул) для индукции или усиления иммунной системы субъекта. Иммуносупрессивная терапия представляет собой терапию, при которой субъекта лечат с помощью молекулы (молекул) для снижения или подавления иммунной системы субъекта.

Используемый в данном документе термин "фрагмент" цепи антитела или иммуноглобулина (тяжелой или легкой цепи) представляет собой антигенсвязывающий белок, содержащий часть (независимо от того, как эту часть получают или синтезируют) антитела, в которой отсутствуют по меньшей мере некоторые аминокислоты, присутствующие в полноразмерной цепи, но которая способна специфически связываться с антигеном. Такие фрагменты являются биологически активными, так как они специфически связываются с целевым антигеном и могут конкурировать с другими антигенсвязывающими белками, включая интактные антитела, за связывание с заданным эпитопом. В одном аспекте такой фрагмент будет сохранять по меньшей мере одну CDR, присутствующую в полноразмерной легкой или тяжелой цепи, и в некоторых вариантах осуществления будет содержать одну тяжелую цепь и/или легкую цепь или ее часть. Эти биологически активные фрагменты могут быть получены с помощью методик рекомбинантной ДНК или могут быть получены, например, посредством ферментативного или химического расщепления антигенсвязывающих белков, включая интактные антитела. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулина включают без ограничения Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, доменные антитела и одноцепочечные антитела и могут быть получены из любого источника, представляющего собой млекопитающее, включая без ограничения человека, мышь, крысу, верблюда или кролика. Дополнительно предполагается, что функциональная часть антигенсвязывающих белков, раскрытых в данном документе, например, одна или несколько CDR, может быть ковалентно связана со вторым белком или с малой молекулой с целью создания терапевтического средства, направленного на конкретную мишень в организме или имеющего продленный период полужизни в сыворотке крови.

"Выделенная молекула нуклеиновой кислоты" означает геномную ДНК или РНК, mRNA, cDNA или молекулу синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, которые не связаны со всем или частью полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид обнаруживается в природе, или связаны с полинуклеотидом, с которым они не связаны в природе. Следует понимать, что для целей настоящего изобретения "молекула нуклеиновой кислоты, содержащая" конкретную нуклеотидную последовательность, не охватывает интактные хромосомы. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, "содержащие" определенные последовательности нуклеиновой кислоты, в дополнение к определенным последовательностям могут включать последовательности, кодирующие до десяти или даже до двадцати других белков или их частей, или могут включать функционально связанные регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию кодирующей области упомянутых последовательностей нуклеиновой кислоты, и/или могут включать векторные последовательности.

Используемый в данном документе термин "выделенный полипептид", "очищенный полипептид", "выделенный белок" или "очищенный белок" предназначен для обозначения композиции, выделяемой из других компонентов, где полипептид очищен до любой степени по сравнению с его состоянием, которое можно получить в природе. Следовательно, очищенный полипептид также относится к полипептиду, который свободен от среды, в которой он может встречаться в природе. Как правило, термин "очищенный" относится к полипептидной композиции, которая была подвергнута фракционированию для удаления различных других компонентов и которая по существу сохраняет свою выраженную биологическую активность. Когда используется термин "по существу очищенный", это обозначение будет относиться к пептиду или полипептидной композиции, в которой полипептид или пептид образует основной компонент композиции, такой как составляющий приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или более белков в композиции.

Термин "легкая цепь", используемый в отношении антигенсвязывающего белка, антитела или его фрагментов, включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, содержащие последовательность варибельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь включает домен варибельной области (V_L) и домен константной области (C_L). Домен варибельной области легкой цепи находится на аминоконце полипептида. Легкие цепи включают каппа-цепи и ламбда-цепи.

Используемый повсюду в настоящем описании в отношении биологических материалов, таких как полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева и т.п., термин "встречающийся в природе" относит-

ся к материалам, которые обнаруживаются в природе.

Термин "олигонуклеотид" означает полинуклеотид, содержащий 200 или менее нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина олигонуклеотидов составляет от 10 до 60 оснований. В других вариантах осуществления длина олигонуклеотидов составляет от 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 до 40 нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть однонитевыми или двухнитевыми, например, для применения в конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды могут представлять собой смысловые или бессмысловые олигонуклеотиды. Олигонуклеотид может содержать метку, включая радиоактивную метку, флуоресцентную метку, гаптен или антигенную метку для применения в анализах обнаружения. Олигонуклеотиды можно применять, например, в качестве праймеров для ПЦР, праймеров для клонирования или гибридационных зондов.

Применяемый в данном документе "функционально связанный" означает, что компоненты, в отношении которых применяют данный термин, находятся во взаимосвязи, которая позволяет им выполнять присущие им функции в подходящих условиях. Например, контрольная последовательность в векторе, которая "функционально связана" с кодирующей белок последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей белок последовательности достигается в условиях, совместимых с транскрипционной активностью регуляторных последовательностей.

Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" включает как однонитевые, так и двухнитевые полимеры из нуклеотидов. Нуклеотиды, входящие в состав полинуклеотида, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды или модифицированную форму любого из этих типов нуклеотидов. Модификации включают модификации оснований, такие как бромуридиновые и инозиновые производные, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфотиоатные, фосфородитиоатные, фосфороселеноатные, фосфородиселеноатные, фосфоранилотиоатные, фосфоранилататные и фосфоамиданые связи.

Если не указано иное, находящийся слева конец любой обсуждаемой в данном документе однонитевой полинуклеотидной последовательности представляет собой 5'-конец; при этом находящееся слева направление двухнитевых полинуклеотидных последовательностей обозначается как 5'-направление. Направление от 5' к 3', в котором происходит наращивание формирующихся РНК-транскриптов, обозначается как направление транскрипции; области последовательности нити ДНК, содержащие такую же последовательность, что и РНК-транскрипт, которые расположены в направлении 5' относительно 5'-конца РНК-транскрипта, называются "вышележащими последовательностями"; области последовательности нити ДНК, содержащие такую же последовательность, что и РНК-транскрипт, которые расположены в направлении 3' относительно 3'-конца РНК-транскрипта, называются "нижележащими последовательностями".

Термины "полипептид" или "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Данные термины также применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой аналог или миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе полимерам из аминокислот. Термины также могут охватывать полимеры из аминокислот, которые были модифицированы, например, посредством добавления углеводных остатков с образованием гликопротеинов, или посредством фосфорилирования. Полипептиды и белки можно получать с помощью встречающейся в природе и нерекombинантной клетки или с помощью генетически сконструированной или рекомбинантной клетки, и они могут предусматривать молекулы, содержащие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы с делециями, вставками и/или заменами одной или нескольких аминокислот в нативной последовательности. Термин "фрагмент полипептида" относится к полипептиду, который содержит аминоконцевую делецию, карбоксиконцевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с полноразмерным белком. В определенных вариантах осуществления длина фрагментов составляет от приблизительно пяти до 500 аминокислот. Например, длина фрагментов может составлять по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот.

"Рекомбинантный белок", включая рекомбинантный белок TTR, представляет собой белок, полученный с применением рекомбинантных методик, т.е. посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе. Способы и методики получения рекомбинантных белков хорошо известны из уровня техники.

"Одноцепочечные антитела" представляют собой молекулы Fv, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей соединены гибким линкером с образованием одной полипептидной цепи, которая образует антигенсвязывающую область.

Одноцепочечные антитела подробно обсуждаются в публикации международной патентной заявки № WO 88/01649 и в патентах США № 4946778 и № 5260203.

"Солидная опухоль" относится к аномальному росту или массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких областей. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (не раковыми) или злокачественными (раковыми). Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их

образуют. Примерами солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы (рак крови) обычно не образуют солидных опухолей.

Антигенсвязывающий белок "специфически связывается" с антигеном, когда антигенсвязывающий белок демонстрирует слабое связывание или его отсутствие с молекулами, отличными от антигена. Однако антигенсвязывающий белок, который специфически связывает антиген, может перекрестно реагировать с антигенами от различных видов. Как правило, антигенсвязывающий белок специфически связывает антиген человека, когда константа диссоциации (K_D) составляет $\leq 10^{-7}$ М, как измерено с помощью методики поверхностного плазмонного резонанса (например, BIAcore, GE-Healthcare, Упсала, Швеция). Антигенсвязывающий белок специфически связывает антиген с "высокой аффинностью", когда он связывается с $K_D \leq 5 \times 10^{-8}$ М, и с "очень высокой аффинностью", когда он связывается с $K_D \leq 5 \times 10^{-9}$ М (как измерено с использованием способа, такого как BIAcore).

Используемые в данном документе термины "субъект" или "пациент" могут представлять собой любое млекопитающее. В типичном варианте осуществления субъект или пациент являются человеком.

Используемый в данном документе термин "по существу чистый" означает, что описанная разновидность молекулы представляет собой преобладающую присутствующую разновидность, то есть по молярному содержанию она является более распространенной, чем любая другая отдельная разновидность в той же смеси. В определенных вариантах осуществления по существу чистая молекула представляет собой композицию, в которой целевая разновидность составляет по меньшей мере 50% (по молярному содержанию) от всех присутствующих макромолекулярных разновидностей. В других вариантах осуществления по существу чистая композиция будет содержать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% от всех макромолекулярных частиц, присутствующих в композиции. В других вариантах осуществления целевую разновидность очищают до фактической гомогенности, где контаминирующие разновидности не могут быть обнаружены в композиции с помощью традиционных способов обнаружения, и, таким образом, композиция состоит из одной обнаруживаемой макромолекулярной разновидности.

Термин "лечение" относится к любым признакам успеха в лечении или уменьшении интенсивности повреждения, патологии или состояния, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление выраженности; ремиссия; снижение интенсивности симптомов или содействие лучшей переносимости пациентом повреждения, патологии или состояния; замедление темпов дегенерации или ухудшения; способствование менее изнуряющему протеканию конечной стадии дегенерации; улучшение физического или психического здоровья пациента. Лечение или уменьшение интенсивности симптомов может быть основано на объективных или субъективных параметрах; включая результаты физического осмотра, психоневрологических тестов и/или психиатрической оценки. Например, посредством определенных способов, представленных в данном документе, успешно осуществляют лечение рака и опухолей, например, путем уменьшения прогрессирования или распространения рака, подавления роста опухоли, вызывания ремиссии опухоли и/или уменьшения интенсивности симптома, связанного со раком или опухолью. Аналогично, посредством других способов, представленных в данном документе, осуществляют лечение инфекционного заболевания путем уменьшения прогрессирования или распространения инфекции, уменьшения степени инфекции и/или уменьшения интенсивности симптома, связанного с инфекцией.

Используемый в данном документе термин "TTR" относится к "транстиретину". TTR человека описан в Mita et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124(2):558-564 (1984), который включен в данный документ посредством ссылки. Аминокислотная последовательность TTR человека также описана в информационной базе данных UniProt (www.uniprot.org/uniprot/P02766#septions) и приведена в данном документе под SEQ ID NO: 43. Последовательность нуклеиновой кислоты TTR человека также описана в NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7276). См. также депонирование в GenBank K02091.1. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот TTR мыши приведены под SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно.

Термин "вариант TTR" относится к белку, содержащему аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 % или 99% идентична TTR под SEQ ID NO: 1. Настоящее изобретение также включает нуклеиновые кислоты, кодирующие такие варианты TTR. Конкретные варианты включают, например, белки TTR с усечениями на С- или N-конце.

"Опухоль" относится к массе ткани, образованной в результате роста и размножения раковых клеток, которые могут проникать и разрушать нормальные прилегающие ткани.

Раковые клетки могут отделяться от злокачественной опухоли и попадать в кровоток или лимфатическую систему, так что раковые клетки распространяются из первичной опухоли с образованием новых опухолей в других органах.

"Вариант" полипептида включает аминокислотную последовательность, где один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности вставлены, удалены и/или заменены по сравнению с другой полипептидной последовательностью. Варианты включают слитые белки.

Используемый в данном документе термин "вектор" предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной к переносу другой нуклеиновой кислоты, с которой она была связана. Од-

ним типом вектора является "плазмида", которая относится к кольцевой двухнитевой петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где в вирусный геном могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации, и эпизомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и реплицируются, таким образом, вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе "рекомбинантными векторами экспрессии" (или просто "векторами экспрессии"). Как правило, векторы экспрессии, используемые в методиках рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании "плазмида" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако, подразумевается, что настоящее изобретение включает и другие такие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы, дефектные по репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), выполняющие эквивалентные функции.

Гомодимерный слитый белок.

Как описано в данном документе, настоящее изобретение частично относится к применению TTR при мультимеризации антигенсвязывающих белков, таких как антитела. Поскольку TTR представляет собой внеклеточный белок человека, содержащийся в сыворотке человека, он присутствует в относительно высоких количествах по всему организму человека. Таким образом, он с меньшей вероятностью вызовет иммунный ответ, когда будет присутствовать в мультимеризационных конструкциях по настоящему изобретению, по сравнению, например, с отличными от человеческих, внутриклеточными и редкими белками. Соответственно, его использование в методиках мультимеризации по настоящему изобретению является выгодным.

Например, TTR может быть использован при димеризации антител. В таких гомодимерных слитых белках TTR (SEQ ID NO: 1) или его вариант присутствует в виде тетрамера, где субъединица TTR связана с С-концом тяжелой цепи антитела с образованием гомодимеров TTR-антитела. Например, С-конец каждой тяжелой цепи антитела (причем каждое антитело содержит два таких С-конца) может быть связан с N-концом каждой субъединицы TTR (см. фиг. 1а). Таким образом, каждое антитело связано с двумя субъединицами TTR в тетрамере на основе TTR, в результате чего образуется гомодимер TTR-антитела.

Соответственно, настоящее изобретение относится к гомодимерным слитым белкам, содержащим два антигенсвязывающих белка. В некоторых вариантах осуществления гомодимерные слитые белки содержат антигенсвязывающие белки, связанные с белковым комплексом. В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс представляет собой белковый комплекс на основе TTR, где белковый комплекс на основе TTR представляет собой тетрамер на основе TTR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гомодимерным слитым белкам, содержащим два антитела, связанных с тетрамером на основе TTR. Антитела могут быть связаны с тетрамером на основе TTR без линкера (т.е. антитела непосредственно связаны с TTR).

В других вариантах осуществления антитела связаны с тетрамером на основе TTR с помощью линкера. Например, аминокислотные линкеры могут быть использованы для связывания С-конца тяжелой цепи антитела с N-концом субъединицы TTR. В некоторых вариантах осуществления длина линкера составляет 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35 или 1-40 аминокислот. В некоторых вариантах длина линкера составляет 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера составляет 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера составляет не более 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера составляет не более 5, 10, 15 или 20 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления длина линкера составляет 0, 5, 10, 15 или 20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой

GGGGS,

GGGGS₂ (т.е. (GGGGS)₂),

GGGGS₃ (т.е. (GGGGS)₃),

GGGGS₄ (т.е. (GGGGS)₄),

GGGGS₅ (т.е. (GGGGS)₅) или

GGGGS₆ (т.е. (GGGGS)₆).

В других вариантах осуществления линкер представляет собой

GGGGS,

GGGGS₂ (т.е. (GGGGS)₂),

GGGGS₃ (т.е. (GGGGS)₃) или

GGGGS₄ (т.е. (GGGGS)₄).

Другие подходящие аминокислотные линкеры включают, например, дисульфидные связи, (Gly)_n

($n=1-10$), (EAAAK) $_n$ ($n=1-5$), A(EAAAK) $_4$ ALEA(EAAAK) $_4$ A, PAPAP, AEAAAKEAAAKA, (Ala-Pro) $_n$ ($n=1-20$), VSQTSKLTAEVFPDV, PLGLWA, RVLAEA, EDVVCCMSY, GGIEGRGS, TRHRQPRGWE, AGNRVRRSVG, RRRRRRRR, GFLG и LE. Подходящие неаминокислотные линкеры включают полиэтиленгликоль (PEG).

В некоторых вариантах осуществления антитела связаны с усеченной субъединицей TTR с помощью линкера или без него. Например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот могут быть удалены с N-конца одной или нескольких субъединиц TTR, и антитело может быть присоединено к N-концу усеченной субъединицы TTR.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим гомодимерные слитые белки, описанные в данном документе. Детали, касающиеся иллюстративных способов получения гомодимерных слитых белков, можно найти в примерах.

Тетрамеризация антител и Fab.

Как описано в данном документе, настоящее изобретение частично относится к применению TTR при мультимеризации антигенсвязывающих белков, таких как антитела. Как обсуждалось выше, применение TTR в способах мультимеризации по настоящему изобретению является преимущественным, поскольку TTR с меньшей вероятностью вызовет иммунный ответ, когда будет присутствовать в мультимеризационных конструкциях по настоящему изобретению, по сравнению, например, с отличными от человеческих, внутриклеточным и редкими белками.

Настоящее изобретение также частично относится к применению TTR при тетрамеризации антигенсвязывающих белков, таких как антитела. В таких гомотетрамерных слитых белках на основе TTR (SEQ ID NO: 1) или его вариант снова присутствует в виде тетрамера. Однако в контексте гомотетрамеров TTR-антитела, одна тяжелая цепь антитела (т.е. только одна из двух тяжелых цепей, присутствующих в одном антителе) связана с каждой субъединицей TTR, что позволяет связывать четыре антитела с тетрамером на основе TTR (см. фиг. 1b). Одна из двух тяжелых цепей C-конца антитела может быть связана с N-концом каждой субъединицы TTR (см. фиг. 1b). Таким образом, каждое антитело связано с одной субъединицей TTR в тетрамере на основе TTR, в результате чего образуется гомотетрамер TTR-антитело.

В таких гомотетрамерных слитых белках образование гомодимеров Fc (обсуждалось выше) препятствуется посредством мутаций в Fc. Такие модификации включают мутации Fc, такие как "выступы во впадины", DuoBody, Azymetric, замены пар заряженных аминокислот, HA-TF, SEEDbody и модификации с дифференциальной аффинностью к белку A. См., например, Spiess et al., *Molecular Immunology*, 67(2, Part A), 2015, pp. 95-106. Мутации по типу "выступы во впадины" включают T366W в первой тяжелой цепи и T366S, L368A и/или Y407V во второй тяжелой цепи. См., например, Ridgway et al., *Protein Eng.*, 9 (1996), pp. 617-621 и Atwell et al., *J. Mol. Biol.*, 270 (1997), pp. 26-35. Мутации DuoBody включают F405L в первой тяжелой цепи и K409R во второй тяжелой цепи. См., например, Labrijn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110 (2013), pp. 5145-5150. Мутации Azymetric включают T350V, L351Y, F405A и/или Y407V в первой тяжелой цепи и T350V, T366L, K392L и/или T394W во второй тяжелой цепи. См., например, Von Kreudenstein et al., *mAbs*, 5 (2013), pp. 646-654. Мутации HA-TF включают S364H и/или F405A в первой тяжелой цепи и Y349T и/или T394F во второй тяжелой цепи. См., например, Moore et al., *mAbs*, 3 (2011), pp. 546-557. Мутации SEEDbody включают мутации химеризации IgG/A в первой тяжелой цепи и мутации химеризации IgG/A во второй тяжелой цепи. См., например, Davis et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 23 (2010), pp. 195-202. Мутации с дифференциальной аффинностью к белку A включают H435R в одной тяжелой цепи и отсутствие мутаций в другой тяжелой цепи. См., например, патент США № 8586713. Каждый из данных документов включен посредством ссылки в данный документ во всей своей полноте.

В конкретных вариантах осуществления можно управлять гомотетрамеризацией антител посредством использования замены пар заряженных аминокислот Fc, что препятствует гомодимеризации тяжелых цепей антитела, тем самым способствуя гетеродимеризации между собой одной тяжелой цепи антитела, которая связана с субъединицей TTR, и одной тяжелой цепи антитела, которая не связана с TTR (см. фиг. 1b). Например, ряд мутаций заряженных аминокислот может быть включен в домен C_H3 тяжелой цепи с отрицательно заряженными аминокислотами на одной тяжелой цепи и положительно заряженными аминокислотами на соответствующей тяжелой цепи, или смесью отрицательно и положительно заряженных аминокислот на одной тяжелой цепи с соответствующими им положительно и отрицательно заряженными аминокислотами на соответствующей тяжелой цепи. Иллюстративные отрицательные заряды включают K392D и K409D, а иллюстративные положительные заряды включают E356K и D399K. Поскольку одинаковые заряды на границе раздела C_H3 отталкиваются, а разнородные заряды притягиваются, гомодимеризация препятствуется, а гетеродимеризация способствуется. TTR сливается с тяжелой цепью только одного типа заряда (положительного или отрицательного, но не обоих); таким образом, в результате на полное антитело, состоящее из 4 цепей (две легкие цепи, одна неслитая тяжелая цепь и одна слитая с TTR тяжелая цепь), приходится одна субъединица TTR. Дополнительные мутации замены пар заряженных аминокислот обсуждаются, например, в патенте США № 9546203. Мутации замены пар заряженных аминокислот, включая D221E, P228E и/или L368E в первой тяжелой цепи и D221R, P228R и/или K409R во второй тяжелой цепи, также описаны, например, в Strop et al., *J. Mol.*

Biol., 420 (2012), pp. 204-219. Каждый из данных документов включен посредством ссылки в данный документ во всей своей полноте.

Настоящее изобретение также частично относится к применению TTR при тетрамеризации фрагментов Fab. В таких гомотетрамерных слитых белках на основе TTR (SEQ ID NO: 1) или его вариант снова присутствует в виде тетрамера, где каждая субъединица TTR связана с С-концом каждого фрагмента Fab с образованием гомотетрамеров TTR-Fab (см. фиг. 1с). Таким образом, каждый фрагмент Fab связан с одной субъединицей TTR в тетрамере на основе TTR, в результате чего образуется гомотетрамер TTR-Fab.

Соответственно, настоящее изобретение относится к гомотетрамерным слитым белкам, содержащим четыре антигенсвязывающих белка (например, тетрамер на основе Fab) или восемь антигенсвязывающих белков (например, тетрамер на основе Ab). В некоторых вариантах осуществления гомотетрамерные слитые белки содержат антигенсвязывающие белки, связанные с белковым комплексом. В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс представляет собой белковый комплекс на основе TTR, где белковый комплекс на основе TTR представляет собой тетрамер на основе TTR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой фрагмент Fab.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гомотетрамерным слитым белкам, содержащим четыре антитела, связанных с тетрамером на основе TTR. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гомотетрамерным слитым белкам, содержащим четыре фрагмента Fab, связанных с тетрамером на основе TTR. В некоторых вариантах осуществления антитела или Fab связаны с тетрамером на основе TTR без линкера (т.е. антитела или Fab непосредственно связаны с TTR).

В других вариантах осуществления антитела или Fab связаны с тетрамером на основе TTR с помощью линкера. Например, аминокислотные линкеры могут быть использованы для связывания С-конца тяжелой цепи антитела с N-концом субъединицы TTR. В некоторых вариантах осуществления длина линкера составляет 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35 или 1-40 аминокислот. В некоторых вариантах длина линкера составляет 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера составляет 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера составляет не более 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера составляет не более 5, 10, 15 или 20 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления длина линкера составляет 0, 5, 10, 15 или 20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой

GGGGS,

GGGGSGGGGS (т.е. (GGGGS)₂),

GGGGS GGGGS GGGGS (т.е. (GGGGS)₃),

GGGGSGGGGSGGGGS (т.е. (GGGGS)₄),

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (т.е. (GGGGS)₅) или

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (т.е. (GGGGS)₆).

В других вариантах осуществления линкер представляет собой

GGGGS,

GGGGSGGGGS (т.е. (GGGGS)₂),

GGGGSGGGGSGGGGS (т.е. (GGGGS)₃) или

GGGGSGGGGSGGGGS (т.е. (GGGGS)₄).

Другие подходящие аминокислотные линкеры включают, например, дисульфидные связи, (Gly)_n (n=1-10), (EAAAK)_n (n=1-5), A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄A, PAPAP, AEAAAKEAAAKA, (Ala-Pro)_n (n=1-20), VSQTSKLTAEVFPDV, PLGLWA, RVLAEA, EDVCCSMSY, GGLEGRGS, TRHRQPRGWE, AGNRVRRSVG, RRRRRRRR, GFLG, и LE. Подходящие неаминокислотные линкеры включают полиэтиленгликоль (PEG) и триазинсодержащие фрагменты (содержащиеся в конструкциях, содержащих концевую группу, способную вступать в реакцию с белком; см., например, публикацию РСТ № WO/2017/083604, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления антитела или Fab связаны с усеченной субъединицей TTR с помощью линкера или без него. Например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот могут быть удалены с N-конца одной или нескольких субъединиц TTR, и антитела или Fab могут быть присоединены к N-концу усеченной субъединицы TTR.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим гомодимерные слитые белки, описанные в данном документе. Детали, касающиеся иллюстративных способов получения гомотетрамерных (TTR и Ab) слитых белков, можно найти в примерах.

Антигенсвязывающие белки.

Любой антигенсвязывающий белок (например, Fab или антитело) можно использовать в слитых белках на основе TTR по настоящему изобретению. Поскольку слитые белки по настоящему изобретению обеспечивают мультимеризацию антигенсвязывающих белков, антигенсвязывающим белкам, кото-

рые нацелены на/связываются с антигенами, где для активности необходима кластеризация антигенсвязывающих белков или avidность, могут быть особенно полезны слитые белки по настоящему изобретению. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки (например, антитела или Fab) нацеливаются на/связываются с 4-1BB (CD137), CD20, GITR, DR5, OX40 (CD134), ICOS (CD278) или CD27. Было показано, что такие белки/мишени играют роль в сигнальных путях рака. В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки (например, антитела или Fab) нацеливаются на/связываются с ErbB-1 (рецептор эпидермального фактора роста (EGFR)), ErbB-2 (HER2 у человека и neu у грызунов), ErbB-3 (HER3), ErbB-4 (HER4), FGFR (рецептор фактора роста фибробластов), VEGFR (фактор роста сосудистого эндотелия), белковые продукты RET, EGFR, белковые продукты KIT, киназы Abl (гомолог вирусного онкогена мышинового лейкоза Абельсона 1), киназы Raf (быстро распространяющаяся фибросаркома) или PDGFR (рецепторы фактора роста тромбоцитов).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок (например, антитело или Fab) специфически связывается с CB1R (антитело к каннабиноидному рецептору-1; название гена Cnr1). Рецептор CB1 является Gi рецептором, сопряженным с G-белком, который широко экспрессируется в ЦНС и периферической нервной системе. Агонистическая стимуляция рецепторов CB1 приводит к ингибированию активности аденилатциклазы и активации митоген-активируемой протеинкиназы (MAP). Эндогенные агонисты рецептора CB1 могут включать анандамид и арахидоноилглицерин. Экзогенные агонисты могут включать A9-тетрагидроканнабинол. Было показано, что антагонисты или обратные агонисты снижают вес тела и улучшают метаболические параметры, например снижают уровни глюкозы и инсулина в плазме крови. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающая часть слитого белка TTR представляет собой антитело к CB1R (например, антитело к CB1R 10D10, содержащее тяжелую цепь под SEQ ID NO: 5 и легкую цепь под SEQ ID NO: 11; или антитело к CB1R, содержащее тяжелую цепь под SEQ ID NO: 6 или 7 и легкую цепь под SEQ ID NO: 11). В других конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок слитого белка на основе TTR представляет собой Fab к CB1R (например, Fab, полученный из 10D10, такой как тяжелая цепь Fab под SEQ ID NO:44 и легкая цепь Fab под SEQ ID NO:11). См., например, публикацию патента США 20160145333, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок (например, антитело или Fab) специфически связывается с GITR (глюкокортикоид-индуцированный TNFR-родственный белок; TNFRSF18). GITR, иногда также упоминаемый как индуцируемый активацией член семейства TNFR (AITR), является рецептором, принадлежащим к суперсемейству рецепторов TNF (TNFRSF). Он активируется своим родственным лигандом, лигандом GITR (GITRL, TNFSF18). GITR представляет собой трансмембранный белок типа I, который содержит богатый цистеином внеклеточный домен, который характерен для членов семейства TNFR. Цитоплазматический домен GITR, например, имеет близкую гомологию с определенными другими членами семейства TNFR, такими как 4-1BB и CD27 (Nocentini, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:6216-6221, которая включена в данный документ посредством ссылки). Активация GITR приводит к усилению иммунного ответа, и такая активация потенциально может восстановить иммунные ответы на инфекции и опухоли. Соответственно, молекулы, способные активировать GITR, могут быть пригодны в качестве иммуностимулирующих средств в условиях, в которых желательно инициировать усиленный иммунный ответ. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающая часть слитого белка на основе TTR представляет собой антитело к GITR (например, антитело к GITR 9H6, содержащее тяжелую цепь под SEQ ID NO: 18 и легкую цепь под SEQ ID NO: 25; или антитело к GITR, содержащее тяжелую цепь под SEQ ID NO: 19 или 20 и легкую цепь под SEQ ID NO: 25). В других конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок слитого белка на основе TTR представляет собой Fab к GITR (например, Fab, полученный из 9H6, такой как тяжелая цепь Fab под SEQ ID NO: 21 и легкая цепь Fab под SEQ ID NO: 26). См., например, публикацию патента США 20150064204, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок (например, антитело или Fab) специфически связывается с TRAILR2 (рецептор TRAIL 2; также упоминается как DR5 (рецептор смерти 5)). Взаимодействие между TR-2 (рецептором родственного фактору некроза опухоли (TNF) лиганда, индуцирующего апоптоз ("TRAIL") 2) и его лигандом, TRAIL, играет роль в индукции апоптоза (см., например, Almasan et al., Cytokine & Growth Factor Reviews 14: 337-348 (2003)). TRAIL, также известный как лиганд Apo2, представляет собой гомомерный лиганд, который взаимодействует с четырьмя членами суперсемейства рецепторов TNF (рецепторы TRAIL ("TR") 1-4), а также с родственным растворимым рецептором опстеопротегерина ("OPG"). Связывание TRAIL с TR-1 или TR-2 на поверхности клетки вызывает апоптоз этой клетки. После начального связывания TRAIL с TR-1 или TR-2 внутриклеточные белки привлекаются к внутриклеточному домену смерти рецептора, образуя сигнальный комплекс. Некоторые внутриклеточные каспазы привлекаются к комплексу; где они аутоактивируются и, в свою очередь, активируют дополнительные каспазы и внутриклеточный каскад апоптоза. TR-3, TR-4 и OPG не имеют внутриклеточного домена, ответственного за передачу сигнала апоптоза. Таким образом, связывание TRAIL с TR-3, TR-4 или OPG не вызывает апоптоз. TR-3 и TR-4 также называют рецепторами "ловушками", и было показано, что их сверхэкспрессия защищает клетки от апоптотической индукции

TRAIL. TR-2 экспрессируется в различных клетках, включая печень, мозг, молочную железу, почку, толстую кишку, легкое, селезенку, тимус, лимфоциты периферической крови, предстательную железу, яичко, яичник, матку и различные ткани в пределах желудочно-кишечного тракта. (См., например, Walczak et al., *EMBO J.* 16: 5386-5397 (1997); Spierings et al., *J. Histochem. Cytochem.* 52: 821-831 (2004), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки). Хотя TRAIL и рецепторы TRAIL широко экспрессируются, они наиболее активны в отношении индукции апоптоза в трансформированных клетках. (См., например, Daigle et al., *Swiss Med. Wkly.* 131: 231-237 (2001), которая включена в данный документ посредством ссылки). Конатумумаб, моноклональное антитело к TRAILR2, разрабатывалось для лечения рака. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающая часть слитого белка TTR представляет собой антитело к TRAILR2 (например конатумумаб, содержащий тяжелую цепь под SEQ ID NO: 31 и легкую цепь под SEQ ID NO: 38; или антитело к TRAILR2, содержащее тяжелую цепь под SEQ ID NO: 32 или 33 и легкую цепь под SEQ ID NO: 38). В других конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок слитого белка на основе TTR представляет собой Fab к TRAILR2 (например, Fab, полученный из конатумумаба, такой как тяжелая цепь Fab под SEQ ID NO: 34 и легкая цепь Fab под SEQ ID NO: 39).

Варианты TTR.

Как обсуждалось выше, варианты TTR также могут использоваться в настоящем изобретении. Любой из вариантов TTR, обсуждаемых в данном документе, может использоваться в комбинации друг с другом. Варианты TTR включают белки, содержащие аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 86%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична белку TTR, например, под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления TTR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность TTR человека под SEQ ID NO: 43. В конкретном варианте осуществления TTR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43 с мутациями в K15, C10 или как в K15, так и в C10 (например, K15A, C10A или как K15A, так и C10A). В конкретных вариантах осуществления TTR по настоящему изобретению содержит мутации как K15A, так и C10A и, таким образом, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

Цистеины, присутствующие в TTR человека (например, под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 43) могут использоваться в качестве сайтов конъюгации с антигенсвязывающими белками (например, антителами и Fab). Кроме того, варианты TTR, которые обеспечивают сайт-специфическую конъюгацию, такие как варианты TTR со сконструированными цистеинами, могут быть использованы в настоящем изобретении. См., например, USP 8633153, которая включена в данный документ посредством ссылки. Например, вариант TTR может включать одну или несколько из следующих мутаций по цистеину: A37C, D38C, A81C или G83C.

Дополнительные варианты, пригодные в настоящем изобретении, включают, например, белки TTR с усечениями на C- или N-конце. Такие белки TTR включают белки, в которых 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот удалены с C- или N-конца белка TTR. В некоторых вариантах осуществления слитые белки по настоящему изобретению содержат белки TTR, в которых 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот удалены с C- или N-конца белка TTR. В других вариантах осуществления слитые белки по настоящему изобретению содержат белки TTR, в которых 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот удалены с N-конца белка TTR.

Дополнительные варианты TTR, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают варианты, которые уменьшают или блокируют связывание TTR с тироксином. Каждый тетрамер на основе TTR содержит два сайта связывания тироксина, расположенных в центральном канале тетрамера на основе TTR. Такие варианты, например, могут избежать вмешательства в биологию тироксина у пациентов и могут избежать воздействия продуктов слияния на основе TTR на путь метаболизма тироксина. Еще другие варианты TTR, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают варианты, которые уменьшают или устраняют протеолитическую активность TTR.

Кроме того, в настоящем изобретении могут использоваться продукты слияния TTR и His-метки. Например, продукты слияния TTR и His-метки можно использовать при очистке конструкций TTR-Fab, где Fab не содержит Fc, или для очистки конструкций TTR-Ab, где предпочтительно избегать среды для очистки с низким pH колонки для аффинной хроматографии на основе связывания с белком A. В некоторых вариантах осуществления His-метка удаляется после очистки. His-метки могут также присутствовать в конечной терапевтической молекуле (т.е. метка может сохраняться после очистки). В некоторых вариантах осуществления His-метка представляет собой His, (His)₂, (His)₃, (His)₄, (His)₅, (His)₆, (His)₇, (His)₈, (His)₉, или (His)₁₀-метку. В конкретных вариантах осуществления His-метка представляет собой (His)₆ или (His)₇-метку. В конкретном варианте осуществления His-метка представляет собой (His)₆-метку. В некоторых вариантах осуществления His-метка включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот глицина в качестве линкера. В конкретном варианте осуществления His-метка включает два глицина (например, GGNNNNN).

В некоторых вариантах осуществления двухглициновый аминокислотный линкер может быть встав-

лен между вариантом TTR и тяжелой или легкой цепью.

Кроме того, вариант TTR по настоящему изобретению может включать варианты, включающие сайты гликозилирования, которые могут быть полезны при модулировании свойств РК или растворимости продуктов слияния на основе TTR. Кроме того, варианты TTR или слитые белки на основе TTR по настоящему изобретению могут быть модифицированы для включения фрагментов, которые придают полезные РК свойства, например триазинсодержащих фрагментов (содержащихся в конструкциях, содержащих концевую группу, способную вступать в реакцию с белком; см., например, публикацию РСТ № WO/2017/083604, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Способы получения гомодимерных и гомотетрамерных слитых белков.

Способы получения гомодимерных и гомотетрамерных продуктов слияния по настоящему изобретению обсуждаются в примерах.

Как правило, гомодимерные и гомотетрамерные продукты слияния по настоящему изобретению могут быть получены с использованием рекомбинантных способов. Соответственно, настоящее изобретение включает полинуклеотиды, кодирующие гомодимерные и гомотетрамерные продукты слияния. В другом аспекте настоящее изобретение включает вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий гомодимерный и гомотетрамерный продукт слияния. В определенных вариантах осуществления векторы экспрессии содержат контрольные последовательности (например, промоторы, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим гомодимерный и гомотетрамерный продукт слияния, чтобы поддерживать экспрессию в подходящей клетке-хозяине. В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии также содержит полинуклеотидные последовательности, которые обеспечивают независимую от хромосомы репликацию в клетке-хозяине. Иллюстративные векторы включают без ограничения плазмиды, космиды и YACS. В конкретном варианте осуществления вектор представляет собой рТТ5.

Как правило, клетки-хозяева млекопитающих используются при создании гибридных конструкций гомодимера Ab TTR или гомотетрамера Ab TTR. Клетки-хозяева млекопитающих также пригодны для создания слитых гомотетрамерных конструкций Fab-TTR, хотя также могут использоваться клетки, отличные от млекопитающих, такие как прокариотические (бактерии) клетки-хозяева и клетки-хозяева, отличные от млекопитающих (например, дрожжи).

В еще одном аспекте настоящее изобретение включает клетку-хозяина, содержащую вектор экспрессии по настоящему изобретению. Способы трансфекции клеток-хозяев вектором экспрессии и культивирования трансфицированных клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии гомодимерных и гомотетрамерных продуктов слияния, известны из уровня техники. Используемая процедура трансфекции может зависеть от хозяина, подлежащего трансформации. Некоторые способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих известны из уровня техники и включают без ограничения декстран-опосредованную трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(-ов) в липосомах и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Определенные линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, известны из уровня техники и включают без ограничения многие immortalized линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), в том числе без ограничения клетки яичника китайского хомячка (CHO; например CHO-K1), клетки линии E5, клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоклеточной карциномы человека (например, Нер G2), клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК 293) и ряд других линий клеток. В определенных вариантах осуществления линии клеток могут быть выбраны путем определения того, какие линии клеток обладают высокими уровнями экспрессии и продуцируют гомодимерные и гомотетрамерные продукты слияния.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способам получения гомодимерных и гомотетрамерных слитых белков, описанных в данном документе. Например, гомодимерные и гомотетрамерные слитые белки могут быть получены с помощью

а) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий гомодимерный и гомотетрамерный продукт слияния; и

б) выделения гомодимерного или гомотетрамерного слитого белка из указанной культуры.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество одного или нескольких гомомультимерных слитых белков по настоящему изобретению (например, гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело или гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab) вместе с фармацевтически эффективным разбавителем, носителем, растворителем, эмульгатором, консервантом и/или адьювантом. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизованные композиции.

Предпочтительно материалы для составления являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях. В конкретных вариантах осуществления предусматриваются фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество гомомультимер-

ных слитых белков (например, гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело или гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab).

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модифицирования, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как боратный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратные, фосфатные буферы или буферы на основе других органических кислот); объемобразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); окрашивающие, ароматизирующие и разбавляющие средства; эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как ион натрия); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенолиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как Pluronic, PEG, сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тринитротолуол, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); средства, увеличивающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); среды-носители для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адьюванты. См., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В определенных вариантах осуществления оптимальную фармацевтическую композицию будет определять специалист в данной области техники в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формата доставки и требуемой дозировки. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариантах осуществления такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления первичные среда-носитель или носитель в фармацевтической композиции могут быть либо водными, либо неводными по своей природе. Например, подходящей средой-носителем или носителем может быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно, дополненные другими веществами, общепринятыми для композиций для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой дополнительные иллюстративные среды-носители. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат Tris-буфер со значением pH, составляющим приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер со значением pH, составляющим приблизительно 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения гомомультимерные композиции (например, гомодимерные слитые белки TTR-антитело, гомотетрамерные слитые белки TTR-антитело или гомотетрамерные слитые белки TTR-Fab) могут быть получены для хранения путем смешивания выбранной композиции, характеризующейся требуемой степенью чистоты, с необязательными средствами для составления (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в виде лиофилизированной таблетки или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах осуществления гомомультимер (например, гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело или гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab) может быть составлен в виде лиофилизата с применением соответствующих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть выбраны для парентеральной доставки. В качестве альтернативы могут быть выбраны композиции для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетентности в данной области техники. Компоненты состава предпочтительно присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для места введения. В определенных вариантах осуществления для поддержания композиции при физиологическом pH или при немного более низком значении pH, как правило, pH в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 8, применяются буферы.

Когда предполагается парентеральное введение, терапевтические композиции для применения в настоящем изобретении могут быть предоставлены в форме апирогенного, приемлемого для парентераль-

ного введения водного раствора, содержащего требуемый гомомультимер (например, гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело или гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab) в фармацевтически приемлемой среде-носителе. Особенно подходящей средой-носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой гомомультимер (например, гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело или гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab) составлен в виде стерильного, изотонического раствора, который хранится должным образом. В определенных вариантах осуществления получение может предусматривать составление требуемой молекулы со средством, таким как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может доставляться посредством депо-инъекции. В определенных вариантах осуществления также может применяться гиалуроновая кислота, обладающая эффектом содействия продленному пребыванию в кровотоке. В определенных вариантах осуществления для введения требуемого антигенсвязывающего белка могут применяться имплантируемые устройства для доставки лекарственного средства.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для ингаляции. В этих вариантах осуществления гомомультимеры (например, гомодимерные слитые белки TTR-антитело, гомотетрамерные слитые белки TTR-антитело или гомотетрамерные слитые белки TTR-Fab) преимущественно составляют в виде сухого вдыхаемого порошка. В конкретных вариантах осуществления растворы для ингаляции гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab) также могут быть составлены с пропеллентом для аэрозольной доставки. В определенных вариантах осуществления растворы могут распыляться. В силу этого ингаляционное введение и способы составления дополнительно описаны в международной патентной заявке № PCT/US94/001875, которая включена посредством ссылки и описывает легочную доставку химически модифицированных белков.

Также предусматривается, что составы можно вводить перорально. Гомомультимеры (например, гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело или гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab), которые вводят таким образом, могут быть составлены с носителями, которые обычно применяются в составлении твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы, или без таких носителей. В определенных вариантах осуществления капсула может быть разработана для высвобождения активной части состава в таком месте желудочно-кишечного тракта, в котором биологическая доступность максимальна, а предварительное системное разрушение минимально. Дополнительные средства могут быть включены для облегчения абсорбции гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab). Также могут использоваться разбавители, ароматизаторы, легкоплавкие воски, растительные масла, смазывающие вещества, суспендирующие вещества, вещества для улучшения распадаемости таблеток и связывающие вещества.

Специалистам в данной области техники будут очевидны дополнительные фармацевтические композиции, включая гомомультимеры (например, гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело или гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab) в виде составов, обеспечивающих замедленную или контролируемую доставку. Также специалистам в данной области техники известны методики составления целого ряда других средств для замедленной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции. См., например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, которая включена посредством ссылки и описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (раскрытые в патенте США № 3773919 и публикации заявки на европейский патент № EP 058481, каждый из которых включен посредством ссылки), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 и Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, см. выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация заявки на европейский патент № EP 133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены с помощью любого из нескольких способов, известных из уровня техники. См., например, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; публикации заявок на европейский патент №№ EP 036676; EP 088046 и EP 143949, включенные посредством ссылки.

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, предусмотрены в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута посредством фильтрации через мембрану для стерильной фильтрации. Если композицию лиофилизируют, стерилизацию с помощью данного способа можно выполнять либо перед лиофилизацией и восстановлением, либо после них. Компози-

ции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в виде раствора. Обычно композиции для парентерального введения помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет или флакон для внутривенного раствора с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Аспекты настоящего изобретения включают составы на основе самобуферизирующегося гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab), которые можно использовать в качестве фармацевтических композиций, как описано в международной патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Как обсуждалось выше, определенные варианты осуществления предусматривают композиции гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab), в частности фармацевтические композиции гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab), которые содержат, в дополнение к гомомультимеру (например, гомодимерному слитому белку TTR-антитело, гомотетрамерному слитому белку TTR-антитело или гомотетрамерному слитому белку TTR-Fab), одно или несколько вспомогательных веществ, таких как те, которые иллюстративно описаны в этом разделе и в других местах данного документа. В этом отношении в настоящем изобретении могут быть использованы вспомогательные вещества для широкого круга целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, таких как регулирование вязкости, и/или процессов по настоящему изобретению для повышения эффективности и/или стабилизации таких составов и процессов в отношении разрушения и порчи, например, из-за стрессов, возникающих во время изготовления, доставки, хранения, подготовки к применению, введения и после него.

Разнообразные объяснения доступны в отношении стабилизации белка и материалов для составления и способов, пригодных в этом отношении, такие как Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations", *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution", в *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology.* 13: 61-84 (2002), и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, особенно в частях, относящихся к вспомогательным веществам и способам, относящихся к ним же, для составов на основе самобуферизирующегося белка в соответствии с настоящим изобретением, особенно в отношении белковых фармацевтических продуктов и способов для применения на животных и/или людях.

Соли могут быть использованы в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения для, например, регулирования ионной силы и/или изотоничности состава и/или улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с настоящим изобретением.

Как хорошо известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков, связываясь с заряженными остатками на поверхности белка и экранируя заряженные и полярные группы в белке и уменьшая силу их электростатических взаимодействий, притягивающих и отталкивающих взаимодействий. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания, в частности, денатурированных пептидных связей (--CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и, таким образом, предотвратить или уменьшить агрегацию и нерастворимость белка.

Ионные виды значительно различаются по своему воздействию на белки. Был разработан ряд категориальных ранжирований ионов и их эффектов в отношении белков, которые можно использовать при составлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Одним из примеров является ряд Хофмайстера, который ранжирует ионные и полярные неионные растворенные вещества по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используются в высоких концентрациях (например, >1 моль/л сульфата аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для денатурирования и/или для растворения белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов в отношении "всаливания" и "высаливания" определяет их положение в ряду Хофмайстера.

Свободные аминокислоты могут быть использованы в гомомультимерных (например, гомодимерных слитых белках TTR-антитело, гомотетрамерных слитых белках TTR-антитело или гомотетрамерных слитых белках TTR-Fab) составах в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения в качестве объемобразующих средств, стабилизаторов и антиоксидантов, а также других стандартных вариантов применения. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть использованы для стабилизации белков в составе. Глицин пригоден при лиофилизации для обеспечения правильной структуры и свойств таблетки. Аргинин может быть пригоден для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин пригоден в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают сахара, например маннит, сахарозу и сорбит, и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и, для обсуждаемых в данном документе целей, полиэтиленгликоль (PEG) и родственные вещества. Полиолы являются космотропными. Они представляют собой пригодные стабилизирующие средства как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от физических и химических процессов разрушения. Полиолы также пригодны для регулирования тоничности составов.

В число полиолов, пригодных в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, входит маннит, обычно применяемый для обеспечения структурной стабильности таблетки в лиофилизированных составах. Он обеспечивает структурную стабильность таблетки. Обычно его применяют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбитол и сахароза являются одними из предпочтительных средств для регулирования тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от видов стресса, обусловленных замораживанием-размораживанием, во время транспортировки или получения нерасфасованного продукта в процессе изготовления. Восстанавливающие сахара (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Следовательно, они обычно не входят в число предпочтительных полиолов для использования в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, сахара, которые образуют такие реакционноспособные вещества, такие как сахароза, которая гидролизуется до фруктозы и глюкозы в кислых условиях и, следовательно, вызывает гликирование, также не входят в число предпочтительных полиолов по настоящему изобретению в этом отношении. PEG пригоден для стабилизации белков и в качестве криопротектора и может быть использован в настоящем изобретении в этом отношении.

Варианты осуществления составов на основе гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab) дополнительно содержат поверхностно-активные вещества. Молекулы белка могут быть подвержены адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое вещество-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты обычно повышаются обратно пропорционально концентрации белка. Эти вредные взаимодействия обычно повышаются обратно пропорционально концентрации белка и обычно усугубляются физическим перемешиванием, например, возникающим при транспортировке и обращении с продуктом.

Поверхностно-активные вещества обычно используются для предотвращения, минимизации или уменьшения поверхностной адсорбции. Подходящие поверхностно-активные вещества в настоящем изобретении в этом отношении включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие полиэтоксилатные сложные эфиры сорбита и жирных кислот и полоксамер 188.

Поверхностно-активные вещества также обычно используются для контроля конформационной стабильности белка. Применение поверхностно-активных веществ в этом отношении является специфичным для белка, поскольку любое данное поверхностно-активное вещество обычно стабилизирует некоторые белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты чувствительны к окислительному разрушению и часто при поставке содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белковых остатков, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует использовать осторожно, а при их использовании следует применять их в наименьшей эффективной концентрации. В этом отношении полисорбаты служат примером общего правила, согласно которому вспомогательные вещества следует использовать в их наименьших эффективных концентрациях.

Варианты осуществления составов на основе гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab) дополнительно содержат один или несколько антиоксидантов. В некоторой степени вредное окисление белков может быть предотвращено в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней кислорода и температуры окружающей среды и путем избегания воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут быть использованы для предотвращения окислительного разрушения белков. К числу пригодных антиоксидантов в этом отношении относятся восстанавливающие средства, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие средства. Антиоксиданты для применения в терапевтических белковых составах в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность в течение всего срока годности продукта. EDTA является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с настоящим изобретением в этом отношении.

Антиоксиданты могут повредить белки. Например, восстановители, в частности такие как глутатион, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в настоящем изобретении выбраны, среди прочего, для устранения или достаточного уменьшения возможности повреждения ими белков в составе.

Составы в соответствии с настоящим изобретением могут включать ионы металлов, которые являются кофакторами белка и которые необходимы для образования белковых координационных комплексов, такие как цинк, необходимый для образования определенных суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Однако ионы металлов также

катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки.

Ионы магния (10-120 мМ) могут быть использованы для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы Ca^{+2} (не более 100 мМ) могут повысить стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Однако Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} могут дестабилизировать rhDNase. Аналогично, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, он может быть дестабилизирован Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , а его агрегация может быть повышена ионами Al^{+3} .

Варианты осуществления составов на основе гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab) дополнительно содержат один или несколько консервантов. Консерванты необходимы для разработки многодозовых составов для парентерального введения, которые предусматривают более одного извлечения из одного и того же контейнера. Их основная функция заключается в ингибировании роста микроорганизмов и обеспечении стерильности продукта на протяжении всего срока годности при хранении или срока применения лекарственного продукта. Широко применяемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты имеют долгую историю применения с низкомолекулярными парентеральными препаратами, разработка белковых составов, включающих консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующий эффект в отношении белков (агрегация), и это стало основным фактором ограничения их применения в многодозовых белковых составах. На сегодняшний день, большинство белковых лекарственных средств составлялись только для однократного применения. Однако, если возможно получить многодозовые составы, они имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении удобства для пациентов и увеличении рыночной привлекательности. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), в случае с которым разработка составов с добавлением консервантов привела к появлению на рынке более удобных форм выпуска в виде многодозовых шприцев-ручек. В настоящее время на рынке доступны по меньшей мере четыре таких устройства в виде шприцев-ручек, содержащих составы на основе hGH с добавлением консервантов. Norditropin (жидкость, Novo Nordisk), Nutropin AQ (жидкость, Genentech) и Genotropin (лиофилизированный--двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatropе (Eli Lilly) содержит м-крезол.

При составлении и разработке лекарственных форм с добавлением консервантов необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Для этого необходимо провести тестирование данного консерванта в лекарственной форме в диапазонах концентраций, которые обеспечивают противомикробную эффективность без нарушения стабильности белка.

Как и предполагалось, разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более сложной задачей, чем разработка лиофилизированных составов. Высушенные посредством сублимации продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстанавливать с помощью разбавителя, содержащего консервант, в момент применения. Это сокращает время, в течение которого консервант контактирует с белком, значительно минимизируя связанные с этим риски для стабильности. При применении жидких составов эффективность и стабильность консерванта следует поддерживать в течение всего срока годности продукта при хранении (приблизительно 18-24 месяцев). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные компоненты.

Составы на основе гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab) обычно предназначены для конкретных путей и способов введения, для конкретных дозировок введения и частоты введения, для конкретных способов лечения конкретных заболеваний, с диапазонами биодоступности и стойкости, среди прочего. Таким образом, составы могут быть разработаны в соответствии с настоящим изобретением для доставки любым подходящим путем, включая без ограничения пероральный, ушной, глазной, ректальный и вагинальный, и парентеральный пути, включая внутривенную и внутриартериальную инъекцию, внутримышечную инъекцию и подкожную инъекцию.

После того, как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизованного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизованной), которую восстанавливают перед введением. Настоящее изобретение также предусматривает наборы для получения единицы введения в виде однократной дозы. Каждый набор по настоящему изобретению может содержать как первый контейнер с сухим белком, так и второй контейнер с водным составом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким содержимым и шприцы с лиофилизатом).

Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей гомомультимер (например, содержащей гомодимерный слитый белок TTR-антитело, содержащей гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело или содержащей гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab), будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области техники будет

принимать во внимание, что соответствующие уровни дозирования для лечения, отчасти, будут варьироваться в зависимости от доставляемой молекулы, показания, для которого применяют гомомультимер (например, гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело или гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab), пути введения и размера (вес тела, площадь поверхности тела или размер органа) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента. В определенных вариантах осуществления клиницист может подбирать дозировку и модифицировать путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичная дозировка может варьироваться от приблизительно 0,1 мкг/кг до не более приблизительно 30 мг/кг или больше, в зависимости от факторов, упомянутых выше. В конкретных вариантах осуществления дозировка может варьироваться от 1,0 мкг/кг до не более приблизительно 20 мг/кг, необязательно от 10 мкг/кг до не более приблизительно 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до не более приблизительно 5 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество гомомультимера (например, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело или гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab) предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты или продолжительности периодов без симптомов заболевания или к предупреждению нарушений или инвалидности из-за поражения заболеванием.

Фармацевтические композиции могут вводиться с использованием медицинского устройства. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Варианты терапевтического применения гомодимерных и гомотетрамерных слитых белков.

Как показано в примерах, было обнаружено, что димеризация антител с TTR для получения гомодимерных слитых белков на основе TTR, а также тетрамеризация антител и фрагментов Fab с TTR с получением гомотетрамерных слитых белков на основе TTR приводит к образованию содержащих TTR слитых белков с повышенной авидностью по сравнению с отдельным(-и) антителом(-ами) и/или фрагментом(-ами) Fab.

Кроме того, гомодимерные слитые белки на основе TTR и гомотетрамерные слитые белки на основе TTR демонстрируют улучшенную кластеризацию антигена по сравнению с отдельным(-и) антителом(-ами) и/или фрагментом(-ами) Fab. Когда антитела (например, антитела IgG) связывают антигены на клетках-мишенях (например, опухолевых клетках), полученные в результате кластерные домены Fc взаимодействуют с FcγR, обнаруженными на иммунных эффекторных клетках, таких как NK-клетки и макрофаги. Эта кластеризация помогает в передаче сигналов через FcγR, что приводит к инициации клеточно-опосредованных эффекторных функций, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Таким образом, гомодимерные слитые белки на основе TTR и гомотетрамерные слитые белки на основе TTR особенно пригодны для нацеливания на лиганды, где высокая аффинность/авидность антитела или Fab приводит к усиленному биологическому эффекту. Усиление клеточно-опосредованных эффекторных функций с помощью гомодимерных конструкций на основе TTR и гомотетрамерных конструкций на основе TTR по настоящему изобретению приводит к повышенной способности уничтожать клетки, что пригодно, например, в лечении рака.

Гомодимерные слитые белки на основе TTR и гомотетрамерные слитые белки на основе TTR по настоящему изобретению можно применять для связывания множества мишеней/антигенов. Например, гомодимерные слитые белки на основе TTR и гомотетрамерные слитые белки на основе TTR можно применять в качестве агонистов при нацеливании на TRAIL, TRAIL2R, GITR, OX40, GLP1, TREM2 и 4-1BB. Кроме того, гомодимерные слитые белки на основе TTR и гомотетрамерные слитые белки на основе TTR можно использовать в качестве антагонистов при нацеливании на GIPR, TNFR, рецепторы интегрина, PD-1, PD-L1, TIGIT, LAG-3 и TIM-3.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к способам лечения рака с помощью гомодимерных слитых белков и гомотетрамерных слитых белков, описанных в данном документе.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению гомодимерных слитых белков и гомотетрамерных слитых белков, описанных в данном документе, в лечении рака.

В еще других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гомодимерным слитым белкам и гомотетрамерным слитым белкам, описанным в данном документе, для применения в лечении рака.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью иллюстрации конкретных вариантов осуществления или признаков настоящего изобретения и не предназначены для ограничения его объема.

Пример 1. Краткое описание полученных гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab.

Клонирование гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab.

Следующие антитела и Fab, полученные из гибридом, использовали для создания слитых белков:

Антитела и Fab к CB1R от гибридомы CB10 (также упоминается как гибридома 10D10).

Антитела и Fab к G1TR от гибридомы 9H6.

Антитело конатумумаб и соответствующий Fab конатумумаба к TRAILR2. Получили следующие слитые белки на основе TTR. [TTR]=тетрамер на основе TTR. Для простоты His-метки (для конструкций Fab) не проиллюстрированы в кратком описании примера 1.

В частности, сконструировали следующие гомодимерные слитые белки TTR-антитело. В этих конструкциях С-конец обеих тяжелых цепей антитела связали с N-концом каждой субъединицы TTR.

а. [Антитела к CB1R]₂-[TTR].

"Гомодимерный слитый белок TTR-антитело к CB1R".

Полученные пары последовательностей:

Продукт слияния TTR и тяжелой цепи	Легкая цепь
[SEQ ID NO: 5] ₂ -[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 11
[[SEQ ID NO: 5]-[GGGGS]] ₂ -[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 11
[[SEQ ID NO: 5]-[(GGGGS) ₂]] ₂ -[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 11
[[SEQ ID NO: 5]-[(GGGGS) ₃]] ₂ -[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 11
[[SEQ ID NO: 5]-[(GGGGS) ₄]] ₂ -[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 11

б. [антитела к G1TR]₂-[TTR].

"Гомодимерный слитый белок TTR-антитело к G1TR".

Полученные пары последовательностей:

Продукт слияния TTR и тяжелой цепи	Легкая цепь
[SEQ ID NO: 18] ₂ -[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 25

с. [Антитела к TRAILR2]₂-[TTR].

"Гомодимерный слитый белок TTR-антитело конатумумаб".

Полученные пары последовательностей:

Продукт слияния TTR и тяжелой цепи	Легкая цепь
[SEQ ID NO: 31] ₂ -[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 38

Кроме того, сконструировали следующие гомотетрамерные слитые белки TTR-антитело. В этих конструкциях одну из двух тяжелых цепей С-конца антитела, содержащую мутации замены пар заряженных аминокислот D399K и E356K (SEQ ID NO: 6, 19 или 32), связали (с помощью линкера или без него) с N-концом субъединицы TTR. Оставшуюся тяжелая цепь, содержащую комплементарный набор мутаций замены пар заряженных аминокислот K392D и K409D (SEQ ID NO: 7, 20 или 33), связали со связанной тяжелой цепью. Следует отметить, что при обсуждении конструкций в разделе примеры обсуждения E416K и D459K относятся к EU E356K и EU D399K соответственно. Аналогично, при обсуждении конструкций в разделе примеры обсуждения K420D и K437D относятся к EU K392D и EU K409D соответственно.

а. [Антитела к CB1R]₄-[TTR].

"Гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело к CB1R".

Полученные пары последовательностей:

Продукт слияния TTR и тяжелой цепи	Легкая цепь
[SEQ ID NO: 6] ₄ -[SEQ ID NO: 1] ₄ и [SEQ ID NO: 7] ₄	SEQ ID NO: 11
[[SEQ ID NO: 6]-[GGGGS]] ₄ -[SEQ ID NO: 1] ₄ и [[SEQ ID NO: 7] ₄	SEQ ID NO: 11

б. [Антитела к G1TR]₄-[TTR].

"Гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело к G1TR".

Полученные пары последовательностей:

Продукт слияния TTR и тяжелой цепи	Легкая цепь
[SEQ ID NO: 19] ₄ –[SEQ ID NO: 1] ₄ и [SEQ ID NO: 20] ₄	SEQ ID NO: 25

с. [Антитела к TRAILR2]₄–[TTR].

"Гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело конатумумаб".

Полученные пары последовательностей:

Продукт слияния TTR и тяжелой цепи	Легкая цепь
[SEQ ID NO: 32] ₄ –[SEQ ID NO: 1] ₄ и [SEQ ID NO: 33] ₄	SEQ ID NO: 38

Кроме того, сконструировали следующие гомотетрамерные слитые белки TTR-Fab. В этих конструкциях С-конец каждого фрагмента Fab связали с N-концом каждой субъединицы TTR.

а. [Fab к CB1R]₄–[TTR].

"Гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к CB1R".

Следует отметить, что при обсуждении конструкций в разделе примеры обсуждение S215E относится к EU S183E. Аналогично, при обсуждении конструкций в разделе примеры обсуждение S203K относится к EU S176K.

В продукте слияния [SEQ ID NO: 44]₄–[SEQ ID NO: 1]₄+SEQ ID NO: 11 не использовали мутации замены пар заряженных аминокислот. В продукте слияния [SEQ ID NO: 45]₄–[SEQ ID NO: 1]₄ и SEQ ID NO: 46 SEQ ID NO: 45 содержит мутацию замены пар заряженных аминокислот S215E, и SEQ ID NO: 46 содержит мутацию замены пар заряженных аминокислот S203K, обе пронумерованы согласно системы EU.

Полученные пары последовательностей:

Продукт слияния TTR и тяжелой цепи	Легкая цепь
[SEQ ID NO: 44] ₄ –[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 44	[SEQ ID NO: 11] ₄ –[SEQ ID NO: 1] ₄
[SEQ ID NO: 45] ₄ –[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 46
SEQ ID NO: 45	[SEQ ID NO: 46] ₄ –[SEQ ID NO: 1] ₄

б. [Fab к GITR]₄–[TTR].

"Гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к GITR".

Полученные пары последовательностей:

Продукт слияния TTR и тяжелой цепи	Легкая цепь
[SEQ ID NO: 21] ₄ –[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 26

с. [Fab к TRAILR2]₄–[TTR].

"Гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab конатумумаб".

Полученные пары последовательностей:

Продукт слияния TTR и тяжелой цепи	Легкая цепь
[SEQ ID NO: 34] ₄ –[SEQ ID NO: 1] ₄	SEQ ID NO: 39

Для гомодимерных слитых белков TTR-антитело С-конец каждой тяжелой цепи антитела связали с N-концом каждой субъединицы TTR. Для гомотетрамерных слитых белков TTR-антитело одна из двух тяжелых цепей С-конца антитела связали с N-концом каждой субъединицы TTR. Для гомотетрамерных слитых белков TTR-Fab С-конец каждого фрагмента Fab связали с N-концом каждой субъединицы TTR.

Слитые белки получили с использованием стандартных методов молекулярной биологии, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР), сайт-направленный мутагенез ПЦР, расщепление рестрикционной эндонуклеазой и ферментативное лигирование в плазмиды экспрессии млекопитающих. Также получили молекулы Fab-TTR, меченные полигистидином, где (His)₆-метка была добавлена к С-концу Fab.

Клонированные ДНК слитых с TTR вариантов тяжелой цепи и Fab в комбинации с их соответствующими клонированными ДНК легкой цепи (LC) антитела к CB1, к GITR и к TR2 использовали для трансфекции клеток млекопитающих для экспрессии гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab. Методики, как правило, выполняли в соответствии со способами, на которые можно сослаться в Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, 3rd ed., Sambrook et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Пример 2. Клонирование, экспрессия и очистка гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к CB1.

Клонирование гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к CB1.

Гомодимеры TTR-антитело к CB1 обычно клонировали следующим образом. pTT5-del-BsmBI:VK1O2O12::[hu anti-<huCB1> 10D10.1 VH]::huIgG2TO (конструкция C59477) использовали в качестве матрицы для конструкций, описанных ниже. Вектор pTT5-del-BsmBI является производным от вектора pTT5, где сайт рестрикции BsmBI удален.

[SEQ ID NO: 5]₂-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 1: с использованием C59477 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего аминоконец сигнальной последовательности, сайт рестрикционного фермента Sail и оптимизированной последовательности Kozak (5' AGT TTA AAC GAA TTC GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CC 3'), в комбинации с 3'-праймером, предназначенным для устранения существующего сайта рестрикции BamHI в C59477, (5' GTG CTG GCG AAT CCA GCT CCA AT A GTC ACC 3'). В результате ПЦР 1 получили продукт размером примерно 220 пар оснований. ПЦР 2a: с использованием C59477 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, предназначенного для удаления существующего сайта рестрикции BamHI (5' GAG CTG GAT TCG CCA GCA CCC AGG 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3) и аминоконец (5' GGT GCC CGT AGG GCC ACC CGG AGA CAG GGA G 3') TTR (SEQ ID NO: 1). В результате ПЦР 2a получили продукт размером примерно 1250 пар оснований. ПЦР 3a: с использованием TTR (SEQ ID NO: 1) в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3) и аминоконец TTR (5' TCC CTG TCT CCG GGT GGC CCT ACG GGC ACC G 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR (SEQ ID NO: 1), терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI (5' AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAT TCC TTG GGA TTG GTG 3'). В результате ПЦР 3a получили продукт размером примерно 400 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 1, 2a и 3a выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью Sail и NotI линеаризованный вектор экспрессии млекопитающих pTT15d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C73494: pTT15d:VK1O2O12::[hu anti-<huCB1>10D10.1 (huIgG2-TO desK)VH]::TTR3.

[[SEQ ID NO: 5]-[GGGGS]₂]-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали с использованием ПЦР 1, как описано выше. ПЦР 2b: с использованием C59477 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, предназначенного для удаления существующего сайта рестрикции BamHI (5' GAG CTG GAT TCG CCA GCA CCC AGG 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3), линкер G4S и аминоконец (5' GGA TCC GCC ACC ACC CGG AGA CAG GGA G 3') TTR (SEQ ID NO: 1). В результате ПЦР 2b получили продукт размером примерно 1250 пар оснований. ПЦР 3b: с использованием TTR (SEQ ID NO: 1) в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3), линкер G4S и аминоконец (5' GGT GGT GGC GGA TCC GGC CCT ACG GGC ACC G 3') TTR, в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI (5' AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAT TCC TTG GGA TTG GTG 3'). В результате ПЦР 3b получили продукт размером примерно 400 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 1, 2b и 3b выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью Sail и NotI линеаризованный вектор экспрессии млекопитающих pTT15d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C73499: pTT15d:VK1O2O12::[hu anti-<huCB1>10D10.1 (huIgG2-TO desK) VH]::G4S::TTR3.

[[SEQ ID NO: 5]-[(GGGGS)₂]₂]-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали с использованием ПЦР 1, как описано выше. ПЦР 2c: с использованием C59477 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, предназначенного для удаления существующего сайта рестрикции BamHI (5' GAG CTG GAT TCG CCA GCA CCC AGG 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3), линкер (GGGGS)₂ и аминоконец (5' GCC GGA CCC TCC CCC ACC GGA TCC GCC ACC TCC ACC CGG AGA CAG GGA G 3') TTR (SEQ ID NO: 1). В результате ПЦР 2c получили продукт размером примерно 1250 пар оснований. ПЦР 3c: с использованием TTR в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3), линкер (GGGGS)₂ и аминоконец TTR (5' CCG GTG GGG GAG GGT CCG GCC CTA CGG GCA CCG GTG AAT CCA AGG CTC CT 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI (5' AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAT TCC TTG GGA TTG GTG 3'). В результате ПЦР 3c получили продукт размером примерно 400 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 1, 2c и 3c выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью Sail и NotI линеаризованный вектор экспрессии млекопитающих pTT15d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C73500: pTT15d:VK1O2O12::[hu anti-<huCB1>10D10.1 (huIgG2-TO desK)

VH]::(G4S)2::TTR3.

[[SEQ ID NO:5]-[(GGGGS)₃]]₂-[SEQ ID NO:1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 4: с использованием C73500 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР (5'-AGT TTA AAC GAA TTC GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CC-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3), линкер (GGGGS)₃ и аминоконец (5' CGT AGG GCC GGA CCC TCC CCC ACC GGA GCC CCC GCC CCC GGA TCC GCC ACC TCC 3') TTR (SEQ ID NO:1) В результате ПЦР 4 получили продукт размером примерно 1500 пар оснований. ПЦР 5: с использованием C73500 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего линкер (GGGGS)₃ (5' TCC GGG GGC GGG GGC TCC GGT GGG GGA GGG T 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI (5' AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAT TCC TTG GGA TTG GTG 3'). В результате ПЦР 5 получили продукт размером примерно 450 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 4 и 5 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью SalI и NotI линейаризованный вектор экспрессии млекопитающих pTT15d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C73690: pTT15d:VK102O12::[hu anti-<huCB1> 10D10.1 (huIgG2-TO desK) VH]::(G4S)3::TTR3.

[[SEQ ID NO:5]-[(GGGGS)₄]]₂-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 6: с использованием C73690 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР (5'-AGT TTA AAC GAA TTC GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CC-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3) и линкер (GGGGS)₄ (5' GGA ACC ACC TCC GCC GGA TCC GCC ACC TCC A 3'). В результате ПЦР 6 получили продукт размером примерно 1500 пар оснований. ПЦР 7: с использованием C73690 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего часть линкера (GGGGS)₄ (5' GGC GGA GGT GGT TCC GGG GGC GGG GGC TCC G 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR (SEQ ID NO: 1), терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI (5' AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAT TCC TTG GGA TTG GTG 3'). В результате ПЦР 7 получили продукт размером примерно 450 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 6 и 7 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью SalI и NotI линейаризованный вектор экспрессии млекопитающих pTT15d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C73729: pTT15d:VK102O12::[hu anti-<huCB1> 10D10.1 (huIgG2-TO desK) VH]::(G4S)4::TTR3.

[SEQ ID NO: 6]₄-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 8: с использованием C73494 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР (5'-AGT TTA AAC GAA TTC GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CC-3') в комбинации с 3'-праймером, предназначенным для превращения остатка глутамата 356 (EU) в лизин в huIgG2 CH3 (5' CTT GGT CAT CTC CTT CCG GGA TGG GGG CAG G 3'). В результате ПЦР 8 получили продукт размером примерно 1200 пар оснований. ПЦР 9: с использованием C73494 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, предназначенного для превращения остатка глутамата 356 (EU) в лизин в huIgG2 CH3 (5'-CTG CCC CCA TCC CGG AAG GAG ATG ACC AAG CA-3'), в комбинации с 3'-праймером, предназначенным для превращения остатка аспартата 399 (EU) в лизин в huIgG2 CH3 (5' GAA GGA GCC GTC GTC CTGA CAG CAT GGG AGG TGT 3'). В результате ПЦР 9 получили продукт размером примерно 160 пар оснований. ПЦР 10: с использованием C73494 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, предназначенного для превращения остатка аспартата 399 (EU) в лизин в huIgG2 CH3 (5' CCT CCC ATG CTG AAG TCC GAC GGC TCC TTC T 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI. В результате ПЦР 10 получили продукт размером примерно 600 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 8, 9 и 10 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью SalI и NotI линейаризованный вектор экспрессии млекопитающих pTT15d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C73730: pTT15d:VK102O12::[hu anti-<huCB1> 10D10.1 (E416K,D459K)(huIgG2-TO desK) VH]::TTR3.

[[SEQ ID NO: 6]-[(GGGGS)₄]]₄-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 11: с использованием C73499 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР (5'-AGT TTA AAC GAA TTC GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CC-3') в комбинации с 3'-праймером, предназначенным для превращения остатка глутамата 356 (EU) в лизин в huIgG2 CH3 (5' CTT GGT CAT CTC CTT CCG GGA TGG GGG CAG G 3'). В результате ПЦР 11 получили продукт размером примерно 1200 пар оснований. ПЦР 12: с использованием C73499 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, предназначенного для превращения остатка глутамата 356 (EU) в лизин в huIgG2 CH3 (5' CTG CCC CCA TCC CGG AAG GAG ATG ACC AAG AAC CA 3'), в комбинации с 3'-праймером, предназначенным для превращения остатка аспартата 399 (EU) в лизин в huIgG2 CH3 (5' GAA GGA GCC GTC GTC CTGA CAG CAT GGG AGG TGT 3'). В результате ПЦР 12 получили продукт размером примерно 160 пар оснований. ПЦР 13: с использованием C73499 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, предназначенного для превращения остатка аспартата 399 (EU) в лизин в huIgG2 CH3 (5' CCT CCC ATG CTG AAG TCC GAC GGC TCC TTC T 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI (5' AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAT TCC TTG GGA TTG GTG 3'). В ре-

зультате ПЦР 13 получили продукт размером примерно 600 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 11, 12 и 13 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью SalI и NotI линейризованный вектор экспрессии млекопитающих рТТ15d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Правила нумерации и наименования аминокислот те же, что и в описании предыдущих конструкций. Полученную конструкцию назвали C73731: рТТ15d:VK1O2O12::[hu anti-<huCB1> 10D10.1 (E416K,D459K)(huIgG2-TO desK) VH]:G4S::TTR3.

SEQ ID NO: 7 конструировали следующим образом. ПЦР 14: с использованием C73494 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР (5'-AGT TTA AAC GAA TTC GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CC-3') в комбинации с 3'-праймером, предназначенным для превращения остатка лизина 392 (EU) в аспарат в huIgG2 CH3 (5' GGG AGG TGT GGT ATC GTA GTT GTT CTC CGG CTG C 3'), в результате ПЦР 14 получили продукт размером примерно 1300 пар оснований. ПЦР 15: с использованием рТТ5-del-Bsm-BI:VK1O2O12::[huFc_(IgG2)(K392D K409D) ("C59541")] в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, предназначенного для превращения остатка лизина 392 (EU) в аспарат в huIgG2 CH3 (5' CCG GAG AAC AAC TAC GAT ACC ACA CCT CCC ATG C 3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца huIgG2 без лизина на карбоксильном конце, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI (5' AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAA CCC GGA GAC AGG GAG 3'). В результате ПЦР 15 получили продукт размером примерно 200 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 14 и 15 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью SalI и NotI линейризованный вектор экспрессии млекопитающих рТТ15d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C73513: рТТ15d:VK1O2O12::[hu anti-<huCB1> 10D10.1 (K420D,K437D)(huIgG2-TO desK) VH].

SEQ ID NO: 11 конструировали следующим образом. ПЦР 16: 5'-праймер для ПЦР, кодирующий аминоконец варибельной области и сайт рестрикции BssHII (5'-TTT TTT TTG CGC GCT GTG ATA TTG TGA TGA CTC AGT C), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец варибельной области и сайт рестрикции BsiWI (5'-AAA AAA CGT ACG TTT GAT TTC C AC CTT GGT CC). Продукт ПЦР 16 очищали на колонке Qiagen. Затем фрагмент расщепляли с помощью BssHII и BsiWI и очищали на колонке Qiagen. Затем фрагмент смешивали и лигировали в расщепленный с помощью BTHI и BsiWI линейризованный вектор экспрессии млекопитающих рТТ5-del-Bsm-BI, содержащий сигнальный пептид и константную область каппа-цепи. Полученную конструкцию назвали C59474: рТТ5-del-Bsm-BI:VK1O2O12::[hu anti-<huCB1> 10D10.1 VL]:huKLC.

Экспрессия гомодимерного слитого белка TTR-антитело к CB1, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к CB1.

Гомодимерный белок TTR-антитело к CB1, гомотетрамерный белок TTR-антитело и гомотетрамерный белок TTR-Fab к CB1 обычно экспрессировали следующим образом.

Клетки HEK 293 6E выращивали в суспензии на шейкере с платформой в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ со скоростью вращения 120 об/мин. Средой для посева культуры клеток была FreeStyle F-17 + 0,1% (10 мл/л 10%) Kolliphog P188+500 мкл/л G418+6 мМ (30 мл/л) L-глутамин. Клетки пересевали 1-2 дня до трансфекции, так что плотность клеток при трансфекции составляла около 1,5e⁶ жизнеспособных клеток/мл. Комплекс для трансфекции смешивали в среде Freestyle F17 без добавок в объеме 10% от конечного объема культуры. 0,5 мкг ДНК добавляли в среду Freestyle F17 на мл культуры, затем добавляли 1,5 мкл реагента PEI_{max} на мл культуры. Среду затем перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли к культуре клеток и возвращали колбу на шейкер с платформой в инкубатор. Через 1-4 часа после трансфекции добавляли 25 мкл раствора дрожжевого экстракта на мл культуры. Кондиционированную среду собирали на 6 день после трансфекции.

Freestyle F-17 (№ по кат. 13835), L-глутамин (№ по кат. 25030), Geneticin G418 (№ по кат. 10131027, жидкость) получали от Life Technologies. Kolliphog P 188 (№ по кат. K4894) получали от Sigma-Aldrich. Difco TC Yeastolate UF (№ по кат. 292805) получали от BD Biosciences. PEI Max (№ по кат. 24765-2) получали от Polysciences.

В гелях, показанных на фиг. 2а, 2б и 2с, 10 мкл образца (не нагретого) загружали на каждую дорожку 4-20% SDS-PAGE и проявляли с помощью системы красителей на основе кумасси синего. Фиг. 2а и 2б демонстрируют, что гомодимерный белок TTR-антитело к CB1 и гомотетрамерный белок TTR-антитело к CB1, соответственно, устойчиво экспрессируются в клетках FIEK 293. На фиг. 2а продемонстрировано, что гомодимеры TTR-антитело к CB1 ([SEQ ID NO: 5]₂-[SEQ ID NO: 1]₄ и [[SEQ ID NO: 5]-[(GGGGGS)₁₋₄]]₂-[SEQ ID NO: 1]₄) устойчивы к денатурации с помощью SDS и поэтому образуют сильный нековалентный комплекс. Линкеры различной длины (от самого короткого ([GGGGGS]₁) на дорожке 2 до самого длинного ([GGGGGS]₄) на дорожке 5); длина линкера не оказала существенного влияния на экспрессию. На фиг. 2б продемонстрировано, что образование гомотетрамера TTR-антитело к CB1 с использованием мутаций замены пар заряженных аминокислот V1 Fc (K409D и K392D в одной тяжелой цепи и D399K и E356K) (SEQ ID NO: 6 и 7), также, по-видимому, устойчиво к SDS. Показаны различные соотношения трансфекции ДНК тяжелой цепи и легкой цепи (от 1:9 LC:HC на дорожке 2 до 9:1 LC:HC на дорожке 10). Соотношения LC:HC 1:1 (дорожка 6) и 9:1 (дорожка 10) приводят к наиболее устойчивой экспрессии.

На фиг. 2с продемонстрировано, что гомотетрамерные конструкции TTR-Fab к CB1 устойчиво экспрессируются в клетках НЕК 293 и являются устойчивыми к SDS. Слияние с TTR лучше переносилось на С-конце тяжелой цепи (дорожки 2, 4, 6 и 8 - меньше полос), по сравнению с С-концом легкой цепи (дорожки 3, 5, 7 и 9 - больше полос). Расположение His-метки, по-видимому, не влияло на слияния. Тяжелая цепь-TTR, используемая на дорожках 2 и 4, представляет собой [SEQ ID NO: 44]₄-[SEQ ID NO: 1]₄, а легкая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11. Тяжелая цепь, используемая на дорожках 3 и 5, представляет собой SEQ ID NO: 44, а легкая цепь-TTR представляет собой SEQ ID NO: 11]₄-[SEQ ID NO: 1]₄. Тяжелая цепь-TTR, используемая на дорожках 6 и 8, представляет собой [SEQ ID NO: 45]₄-[SEQ ID NO: 1]₄, а легкая цепь представляет собой SEQ ID NO: 46. Тяжелая цепь, используемая на дорожках 7 и 9, представляет собой SEQ ID NO: 45, а легкая цепь-TTR представляет собой SEQ ID NO: 46]₄-[SEQ ID NO: 1]₄. Мутации замены пар заряженных аминокислот были включены в гомотетрамерные конструкции TTR-Fab к CB1, протестированные на дорожках 6-9 (тяжелая цепь под SEQ ID NO: 45, и легкая цепь под SEQ ID NO: 46). SEQ ID NO: 45 содержит мутацию замены пар заряженных аминокислот S215E, и SEQ ID NO: 46 содержит мутацию замены пар заряженных аминокислот S203K. Также использовали His-метки (см. фиг. 2с).

Очистка гомотетрамерных слитых белков TTR-Fab к CB1.

Гомотетрамерные белки TTR-Fab к CB1 обычно очищали следующим образом.

Среду для культивирования клеток подвергали диализу против 2 л 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM имидазола, pH 8,0 в течение минимум 2 часов дважды с использованием 10 кДа MWCO Slide-a-Lyzer (Thermo Fisher Scientific). Молекулы очищали от среды для культивирования клеток с замененным буфером с применением системы для тандемной жидкостной хроматографии АКТА Purifier (GE Healthcare Life Sciences) с картриджем объемом 1 мл Ni-NTA Superflow (Qiagen, Хильден, Германия) в качестве первой колонки и 5 мл обессоливающей HiTrap (GE Healthcare Life Sciences) в качестве второй колонки. Среды загружали непосредственно на колонку Ni-NTA, промывали с помощью 8 CV 50 mM Na-фосфата, 300 mM NaCl, 10 mM имидазола, pH 8,0 и элюировали с помощью 2 CV 50 mM Na-фосфата, 300 mM NaCl, 250 mM имидазола, pH 8,0. Элюат из колонки Ni-NTA автоматически направлялся в обессоливающую колонку, в которой белок элюировали изократически с помощью 4 CV 10 mM ацетата Na, 150 mM NaCl, pH 5,2.

Образцы подвергали стерилизующей фильтрации через 3,0 мкм стекловолокно/0,2 мкм мембрану Supor (Pall Corporation, Порт-Вашингтон, Нью-Йорк, США).

Концентрацию белка для каждой очищенной молекулы определяли с помощью УФ-поглощения при 280 нм (A₂₈₀) с применением NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США). Анализ SDS-PAGE проводили на 3 мкг каждой конечной очищенной молекулы на денатурирующем невосстанавливающем 4-12% Bis-Tris NuPAGE геле с использованием подвижного буфера MES (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) согласно инструкциям производителя. Анализ методом эксклюзионной хроматографии по размеру HPLC проводили на 20 мкг каждой конечной очищенной молекулы, которую прогоняли на колонке Phenomenex SEC 3000, 7,8±300 мм (Phenomenex, Торранс, Калифорния, США) в 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM NaCl, pH 6,9 при 1 мл/мин, наблюдая поглощение при 280 нм.

Очистка гомодимерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к CB1.

Гомодимерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело к CB1 обычно очищали следующим образом.

Слитые белки первоначально очищали от среды для культивирования клеток с применением системы для тандемной жидкостной хроматографии АКТА Purifier (GE Healthcare Life Sciences, Литл-Чалфонт, Бакингемшир, Великобритания) с 1 мл MabSelect SuRe (MSS) HiTrap (GE Healthcare Life Sciences) в качестве первой колонки и 5 мл обессоливающей HiTrap (GE Healthcare Life Sciences) в качестве второй колонки. Среду загружали непосредственно на колонку MSS, промывали с помощью 8 объемов колонки (CV) 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4 и элюировали с помощью 2 CV 100 mM уксусной кислоты. Элюат из колонки MSS автоматически направлялся в обессоливающую колонку, в которой белок элюировали изократически с помощью 4 CV 10 mM ацетата Na, 150 mM NaCl, pH 5,2. Образцы подвергали стерилизующей фильтрации через 3,0 мкм стекловолокно/0,2 мкм мембрану Supor (Pall Corporation, Порт-Вашингтон, Нью-Йорк, США). Концентрацию белка для каждой очищенной молекулы определяли с помощью УФ-поглощения при 280 нм (A₂₈₀) с применением NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США). Анализ SDS-PAGE проводили на 3 мкг каждой конечной очищенной молекулы, которую прогоняли на денатурирующем невосстанавливающем 4-12% Bis-Tris NuPAGE геле с использованием подвижного буфера MES (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) согласно инструкциям производителя. Анализ методом эксклюзионной хроматографии по размеру HPLC проводили на 30 мкг каждой конечной очищенной молекулы, которую прогоняли на колонке Phenomenex SEC 3000, 7,8×300 мм (Phenomenex, Торранс, Калифорния, США) в 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM NaCl, pH 6,9 при 1 мл/мин, наблюдая поглощение при 280 нм. На фиг. 3 показан иллюстративный анализ посредством HPLC SEC гомодимерного слитого белка TTR-антитело к CB1 без линкера, с линкером (G₄S),

линкером (G₄S)₂, линкером (G₄S)₃ или линкером (G₄S)₄.

Пример 3. Активность гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к CB1.

Активность гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к CB1 определяли с помощью анализа с АМР СВ 1.

Клетки CHO, стабильно экспрессирующие hCB1 (Euroscreen), выращивали в DMEM, содержащей 10% FBS, 1% Pen/Strep/L-глутамин, 25 мМ Hepes, 0,1 мМ NEAA, 1 мМ пирувата натрия и 400 мкг/мл G418. Для определения активности антител клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 10000 клеток на лунку в 80 мкл DMEM, содержащей 0,5% FBS, 1% Pen/Strep/L-глутамин, 25 мМ Hepes, 0,1 мМ NEAA, 1 мМ пирувата натрия и 400 мкг/мл G418. После инкубации в течение ночи среду удаляли и заменяли 5 мкл свежей среды, а затем 5 мкл среды с 15 мкМ форсколина (EMD Chemicals № по кат. 344273) и 250 пМ CP55,940 (TOCRIS № по кат. 0949), а затем 40 мкл антитела в 10 мМ уксусной кислоте, 150 мМ NaCl, pH 5,0. Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Затем среду аспирировали и измеряли уровни сAMP с использованием набора для анализа сAMP DiscoverX XS+ (90-0075-03) в соответствии с протоколом производителя. Планшеты считывали в течение 30 секунд на устройстве для визуализации микропланшетов PerkinElmer ViewLux.

Результаты этого анализа представлены на фиг. 4. Гомотетрамер TTR-антитело имеет в 3,9 раза более благоприятное значение EC₅₀, чем исходное антитело к CB1. Некоторые Fab использовали мутации замены пар заряженных аминокислот, а другие нет (см. обсуждение фиг. 2 в примере 2). Эти результаты показывают, что гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab улучшают EC₅₀ по сравнению с исходным CB1 Ab. Интересно, что гомодимер TTR-антитело к CB1, по-видимому, имеет менее благоприятное значение EC₅₀, чем исходное антитело к CB1, с ухудшением EC₅₀ по мере увеличения длины линкера.

Пример 4. Клонирование, экспрессия и очистка гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR.

Клонирование гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR.

Гомодимерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело к GITR обычно клонировали следующим образом. Конструкции C74201 (pSLX240p:Native::[hu anti-<huGITR> 9H6 (D72(62)E) VH]::huIgGlz-N297G); C143046 (pTT5d:VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 (S183E, N297G, E356K, D399K) VH]::TTR(C10A, K15A)); C143048(pTT5d:VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 (S183K, N297G, K392D, K409D) VH]::TTR(C10A, K15A)); C137324(VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 VL]) и C73877(pTT5:Native::[hu anti-<huGITR> 9H6 VL]::huKLC) использовали в качестве матриц для всех конструкций, описанных ниже.

[SEQ ID NO: 18]₂-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 17: с использованием C74201 в качестве матрицы сигнальный пептид MAb 9H6 к GITR (с N297G) заменили сигнальным пептидом VK1 (MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC) с помощью трехступенчатой перекрывающейся элонгации посредством ПЦР и так, что продукт этой конечной ПЦР затем амплифицировали с использованием 5'-праймера сигнального пептида (5'-GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG CT-3') и 3'-праймера C-конца тяжелой цепи/N-конца TTR (GGT GCC CGT AGG GCC ACC CGG AGA CAG GGA GAG G) для получения продукта размером 1450 пар оснований. ПЦР 18: с использованием TTR (SEQ ID NO: 1) в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего аминоконец TTR (5'-GGC CCT ACG GGC ACC G-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI, (5'-TCG CTA GCG CGG CCG CTC ATT CCT TGG GAT TGG TGA CG-3'). В результате ПЦР 18 получили продукт размером примерно 400 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 17 и 18 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью Sall и NotI линейризованный вектор экспрессии млекопитающих pTT5d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C143043: pTT5d:VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 (N297G) VH]::TTR(C10A, K15A).

[SEQ ID NO: 21]₄-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 19: с использованием C74201 в качестве матрицы, сигнальный пептид MAb 9H6 к GITR (C74201) заменили сигнальным пептидом VK1 (MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC) с помощью трехступенчатой перекрывающейся элонгации посредством ПЦР и так, что продукт этой конечной ПЦР затем амплифицировали с использованием 5'-праймера сигнального пептида (5'-GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG CT-3') и 3'-праймера C-конца тяжелой цепи/N-конца TTR (5'-GCT CTC GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA CTG TAG G-3') для получения продукта размером 650 пар оснований. ПЦР 20: с использованием C74201 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего карбоксильный конец константной области тяжелой цепи человека (5'-CTC TAC TCC CTC GAG AGC GTG GTG ACC GTG CC-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим константную область тяжелой цепи человека (5'-CCT CCT CCA CAA GAT TTG GGC TCA ACT TTC TTG TC-3'). В результате ПЦР 20 получили продукт размером примерно 130 пар оснований. ПЦР 21: с использованием TTR3 в качестве матрицы, 5'-

праймера для ПЦР, кодирующего аминоконец TTR (5'-CAA ATC TTG TGG AGG AGG CCC TAC GGG CAC CG-3'), в комбинации с двумя 3'-праймерами, кодирующими область карбоксильного конца TTR, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI, (5'-ATG GTG ATG GTG ACC GCC TTC CTT GGG ATT GGT GAC GAC A-3') и (5'-ATC GCT AGC GCG GCC GCC TAG TGG TGA TGG TGA TGG TGA CC-3'). В результате ПЦР 21 получили продукт размером примерно 450 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 19, 20 и 21 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью SalI и NotI линейаризованный вектор экспрессии млекопитающих рТТ5d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C144132: рТТ5d:VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 (1S83E) scFab]::TTR(C10A, K15A)::G::G::6xHis (Следует отметить, что (His)₆-метку включили в целях очистки).

[SEQ ID NO: 19]₄-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 22: с использованием C74201 в качестве матрицы, сигнальный пептид MAb 9H6 к GITR (C74201) заменили сигнальным пептидом VK1 (MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC) с помощью трехступенчатой перекрывающейся элонгации посредством ПЦР и так, что продукт этой конечной ПЦР затем амплифицировали с использованием 5'-праймера сигнального пептида (5'-GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG CT-3') и 3'-праймера С-конца тяжелой цепи/N-конца TTR (5'-TAG GTG CTT CCG TAC TGT TCC TCC CGG GGC TT-3') для получения продукта размером 990 пар оснований. ПЦР 23: с использованием C143046 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3) (5'-CCT GAG CAG CGT CGT CAC CGT CCC-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3) (5'-TAG GTG CTT CCG TAC TGT TCC TCC CGG GGC TT-3'). В результате ПЦР 23 получили продукт размером примерно 370 пар оснований. ПЦР24: с использованием TTR3 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего область карбоксильного конца TTR (5'-CAG TAC GGA AGC ACC TAC CGG GTG GTG TC-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI, (5'-TCG CTA GCG CGG CCG CTC ATT CCT TGG GAT TGG TGA CG-3'). В результате ПЦР 24 получили продукт размером примерно 900 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 22, 23 и 24 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью SalI и NotI линейаризованный вектор экспрессии млекопитающих рТТ5d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C144127: рТТ5d:VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 (N297G, E356K, D399K) VH]::TTR(C10A, K15A).

SEQ ID NO: 20 собирали следующим образом. ПЦР 25: с использованием C143048 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего аминоконец сигнального пептида (5'-GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG CT), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3) (5'-ACG GTG ACG ACG CTG CTC AGG CTG TAC AGG CCG CTG-3'). В результате ПЦР 25 получили продукт размером примерно 650 пар оснований. ПЦР 26: с использованием C143048 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3) (5'-CCT GAG CAG CGT CGT CAC CGT CCC-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области тяжелой цепи человека (CH3) (5'-TAG GTG CTT CCG TAC TGT TCC TCC CGG GGC TT-3'). В результате ПЦР 26 получили продукт размером примерно 370 пар оснований. ПЦР 27: с использованием TTR3 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего область карбоксильного конца TTR (5'-CAG TAC GGA AGC ACC TAC CGG GTG GTG TC-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим область карбоксильного конца TTR, терминирующий кодон и сайт рестрикции NotI (5'-TCG CTA GCG CGG CCG CTC ATT CCT TGG GAT TGG TGA CG-3'). В результате ПЦР 27 получили продукт размером примерно 900 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 25, 26 и 27 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью SalI и NotI линейаризованный вектор экспрессии млекопитающих рТТ5d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C144130: рТТ5d:VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 (N297G, K392D, K409D) VH].

SEQ ID NO: 25 собирали следующим образом. ПЦР 28: с использованием C137324 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего аминоконец сигнальной последовательности (5'-GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG CT), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области легкой цепи человека (5'-TAT CGC TAG CGC GGC CGC-3'). В результате ПЦР 28 получили продукт размером примерно 800 пар оснований. Продукт ПЦР 28 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Данный фрагмент затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью SalI и NotI линейаризованный вектор экспрессии млекопитающих рТТ5d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C143044: рТТ5d:VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 VL].

SEQ ID NO: 26 собирали следующим образом. ПЦР 29: с использованием C137324 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего аминоконец сигнальной последовательности (5'-GTC GAC TAG GCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG CT), в комбинации с 3'-

праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области легкой цепи человека (5'-TGG TGC AGC CAC CGT ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CC-3'). В результате ПЦР 29 получили продукт размером примерно 400 пар оснований. ПЦР 30: с использованием C73877 в качестве матрицы, 5'-праймеров для ПЦР, кодирующих карбоксильный конец константой области легкой цепи человека (5'-ACG GTG GCT GCA CCA TCT G-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константой области легкой цепи человека (5'-TAT CGC TAG CGC GGC CGC-3'). Продукты реакций ПЦР 29 и 30 выделяли из геля и очищали на колонке Qiagen. Данный фрагмент затем смешивали и лигировали в расщепленный с помощью Sall и NotI линейаризованный вектор экспрессии млекопитающих pTT5d с использованием набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly. Полученную конструкцию назвали C143049: pTT5d:VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 (S176K) VL].

Экспрессия гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR.

Гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к GITR обычно экспрессировали следующим образом.

Freestyle F-17 (№ по кат. 13835), L-глутамин (№ по кат. 25030), Geneticin G418 (№ по кат. 10131027, жидкость) получали от Life Technologies. Kolliphor P 188 (№ по кат. K4894) получали от Sigma-Aldrich. Difco TC Yeastolate UF (№ по кат. 292805) получали от BD Biosciences. PEI Max (№ по кат. 24765-2) получали от Polysciences. Клетки HEK 293 6E выращивали в суспензии на шейкере с платформой в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ со скоростью вращения 120 об/мин. Средой для пересева культуры клеток была FreeStyle F-17+0,1% (10 мл/л 10%) Kolliphor P188+500 мкл/л G418+6 мМ (30 мл/л) L-глутамин. Клетки пересевали за 1-2 дня до трансфекции, так что плотность клеток при трансфекции составляла около 1,5e⁶ жизнеспособных клеток/мл. Комплекс для трансфекции смешивали в среде FreeStyle F17 без добавок в объеме 10% от конечного объема культуры. 0,5 мкг ДНК добавляли в среду FreeStyle F17 на мл культуры, затем добавляли 1,5 мкл реагента PEI max на мл культуры. Культуру перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем добавляли к культуре клеток. Затем культуральную колбу возвращали на шейкер с платформой в инкубатор. Через 1-4 часа после трансфекции добавляли 25 мкл раствора дрожжевого экстракта на мл культуры. Затем кондиционированную среду собирали на 6 день после трансфекции.

Гомодимер TTR-антитело к GITR альтернативно экспрессировали следующим образом. Клетки HEK 293 временно трансфицировали соответствующими cDNA. Суспензию клеток HEK 293-6E при 1,0×10⁶ клеток/мл трансфицировали посредством 0,5 мг/л ДНК (0,25 мг/л hu anti-<huGITR> 9H6 (N297G) VH)::TTR(C10A, K15A) в векторе pTT5d и 0,25 мг/л hu anti-<huGITR> 9H6 VL в векторе pTT5d) (Durocher et al. NRCC, Nucleic Acids. Res. (2002) 30, e9) с помощью 4 мг PEI (Polysciences) на 1 мг ДНК в среде FreeStyle F17 (Life Technologies) и инкубировали во встряхиваемой колбе при 150 об/мин при 36°C. Дрожжевой экстракт (BD Biosciences) для конечной 0,5% трансфекции добавляли в культуры через 4 часа после трансфекции. Клетки выращивали в суспензии в среде FreeStyle F17 с добавлением 0,1% Pluronic F68 и 50 мкг/мл генетина в течение 6 дней и собирали для очистки.

Кондиционированные среды анализировали с использованием 4-20% геля SDS-PAGE и красителя Quick Blue. На фиг. 5 показано, что гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антител и гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к GITR могут экспрессироваться в клетках HEK 293. Экспрессия была наиболее устойчивой для гомотетрамера TTR-антитело и гомотетрамера TTR-Fab к GITR. Дорожка 1 представляет собой 10,3 мг гомодимера TTR-антитело к GITR (356 кДа); дорожка 2 представляет собой 29,3 мг гомотетрамера TTR-антитело к GITR (656 кДа); дорожка 3 представляет собой 143,6 мг гомотетрамера TTR-Fab к GITR (256 кДа); дорожка 4 представляет собой 100 нг антитела к DNP; дорожка 5 представляет собой 250 нг антитела к DNP; дорожка 6 представляет собой 500 нг антитела к DNP; и дорожка 7 представляет собой 1000 нг антитела к DNP. Антитела к DNP предоставляют информацию о том, как неконъюгированное антитело будет показывать себя в этом анализе. 10 мкл белка в невозстанавливаемом загрузочном буфере добавляли к каждой дорожке. Гели прогоняли без нагрева.

Очистка и характеристика гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR.

Гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к GITR обычно очищали и характеризовали следующим образом.

Гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело к GITR очищали от среды для культивирования клеток с использованием системы жидкостной хроматографии AKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences) с двумя последовательно соединенными колонками rProtein A Sepharose Fast Flow (ProA FF) HiTrap (GE Healthcare Life Science) объемом 1 мл. Среду загружали непосредственно на колонки ProA FF, промывали с помощью 5 CV фосфатно-солевого буферного раствора Дульбекко (DPBS) (Life Technologies) и элюировали с помощью 8 CV 100 мМ уксусной кислоты. Очищенные образцы подвергали диализу против 2 л 10 мМ ацетата Na, 9% сахарозы, pH 5,2 дважды с использованием 10 кДа MWCO Slide-a-lyzers (Thermo Fisher Scientific).

Гомотетрамерные слитые белки TTR-Fab очищали от среды для культивирования клеток, используя систему жидкостной хроматографии АКТА Purifier с колонкой HisTrap excel HiTrap (GE Healthcare Life Sciences) объемом 5 мл. Среду загружали непосредственно на колонку HisTrap, затем промывали с помощью 20 CV 20 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl, 10 mM имидазола, pH 7,4 и элюировали с помощью 20 CV градиента имидазола от 10 mM до 500 mM. Повторную очистку проточной фракции проводили в тех же вышеупомянутых условиях, за исключением того, что использовали ступенчатое элюирование с помощью 8 CV 20 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl, 500 mM имидазола, pH 7,4 вместо градиентного элюирования из-за отсутствия хроматографического разделения в предыдущем методе. Очищенные образцы подвергали диализу против 2 л 10 mM ацетата Na, 9% сахарозы, pH 5,2 дважды с использованием 10 кДа MWCO Slide-a-lyzers.

Концентрацию гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR определяли по УФ-поглощению при 280 нм (A280) с использованием NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США).

Анализ SDS-PAGE (проведенный на 3 мкг каждом из гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR) проводили на денатурирующем невосстанавливающем 4-12% Bis-Tris NuPAGE геле с использованием подвижного буфера MES (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) согласно инструкциям производителя. См. фиг. 6. Дорожки 1 и 4 представляют собой гомодимер TTR-антитело к GITR; дорожки 2 и 5 представляют собой гомотетрамер TTR-антитело к GITR; дорожки 3 и 6 представляют собой гомотетрамер TTR-Fab к GITR. На фиг. 6 продемонстрировано, что частично очищенные продукты для всех трех конструкций слитых белков правильно собираются, исходя из дорожек в ненагреваемых, невосстанавливающих условиях. При нагревании и восстановлении три конструкции слитых белков распадаются на их ожидаемые составляющие цепи (верхние полосы представляют собой тяжелые цепи, а самая нижняя полоса представляет собой легкую цепь).

Анализ методом эксклюзионной хроматографии по размеру HPLC проводили на 30 мкг каждого из гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к GITR. В хроматографии использовали колонку Phenomenex SEC 3000, 7,8×300 мм (Phenomenex, Торранс, Калифорния, США) в 50 mM NaH_2PO_4 , 250 mM NaCl, pH 6,9 при 1 мл/мин, наблюдая поглощение при 280 нм.

Гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к GITR анализировали с помощью анализа LCMS в восстанавливающих условиях. 20 мкг материала денатурировали в 8 M гуанидин-HCl/TRIS, pH 8,0 (Teknova, Холлистер, Калифорния), и восстанавливали с помощью 10 mM DTT (EMD Millipore, Дармштадт, Германия) при 50°C в течение 20 минут. Образцы подкисляли трифторуксусной кислотой и вводили 10 мкг в колонку с обращенной фазой C8 Zorbax с использованием Agilent 1260 HPLC (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния). Элюат колонки вводили в источник электрораспыления масс-спектрометра Agilent 6230 ESI-TOF (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния) и получали масс-спектры. Релевантные спектры подвергали деконволюции с применением алгоритма MaxEnt в рамках пакета программного обеспечения Agilent MassHunter. Полученные масс-спектры для LC и HС сравнивали с теоретически рассчитанными массами для каждой цепи.

Очищенный гомодимер TTR-антитело к GITR дополнительно очищали (для удаления агрегатов, которые накапливались с течением времени) на 320 мл Superdex 200 (GE Healthcare Life Science) изократически посредством 1,4 CV 10 mM ацетата Na, 150 mM NaCl, pH 5,0. Фракции отбирали для объединения по чистоте HPLC-SEC. Пулы Superdex концентрировали с использованием центрифужных фильтровальных установок VivaSpin 10 кДа MWCO (Sartorius), а затем подвергали стерилизующей фильтрации через шприцевые фильтры 0,2 мкм Supor (Pall). Анализ методом эксклюзионной хроматографии по размеру HPLC проводили на колонке Sepax Zenix-C, 7,8×300 мм (Sepax, Ньюарк, Делавэр, США) в 50 mM NaH_2PO_4 , 250 mM NaCl, pH 6,9 при 1 мл/мин, наблюдая поглощение при 280 нм.

На фиг. 7 показаны результаты анализа методом эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC) HPLC каждого из гомодимерного слитого белка TTR-антитело (средний пик), гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело (левый пик) и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab (правый пик) к GITR. Хроматограммы SEC демонстрируют, что основной пик элюируется в ожидаемом положении в соответствии с правильно собранными молекулами. Более того, неденатурирующая очистка посредством SEC (в отличие от SDS-PAGE) подтверждает мнение, что слитые белки не агрегированы.

Был проведен повторный анализ посредством LCMS в восстанавливающих условиях повторно очищенного гомодимера TTR-антитело к GITR. Приблизительно 10 мкг гомодимера TTR-антитело к GITR высушивали в Speed-Vac, затем ресуспендировали в 20 мкл раствора 8M Gu-HCl, pH 8,0 с 20 mM DTT. Образец инкубировали при 37°C в течение 1 часа для восстановления каждого образца на отдельные компоненты белковой цепи. Затем каждый восстановленный образец подкисляли с помощью добавления 0,1% TFA. Для LC-MS приблизительно 5 мкг восстановленного образца вводили в капиллярную HPLC Agilent Technologies 1100, распыляя в масс-спектрометр Agilent Technologies 6224 ESI-TOF. В ка-

пилярной HPLC использовали колонку Agilent Zorbax 300SBC8 1,0 мм×50 мм со скоростью потока 50 мкл/мин и температурой колонки 75°C. В HPLC использовали следующие буферы: буфер А - 0,1% TFA/H₂O; буфер В - 0,1% TFA/H₂O/90% н-пропанол. Градиент состоял из исходных условий при 2% В в течение 5 минут, повышения до 45% В в течение 20 минут, до 95% В в течение 3 минут, изократического режима при 95% В в течение 4 минут и затем снижения обратно до 2% В в течение 1 минуты. Метод MS для устройства ESI-TOF сканировал массу/заряд [750-6000] со скоростью 1 спектр/секунду. Другие инструментальные параметры MS включают капиллярное напряжение (V_{Cap})=3200 В, напряжение фрагментатора=225 В, скиммер=60 В и ОСТ 1 RF V_{pp}=800 В. Для анализа данных LC-MS соответствующие спектры LCMS для каждой белковой цепи объединяли и подвергали деконволюции с использованием программного обеспечения Agilent MassHunter. Диапазон выходной массы после деконволюции составлял [15000-75000] с шагом по массе 1,0 Да и пороговым значением сигнал/шум (S/N) 30,0. Правильные восстановленные массы цепей наблюдали для каждого образца. В тяжелой цепи гомодимера TTR-антитело к G1TR наблюдали расщепление Asp-Pro в результате использования аналитической температуры 75°C.

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) слитого белка TTR-исходное mAb 9H6 к G1TR ("1"), гомодимерного слитого белка TTR-антитело ("4"), гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело ("2") и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab ("3") к G1TR проводили на Malvern MicroCal VP-Capillary DSC. См. фиг. 8. Использовали следующие параметры: диапазон сканирования: 10-100°C; скорость сканирования: 1°C/мин; термостат до сканирования 15 мин. Обычно для каждого анализа расходуется 400 мкл 1 мг/мл образца. Данные обрабатываются в программном обеспечении Origin 7. Анализируемые белки экспрессировали в клетках HEK 293-6E. Хотя исходное Ab ("1") является гликозилированным, продукты слияния на основе TTR представляют собой негликозилированные варианты N297G. Результаты на фиг. 8 демонстрируют, что температуры плавления слитых белков на основе TTR сопоставимы или лучше, чем у исходного Ab, указывая на то, что образованные слитые белки на основе TTR являются устойчивыми. Ожидаемый порядок перехода, вызванный нагреванием, был CH₂, Fab, CH₃.

Пример 5. Активность и РК-профиль гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к G1TR.

Оценивали активность и РК-профиль исходного mAb к G1TR, гомодимерного слитого белка TTR-антитело к G1TR, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к G1TR и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к G1TR.

Оценка активности.

Активность связывания и специфическую активность исходного mAb к G1TR, гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к G1TR оценивали с помощью следующих анализов. Результаты этих анализов показаны на фиг. 10.

Анализ с перекрестным связыванием 96-луночные планшеты с высокой степенью связывания (Corning 3369) покрывали в течение ночи при 4°C Ab к CD3 (OKT3) и сшивающим Ab (либо перекрестно адсорбированным козьим Ab к Fc IgG человека (Thermo Scientific 31125), либо козьим антителом к IgG (H+L) человека (Pierce 31119)) в концентрации 1 и 0,3 мкг/мл соответственно. На следующий день Ab вымывали и в планшеты для захвата в течение 1 часа при 37°C добавляли mAb к G1TR, гомодимерный слитый белок TTR-антитело к G1TR, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело к G1TR, гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к G1TR или mAb изотипического контроля. После инкубации планшеты промывали и в лунки добавляли интактные Т-клетки (50К/лунка в RPMI1640 с добавлением 10%FBS, 2 mM L-Glut, 10 mM HEPES, 1 mM NaPyг, 0,1 mM NEAA и 50 мкМ 2ME) и культивировали в течение 4 дней. Пролиферацию измеряли с использованием CellTiterGlo (Promega).

Анализ без перекрестного связывания. 96-луночные планшеты с высокой степенью связывания (Corning 3369) покрывали в течение ночи при 4°C Ab к CD3 при 1 мкг/мл. На следующий день Ab к CD3 вымывали и в планшеты добавляли mAb к G1TR, гомодимерный слитый белок TTR-антитело к G1TR, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело к G1TR, гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к G1TR или mAb изотипического контроля, после чего добавляли интактные Т-клетки (50К/лунка в RPMI1640 с добавлением 10% FBS, 2 mM L-Glut, 10 mM HEPES, 1 mM NaPyг, 0,1 mM NEAA и 50 мкМ 2ME). Через 4 дня пролиферацию культуры измеряли с использованием CellTiterGlo (Promega).

Оценка РК-профиля.

РК-профили определяли с помощью внутривенной инъекцией самцам мышей CD-1 (n=3 на группу) молярного эквивалента, нормализованного при 8,75 мг/кг гомотетрамера TTR-антитело к G1TR, 4,75 мг/кг гомодимера TTR-антитело к G1TR, 3,4 мг/кг гомотетрамера TTR-Fab к G1TR и 2 мг/кг для антитела к G1TR. Образцы сыворотки крови собирали из 75 мкл образцов крови, взятых через 0,5, 2, 8, 24, 48, 72, 96, 168, 336, 504, 672 и 840 часов после введения дозы. Каждый образец крови после сбора выдерживали при комнатной температуре, и после 30-40-минутного периода свертывания образцы центрифугировали при 2-8°C при 11500 об/мин в течение приблизительно 10 минут с использованием откалиброванной центрифужной системы Eppendorf 5417R (Brinkmann Instruments, Inc., Вестбери, Нью-Йорк). Собранную

сыворотку крови затем переносили в предварительно помеченную (для каждой крысы) пробирку для криогенного хранения и хранили при температуре от -60°C до -80°C для будущего биоанализа.

Следующий анализ РК использовали для измерения общего количества видов, связывающих G1TR (т.е. любых присутствующих видов, связывающих G1TR), среди исходного mAb к G1TR, гомодимерного слитого белка TTR-антитело к G1TR, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к G1TR и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к G1TR, в сыворотке крови мыши с помощью анализа Meso Scale Discovery (MSD). 96-луночный планшет MSD с обычным связыванием (Meso Scale Discovery, Гейтерсберг, Мэриленд, США) покрывали 2 мкг/мл мышинового антиидиотипического антитела к G1TR, Mab 1.2.1 (Amgen Inc., Таузанд-Окс, Калифорния, США) в PBS и затем инкубировали в течение ночи при 4°C . Затем планшет промывали и блокировали с помощью I-Block™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) в течение ночи при 4°C . Стандарты и образцы для контроля качества (QC) получали в сыворотке крови мыши, а образцы РК разводили в не подвергавшейся воздействию сыворотке крови мыши CD-1, если требовалось разбавление. Стандарты, QC и образцы затем разбавляли 1:20 в буфере, содержащем PBS, 1 M NaCl, 0,5% Tween 20 и 1% бычьего сывороточного альбумина. Планшет трижды промывали с помощью примерно 200 мкл буфера 1X KPL (Гейтерсберг, Мэриленд, США), а затем 50 мкл разведенных стандартов, QC и образцов переносили в планшет, покрытый антителом Mab 1.2.1, и инкубировали в течение 1,5 ч. при комнатной температуре (примерно 25°C). Планшет трижды промывали с помощью примерно 200 мкл промывочного буфера 1X KPL, а затем добавляли 50 мкл 250 нг/мл мышинового антиидиотипического антитела к G1TR, Mab 1.1.1, конъюгированного с биотином, и инкубировали в течение 1,5 часа. После трехкратного промывания планшета промывочным буфером 1X KPL добавляли 50 мкл 100 нг/мл стрептавидина, конъюгированного с MSD SULFO-TAG (Amgen, Inc.), и инкубировали в течение 15 мин. Планшет промывали шесть раз с помощью примерно 200 мкл промывочного буфера 1X KPL с последующим добавлением 150 мкл 1x буфера для считывания T (Meso Scale Discovery), и электрохемилюминесцентный сигнал измеряли с использованием планшет-ридера MSD 6000 (Meso Scale Discovery). Данные о концентрации в сыворотке крови были проанализированы с использованием некомпартментных методов с Phoenix® (Phoenix 64, сборка 6.4.0.768, Pharsight® Corp., Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Следующий анализ РК использовали для измерения присутствия как видов, связывающих G1TR, так и видов TTR среди гомодимерного слитого белка TTR-антитело к G1TR, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к G1TR и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к G1TR, в сыворотке крови мыши с помощью анализа MSD образцов сыворотки крови мыши. 96-луночный планшет MSD с обычным связыванием (Meso Scale Discovery, Гейтерсберг, Мэриленд, США) покрывали 2 мкг/мл кроличьего поликлонального антитела к TTR (Amgen Inc., Таузанд-Окс, Калифорния, США) в PBS и затем инкубировали в течение ночи при 4°C . Затем планшет промывали и блокировали с помощью I-Block™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) в течение ночи при 4°C . Стандарты и образцы для контроля качества (QC) получали в сыворотке крови мыши, а образцы РК разводили в не подвергавшейся воздействию сыворотке крови мыши CD-1, если требовалось разбавление. Стандарты, QC и образцы затем разбавляли 1:20 в буфере, содержащем PBS, 1 M NaCl, 0,5% Tween 20 и 1% бычьего сывороточного альбумина. Планшет трижды промывали с помощью примерно 200 мкл буфера 1X KPL (Гейтерсберг, Мэриленд, США), а затем 50 мкл разведенных стандартов, QC и образцов переносили в планшет, покрытый антителом к TTR, и инкубировали в течение 1,5 ч. при комнатной температуре. Планшет трижды промывали с помощью примерно 200 мкл промывочного буфера 1X KPL, а затем добавляли 50 мкл 250 нг/мл мышинового антиидиотипического антитела к G1TR, Mab 1.1.1, конъюгированного с биотином, и инкубировали в течение 1,5 часа. После трехкратного промывания планшета промывочным буфером 1X KPL добавляли 50 мкл 100 нг/мл стрептавидина, конъюгированного с MSD SULFO-TAG (Amgen, Inc.), и инкубировали в течение 15 мин. Планшет промывали шесть раз с помощью примерно 200 мкл промывочного буфера 1X KPL с последующим добавлением 150 мкл 1x буфера для считывания T (Meso Scale Discovery), и электрохемилюминесцентный сигнал измеряли с использованием планшет-ридера MSD 6000 (Meso Scale Discovery). Данные о концентрации в сыворотке крови были проанализированы с использованием некомпартментных методов с Phoenix® (Phoenix 64, сборка 6.4.0.768, Pharsight® Corp., Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Результаты анализа РК можно найти на фигуре 9. Как показано на фигуре 9a) (показатель наличия любых видов, связывающих G1TR): [1] РК гомодимера TTR-антитело к G1TR ("1") является более желательной, чем РК исходного Ab ("2"); [2] РК гомотетрамера TTR-Fab к G1TR ("4") является менее желательной, и это, вероятно, объясняется тем фактом, что Fab не содержит Fc-области и, следовательно, у него отсутствует способность опосредовать/продлить период его полужизни; и [3] РК гомотетрамера TTR-антитело к G1TR ("3"), хотя и не такая стойкая, как у исходного mAb, демонстрирует значительно улучшенную РК по сравнению с Fab. На фиг. 9b) (показатель наличия как видов, связывающих G1TR, так и видов TTR) продемонстрировано, что РК интактных слитых белков TTR к G1TR соответствует таковой, наблюдаемой на фигуре 9a), что указывает на то, что протеолиз *in vivo* не освобождает G1TR-связывающую часть от каждого слитого белка на основе TTR.

Как показано на фиг. 10, мультимеризация посредством продуктов слияния на основе TTR исходного mAb 9H6 к GITR улучшает связывание, но не активность. Известно, что активация GITR предотвращает подавление регуляторными Т-клетками. Также известно, что кластеризация и связывание с Fc γ R необходимы для опосредуемой антителами к GITR активации клеточной пролиферации, выработки цитокинов и индукции клеток CD4⁺ Th9. Фиг. 10a) указывает на то, что аффинность связывания гомодимерного слитого белка TTR-Fab ("3"), гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело ("4") и гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело ("2") к GITR является более желательной, чем у исходного mAb к GITR 9H6 ("1"). Примечательно, что более высокая аффинность не приводила к более высокой активности в клеточных анализах, как показано на фиг. 10b). Контрольное Ab на фигуре 10b) является контрольной версией mAb к GITR без связывания.

Сравнение данных на фигурах 9a и 9b показывает, что имеется небольшая частичная молекулярная деградация конструкций TTR.

Пример 6. Клонирование, экспрессия и очистка гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2.

Клонирование гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2.

Гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к TRAILR2 обычно клонировали следующим образом. В этих экспериментах антитело к TRAILR2 представляет собой конатумумаб (AMG 655), а Fab к TRAILR2 представляет собой часть Fab конатумумаба.

Плазмиды экспрессии GITR TTR (см. пример 4) использовали в качестве матриц для конструирования этих продуктов слияния TTR-антитело к TRAILR2. Конструкции C36606 (pTT5:Native::[hu anti-<huTRAILR2> XG1048 (W) VH]:huIgG1(f)) и C9448 (VK3_A27L::[hu anti-<huTRAILR2> XG1048 VL]:huKLC) представляли собой матрицы, используемые для последовательностей переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела к TRAILR2, соответственно. В этих экспериментах антитело к TRAILR2 представляет собой конатумумаб (AMG 655). Поскольку матрица последовательности антитела к TRAILR2 не содержала сигнального пептида VK1 (VK1O2O12), были обнаружены конструкции pSLX240puro, pSLX240hygro и pSLX240neo, которые содержат VK1 с сайтом BssHII на карбоксиконце последовательности сигнального пептида.

[SEQ ID NO: 31]₂-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 31: с использованием C36606 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего аминоконец последовательности тяжелой цепи и сигнальную последовательность VK1 (VK1O1O12) (5'-CTG CTG TGG CTG AGA GGT GCG CGC TGT CAG GTG CAG CTG CAG GAG-3'), в комбинации с 3'-праймером, предназначенным для амплификации переменной области тяжелой цепи антитела к TRAILR2 (5'-GCT GAG GAG ACG GTG ACC GT-3'). В результате ПЦР 31 получили продукт размером 395 пар оснований. ПЦР 32: с использованием C-143043 в качестве матрицы, 5'-праймера, кодирующего аминоконец константной области тяжелой цепи и последние 18 оснований переменной области тяжелой цепи антитела к TRAILR2 (5'-GGT CAC CGT CTC CTC AGC TAG CAC CAA GGG CCC A-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец TTR, терминирующий кодон, сайт NotI, и выступающей областью размером 18 оснований, кодирующей аминоконец линейризованной плазмиды pSLX240p (5'-TTA AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAT TCC TTG GGA TTG GTG ACG-3'). В результате ПЦР 32 получили продукт размером 1390 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 31 и 32 очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем объединяли с плазмидой pSLX240p:VK1, линейризованной в сайтах BssHII и NotI, в реакции независимого от лигирования клонирования (набор Genearth Seamless Cloning and Assembly). Полученную конструкцию назвали C-150225: pSLX240p:VK1O2O12::[hu anti-<huTRAILR2> AMG 655 VH]:IgG1z_SEFL(desK)::TTR(C10A,K15A).

SEQ ID NO: 38 собирали следующим образом. ПЦР 33: с использованием C9448 в качестве матрицы, 5'-праймера для ПЦР, кодирующего аминоконец переменной области легкой цепи антитела к TRAILR2 и сигнальную последовательность (5'-CTG CTG TGG CTG AGA GGT GCG CGC TGT GAA ATT GTG TTG ACG CAG-3'), в комбинации с 3'-праймером (5'-AGC CAC CGT TCG TTT GAT TTC CAC CTT-3') амплифицирует переменную область легкой цепи антитела к TRAILR2 для получения продукта размером 363 пары оснований. ПЦР 34: с использованием C-143044 (pTT5d:VK1O2O12::[hu anti-<huGITR> 9H6 VL]) в качестве матрицы, 5'-праймера, кодирующего аминоконец константной области легкой каппа-цепи и последние 9 оснований переменной области антитела к TRAILR2 (5'-ATC AAA CGA ACG GTG GCT GCA CCA TCT-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константной области легкой каппа-цепи человека, терминирующий кодон и фермент рестрикции NotI (5'-TGT TTA AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCC TAA CAC TCT CCC CTG TTG AAG-3'). Посредством ПЦР 34 получили продукт размером примерно 330 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 33 и 34 очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем объединяли с плазмидой pSLX240h:VK1, линейризованной в сайтах BssHII и NotI, в реакции независимого от лигирования клонирования (набор Genearth Seamless Cloning and Assembly). Полученная конструкция была названа C-150226: pSLX240h:VK1O2O12::[hu anti-<huTRAILR2> AMG655 VL]:huKLC.

[SEQ ID NO: 32]₄-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 31 проводили, как описано выше. ПЦР 35: с использованием C-144127 в качестве матрицы, 5'-праймера, кодирующего аминоконец константной области тяжелой цепи и последние 18 оснований вариабельной области тяжелой цепи анти-тела к TRAILR2 (5'-GGT CAC CGT CTC CTC AGC CTC CAC CAA GGG CCC C-3'), в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец

TTR (5'-TTAAACGATATCGCTAGCGCGGCCGCTCATTCCTTGGGATTGGTGACG-3'), получают продукт размером примерно 1390 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 31 и 35 очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем объединяли с плазмидой pSLX240p:VK1, линейаризованной в сайтах BssIII и NotI, в реакции независимого от лигирования клонирования (набор Genart Seamless Cloning and Assembly). Полученную конструкцию назвали C-150227: pSLX240p:VK1O2O12::[hu anti-<huTRAILR2> AMG 655VH]::IgG1z(N297G,KK)::TTR(C10A,K15A).

SEQ ID NO: 33 собирали следующим образом. ПЦР 31 проводили, как описано выше. ПЦР 36: с использованием C-144130 в качестве матрицы,

5'-праймера (5'-GGTCACCGTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCC-3') в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константной области тяжелой цепи, терминирующий кодон и сайт NotI (5'-TTA AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAA CCC GGG GAG AGG CTC A-3') привела к получению продукта размером примерно 1 т.п.о. Продукты реакций ПЦР 31 и 36 очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем объединяли с плазмидой pSLX240n:VK1, линейаризованной в сайтах BssIII и NotI, в реакции независимого от лигирования клонирования (набор Genart Seamless Cloning and Assembly). Полученную конструкцию назвали C-150228: pSLX240n:VK1O2O12::[hu anti-<huTRAILR2> AMG 655 VH]::IgG1z(N297G,DD).

[SEQ ID NO: 34]₄-[SEQ ID NO: 1]₄ собирали следующим образом. ПЦР 31 проводили, как описано выше. ПЦР 37: с использованием C144132 в качестве матрицы, 5'-праймера (5'-GGTCACCGTCTCTCTaCAGCTAGCACCAGGGCCCCA-3') в комбинации с 3'-праймером, кодирующим 6xHis, терминирующий кодон и сайт NotI (5'-TTA AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCC TAG TGG TGA TGG TGA TGG TGA CC-3') получили продукт размером примерно 740 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 31 и 37 очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем объединяли с плазмидой pSLX240p:VK1, линейаризованной в сайтах BssIII и NotI, в реакции независимого от лигирования клонирования (набор Genart Seamless Cloning and Assembly). Полученную конструкцию назвали C-150237: pSLX240p :VK1O2O12 ::[hu anti- <huTRAILR2> AMG 655 (S183E) scFab]::G2::TTR (C10A,K15A)::G2::6xHis (следует отметить, что (His)₆-метку включили в целях очистки).

SEQ ID NO: 39 собирали следующим образом. ПЦР 33 проводили, как описано выше. ПЦР 38: с использованием C-143049 в качестве матрицы, 5'-праймера (6186-65) в комбинации с 3'-праймером, кодирующим карбоксильный конец константной области легкой каппа-цепи, терминирующий кодон и сайт NotI (5'-TGT TTA AAC GAT ATC GCT AGC GCG GCC GCT CAA CAC TCT CCC CTG TTG AA-3') получили продукт размером примерно 330 пар оснований. Продукты реакций ПЦР 33 и 38 очищали на колонке Qiagen. Эти фрагменты затем объединяли с плазмидой pSLX240h:VK1, линейаризованной в сайтах BssIII и NotI, в реакции независимого от лигирования клонирования (набор Genart Seamless Cloning and Assembly). Полученную конструкцию назвали C-150238: pSLX240h:VK1O2O12::[hu anti-<huTRAILR2> AMG 655 VL]::huKLC-S176K.

Экспрессия гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2.

Гомодимерный слитый белок TTR-антитело, гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к TRAILR2 обычно экспрессировали следующим образом.

Слитые белки на основе TTR стабильно экспрессируются в приспособленных для суспензионного культивирования клетках CHO-K1. Транфекции осуществляли с применением Lipofectamine LTX (Invitrogen™) в соответствии с протоколом производителя. Всего использовали 30-36 мкг ДНК плазмиды экспрессии млекопитающих в соотношении 1:1 для гомодимера TTR-антитело и гомотетрамера TTR-Fab (1 HC или Fab-HC и 1 LC) к TRAILR2, или в соотношении 1:1:1 для гомотетрамера TTR-антитело (1 HC+ к 1 HC и 1 LC). В каждом случае плазмидную ДНК добавляли к 3-4 мл OPTI-MEM (Gibco) и перемешивали. В отдельных пробирках 72-75 мкл Lipofectamine LTX добавляли к 3-4 мл OPTI-MEM. Растворы инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Для получения комплекса для трансфекции в каждом случае смеси ДНК и липофектамина LTX объединяли и инкубировали при комнатной температуре в течение дополнительных 20 минут. Клетки CHO-K1 в log-фазе роста осаждали с помощью центрифугирования (1200-1500 об/мин в течение 5 минут), промывали один раз с помощью 1X PBS (Gibco) и ресуспендировали до 1,5-2e⁶ жизнеспособных клеток/мл в OPTI-MEM. В случае каждой трансфекции 5-6 мл промытых клеток добавляли во встряхиваемую колбу объемом 125 мл. Комплекс для трансфекции ДНК добавляли к клеткам в каждом случае. Колбы инкубировали при 36°C, 5% CO₂, со встряхиванием при 150 об/мин в течение 6 часов. Для прекращения трансфекции в каждую колбу добавляли 9-12 мл питательной среды и инкубировали в течение 48-72 часов.

Чтобы начать проведение отбора, клетки осаждали с помощью центрифугирования (1200-1500

об/мин в течение 5 минут) через 72 часа после трансфекции и среды заменяли на 23-25 мл питательных сред, дополненных антибиотиками. Среда для отбора заменяли 2-3 раза в неделю, при необходимости разбавляя культуры для обеспечения того, чтобы культуры не подверглись чрезмерному разрастанию (<5-6 е⁶ жизнеспособных клеток/мл), до восстановления жизнеспособности и плотности клеток.

Продукцию в крупных масштабах (2,3 л-2,5 л) проводили во встряхиваемых колбах при 36°C. Полученное высевали при 2е⁶ жизнеспособных клеток/мл в среды для продуцирования. Кондиционированные среды собирали в день 5 путем центрифугирования с последующей фильтрацией (0,45 мкм).

Как показано на фиг. 11, гомодимерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к TRAILR2 хорошо экспрессируются и собираются правильно (см. фиг. 11a)). На фиг. 11b) продемонстрировано, что ожидаемые компоненты слитого белка присутствуют при нагревании и восстановлении. 5 мкл кондиционированной среды загружали на каждую дорожку и прогоняли на 4-20% геле TG. Как видно на фигуре 11a), гомодимер TTR-антитело и тетрамер TTR-Fab к TRAILR2 мигрируют на SDS-PAGE в виде комплексов, больших, чем антитело, как и ожидалось для полностью собранных комплексов. Как видно на рисунке 11b), гомодимер TTR-антитело и тетрамер TTR-Fab к TRAILR2 мигрируют на восстановленном SDS-PAGE, как и ожидалось для слитых молекул с тяжелыми цепями (верхние полосы), а также со свободными легкими цепями (нижние полосы).

Как показано на рисунке 12, гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 хорошо экспрессируется (при ~150 мг/л) и правильно собирается в клетках CHO-K1 (см. фиг. 12a), верхние полосы). На фиг. 12b) показано, что гомотетрамерные комплексы распадаются на их ожидаемые компоненты при нагревании, а на фиг. 12c) показано, что гомотетрамерные комплексы распадаются на их ожидаемые компоненты при нагревании и восстановлении. 2-5 мкл кондиционированной среды загружали на каждую дорожку и прогоняли на 4-20% геле TG.

На фиг. 13 показано, что гомотетрамер TTR-Fab к TRAILR2, гомодимер TTR-антитело к TRAILR2 и гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 правильно собраны и что при нагревании и восстановлении молекулы распадаются на их ожидаемые составляющие цепи (верхняя(-ие) полоса(-ы) представляют собой тяжелые цепи, а самая нижняя полоса представляет собой легкую цепь). На фиг. 13 продемонстрировано, что конструкции TTR могут быть получены с различными антителами.

Очистка и характеристика гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2.

Гомодимерный слитый белок TTR-антитело и гомотетрамерный слитый белок TTR-антитело к TRAILR2 обычно очищали следующим образом. Молекулы очищали от среды для культивирования клеток с использованием системы жидкостной хроматографии AKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences) с двумя последовательно соединенными колонками ProA FF HiTrap (GE Healthcare Life Science) объемом 5 мл. Среду загружали непосредственно на колонки ProA FF, промывали с помощью 5 CV DPBS (Life Technologies) и элюировали с помощью 8 CV 50 mM уксусной кислоты, pH 3,2. Пулы элюирования ProA FF титровали до pH 5,0 с использованием 2 M трис-HCl, pH 9,2, затем разбавляли девятью объемами стерильной воды. Кондиционированные пулы ProA FF подвергали диализу против 2 л 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,0 дважды с использованием 10 кДа MWCO Slide-a-lyzers (Thermo Fisher Scientific). Диализированные пулы очищали на колонке SP Sepharose High Performance (SP HP) (GE Healthcare Life Science) объемом 18 мл, используя промывку с помощью 5 CV 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, и элюировали с помощью 20 CV градиента NaCl от 0 mM до 500 mM. Фракции отбирали для объединения по чистоте SDS-PAGE и HPLC-SEC. Пулы SP HP концентрировали с использованием центрифужных фильтровальных установок VivaSpin 10 кДа MWCO (Sartorius, Геттинген, Германия), а затем очищали на 320 мл Superdex 200 (GE Healthcare Life Science) изократически посредством 1,4 CV 20 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,0. Фракции отбирали для объединения по чистоте SDS-PAGE и HPLC-SEC. Пулы SP HP подвергали диализу против 2 л 10 mM MES, 150 mM NaCl, pH 7,0 дважды с использованием 10 кДа MWCO Slide-a-lyzers (Thermo Fisher Scientific). Диализированные образцы концентрировали с использованием центрифужных фильтровальных установок VivaSpin 10 кДа MWCO (Sartorius), а затем подвергали стерилизующей фильтрации через шприцевые фильтры 0,2 мкм Supor (Pall).

Гомотетрамерные слитые белки на основе Fab к TRAILR2 обычно очищали следующим образом. Молекулу очищали от среды для культивирования клеток с использованием системы жидкостной хроматографии AKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences) с колонкой Ni Sepharose excel (Ni excel) (GE Healthcare Life Sciences) объемом 50 мл. Среду загружали непосредственно на колонку HisTrap, затем промывали с помощью 10 CV 20 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 10 mM имидазола, pH 7,4 и элюировали с помощью 8 CV градиента имидазола от 10 mM до 500 mM. Пул Ni excel подвергали диализу против 2 л 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,0 дважды с использованием 10 кДа MWCO Slide-a-lyzers (Thermo Fisher Scientific). Диализированные пулы очищали на колонке SP Sepharose High Performance (SP HP) (GE Healthcare Life Science) объемом 18 мл, используя промывку с помощью 5 CV 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, и элюировали с помощью 20 CV градиента NaCl от 0 mM до 500 mM. Фракции отбирали для объединения по чистоте SDS-PAGE и HPLC-SEC. Пул SP HP подвергали диализу против 2 л 10 mM MES, 150 mM NaCl, pH 7,0 дважды с использованием 10 кДа MWCO Slide-a-lyzer (Thermo Fisher Scientific). Диализированный образец концентрировали с использованием центробежной фильтровальной установки VivaSpin 10 кДа

MWCO (Sartorius), а затем подвергали стерилизующей фильтрации через шприцевый фильтр 0,2 мкм Supor (Pall). Концентрацию белка определяли с помощью УФ-поглощения при 280 нм (A280) с применением NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США). Образцы анализировали с помощью денатурирующего невосстанавливающего 4-12% геля Bis-Tris NuPAGE с использованием подвижного буфера MES (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы анализировали на колонке Phenomenex SEC 3000, 7,8×300 мм (Phenomenex, Торранс, Калифорния, США) в 50 мМ NaH₂PO₄, 250 мМ NaCl, pH 6,9 при 1 мл/мин, наблюдая поглощение при 280 нм.

На фиг. 14 показаны результаты анализа методом эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC) HPLC каждого из гомодимерного слитого белка TTR-антитело (средняя хроматограмма), гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело (правая хроматограмма) и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab (левая хроматограмма) к TRAILR2. Хроматограммы SEC демонстрируют, что основной пик элюируется в ожидаемом положении в соответствии с правильно собранными молекулами.

Проводили анализ LC/MS восстановленных продуктов гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2. Образцы подвергали замене буфера на 200 мМ ацетата аммония и доводили до 5 мкМ в качестве конечного рабочего раствора MS для исследований нативной MS. Образцы также денатурировали в 8 М гуанидин-HCl и восстанавливали в 20 мМ DDT для анализа LC-MS. 2 мкг вещества затем вводили в систему LC-MS.

Анализ нативной MS и подвижности ионов гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2 проводили на дрейфовой трубке, ограничивающей RF, с использованием модифицированного устройства HDMS Synapt G1, которое работало в режиме положительного нанопотока ESI. Критические напряжения и давления устройства были следующими: капиллярное напряжение от 0,8 до 1,0 кВ; пробоотборный конус 40 В, экстракционный конус 1 В; температура блока источника 30°C; энергия столкновения в предколонке 4,0 В; энергия столкновения в зоне переноса ионов от 60 до 200 В, соответствующая от 3,3 В до 11,1 В/см, приложенным к дрейфовой трубке, ограничивающей RF; вход предколонки 3,0 В; отклонение предколонки 16 В (N₂; для ввода ионов в дрейфовую ячейку при работе с N₂ требуется повышенный потенциал); DC на входе в ячейку IMS 5,0 В; DC на выходе из ячейки IMS 0,0 В; DC на входе в зону переноса ионов 0,0 В; DC на выходе из зоны переноса ионов 2,0 В; скорость волны электрического поля в зоне переноса ионов 70 м/с; амплитуда волны электрического поля в зоне переноса ионов 4,0 В; скорость высвобождения из ловушки в зону разделения по подвижности 250 мкс; высота волны в предколонке 20,0 В; амплитуда волны на выходе из зоны разделения по подвижности 0,0 В; амплитуда RF источника (от пика к пику) 450 В; трехволновые RF амплитуды (от пика к пику), предколонка 380 В, IMS 150 В, зона переноса ионов 380 В; обратное давление источника 6,0 мбар; давление в предколонке/зоне переноса ионов SF₆, 3,3e⁻² мбар (указан манометр Пирани; скорость потока 3,0 мл/мин); давление IMS N₂ 2,05 мбар (1,54 мм рт.ст.; скорость потока 38 мл/мин); давление IMS He 2,70 мбар (2,03 мм рт.ст.; скорость потока 70 мл/мин). Давление в дрейфовой ячейке, ограничивающей RF было точно измерено с помощью емкостного манометра MKS Baratron, тип 626 (диапазон 10 мм рт.ст.; с точностью до 0,25%) и источника питания MKS PDR2000. Температуру окружающей среды измеряли с помощью термометра Oakton Temp 10T. Температуру измеряли в точке, где емкостный манометр был подключен к крышке ионной оптики устройства. Управление устройством и сбор данных осуществлялся с помощью MassLynx 4.1 SCN 639, SCN744. Подвижности и, следовательно, значения Ω получили путем точного измерения давления внутри устройства дрейфовой ячейки и температуры окружающей среды дрейфовой ячейки и проведения до 10 измерений подвижности при различных напряжениях дрейфовой ячейки (от 60 В до 200 В). Для каждого сбора данных провели индивидуальные измерения температуры и давления, а для окончательного расчета значения Ω использовали среднее значение температуры и давления. Типичные колебания температуры и давления в течение 10 минут составляли $\leq 0,2^\circ\text{C}$ и $\leq 0,002$ мм рт.ст.

Проводили денатурирующий анализ LC-MS гомодимерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2, путем введения 2 мкг денатурированного и восстановленного белка непосредственно в аналитическую колонку C4 VEN 2,1 ≤ 50 мм, работающую при 45°C и скорости потока 400 мкл/мин. Выявление посредством MS проводили на масс-спектрометре Waters XevoQ-ToF. Пробоотборный конус и экстракционный конус установили на 35 В и 1 В соответственно.

Результаты масс-спектрометрии и ионной подвижности: гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2: измеренная MW в нативной MS составила 645,9 кДа, измеренная подвижность ионов N₂-CCS составила 190,1 нм², и MW субъединиц в денатурирующих и восстанавливающих условиях составила 23388 Да, 49180 Да и 62872 Да. Гомотетрамерный слитый белок TTR-Fab к TRAILR2: измеренная MW в нативной MS составила 250,5 кДа, измеренная подвижность ионов N₂-CCS составила 130,3 нм², и MW субъединиц в денатурирующих и восстанавливающих условиях составила 23429 Да и 38582 Да. Гомодимерный слитый белок TTR-антитело к TRAILR2: измеренная MW в нативной MS составила 347,2 кДа, и изме-

ренная подвижность ионов N2-CCS составила 124,0 нм², и MW субъединиц в денатурирующих и восстанавливающих условиях составила 23391 Да и 62867 Да.

SEC-многоугольное рассеяние света (MALS) гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2 проводили на Agilent 1100 HPLC, оборудованном детекторами Wyatt Heleos II и OptiLab-TrEX. Используемая колонка представляла собой Superdex 200 (10/300GL). Подвижная фаза представляла собой 2X PBS со скоростью потока 0,4 мл/мин. Время прогона составляло 70 минут на образец. Объем введений для четырех SP-фракций гомодимерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2 (A3, A8, A12 и C1) составил 81, 63, 75 и 75 мкг соответственно, тогда как объем введения для конечного пула TTR-антитело к TRAILR2 составил 77 мкг. Процедуры настройки запуска, сбора данных и анализа выполнялись на программном обеспечении Agilent Chemstation (v B.04.02 96) и программном обеспечении Wyatt ASTRA (v 6.1.1.17).

Пример 7. Активность и РК-профиль гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2.

Оценивали активность и РК-профиль исходного mAb к TRAILR2 (конатумумаб), гомодимерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2 и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2.

РК-профили.

РК-профили гомодимерного слитого белка TTR-антитело, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2 определяли путем внутривенной инъекции самцу мыши CD-1 (n=3 на группу) молярного эквивалента, нормализованного при 6,5 мг/кг гомотетрамера TTR-антитело, 3,5 мг/кг гомодимера TTR-антитело, 2,5 мг/кг гомотетрамера TTR-Fab и 1,5 мг/кг антител конатумумаб и конатумумаб-341-G1 (конатумумаб-341-G1 представляет собой Ab, сконструированное таким образом, чтобы не связывать TRAILR2). Образцы сыворотки крови собирали из 75 мкл образцов крови, взятых через 0,5, 2, 8, 24, 48, 72, 96, 192, 336, 504, 672 и 840 часов после введения дозы. Каждый образец крови после сбора выдерживали при комнатной температуре, и после 30-40-минутного периода свертывания образцы центрифугировали при 2-8°C при 11500 об/мин в течение приблизительно 10 минут с использованием откалиброванной центрифужной системы Eppendorf 5417R (Brinkmann Instruments, Inc., Вестбери, Нью-Йорк). Собранную сыворотку крови затем переносили в предварительно помеченную (для каждой крысы) пробирку для криогенного хранения и хранили при температуре от -60°C до -80°C для будущего биоанализа.

Следующий анализ РК использовали для измерения общего количества видов, связывающих TRAILR2 (т.е. любых присутствующих видов, связывающих TRAILR2), среди конатумумаба, гомодимерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2 и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2, в сыворотке крови мыши с помощью анализа Meso Scale Discovery (MSD). Чтобы измерить общее количество конатумумаба в образцах сыворотки крови мыши, 96-луночный планшет MSD с обычным связыванием (Meso Scale Discovery, Гейтерсберг, Мэриленд, США) покрывали 2 мкг/мл кроличьего поликлонального антитела к конатумумабу (Amgen Inc., Таузанд-Окс, Калифорния, США) в PBS и затем инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшет промывали и блокировали с помощью I-Block™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) в течение ночи при 4°C. Стандарты и образцы для контроля качества (QC) получали в сыворотке крови мыши, а образцы РК разводили в не подвергавшейся воздействию сыворотке крови мыши CD-1, если требовалось разбавление. Стандарты, QC и образцы затем разбавляли 1:20 в буфере, содержащем PBS, 1 M NaCl, 0,5% Tween 20 и 1% бычьего сывороточного альбумина. Планшет трижды промывали с помощью примерно 200 мкл буфера 1X KPL (Гейтерсберг, Мэриленд, США), а затем 50 мкл разведенных стандартов, QC и образцов переносили в планшет, покрытый антителом к конатумумабу, и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре (примерно 25°C). Планшет промывали трижды с помощью примерно 200 мкл 1X KPL промывочного буфера, а затем добавляли 50 мкл 100 нг/мл мышинового антитела к Fc человека, клон 1.35.1, конъюгированного с MSD SULFO-TAG (Amgen Inc., Таузанд-Окс, Калифорния, США) в буфере I-Block™, содержащем 5% BSA, и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Для гомотетрамерной конструкции TTR-Fab к TRAILR2 добавляли 50 мкл 250 нг/мл мышинового антитела к каппа-LC, клон KCF-9, конъюгированного с биотином, и инкубировали в течение 1,5 часа; затем, после промывания планшета промывочным буфером 1X KPL добавляли 50 мкл 100 нг/мл стрептавидина, конъюгированного с MSD SULFO-TAG (Amgen, Inc.), и инкубировали в течение 15 мин. Планшет затем промывали шесть раз с помощью примерно 200 мкл промывочного буфера 1X KPL с последующим добавлением 150 мкл 1X буфера для считывания T (Meso Scale Discovery), и электрохемилюминесцентный сигнал измеряли с использованием планшет-ридера MSD 6000 (Meso Scale Discovery). Данные о концентрации в сыворотке крови были проанализированы с использованием некомпартментных методов с Phoenix® (Phoenix 64, сборка 6.4.0.768, Pharsight® Corp., Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Следующий анализ РК использовали для измерения присутствия как видов, связывающих TTR-

антитело к TRAILR2, так и видов TTR среди гомодимерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2 и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2, в сыворотке крови мыши с помощью анализа MSD образцов сыворотки крови мыши. 96-луночный планшет MSD с обычным связыванием (Meso Scale Discovery, Гейтерсберг, Мэриленд, США) покрывали 2 мкг/мл кроличьего поликлонального антитела к TTR (Amgen Inc., Таузанд-Окс, Калифорния, США) в PBS и затем инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшет промывали и блокировали с помощью I-Block™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) в течение ночи при 4°C. Стандарты и образцы для контроля качества (QC) получали в сыворотке крови мыши, а образцы ПК разводили в не подвергавшейся воздействию сыворотке крови мыши CD-1, если требовалось разбавление. Стандарты, QC и образцы затем разбавляли 1:20 в буфере, содержащем PBS, 1 M NaCl, 0,5% Tween 20 и 1% бычьего сывороточного альбумина. Планшет трижды промывали с помощью примерно 200 мкл буфера 1X KPL (Гейтерсберг, Мэриленд, США), а затем 50 мкл разведенных стандартов, QC и образцов переносили в планшет, покрытый антителом к TTR, и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Планшет трижды промывали с помощью примерно 200 мкл промывочного буфера 1X KPL, а затем добавляли 50 мкл 250 нг/мл кроличьего поликлонального антитела к конатумумабу, конъюгированного с биотином, и инкубировали в течение 1,5 часа. После трехкратного промывания планшета промывочным буфером 1X KPL добавляли 50 мкл 100 нг/мл стрептавидина, конъюгированного с MSD SULFO-TAG (Amgen, Inc.), и инкубировали в течение 15 мин. Планшет промывали шесть раз с помощью примерно 200 мкл промывочного буфера 1X KPL с последующим добавлением 150 мкл 1x буфера для считывания T (Meso Scale Discovery), и электрохемилюминесцентный сигнал измеряли с использованием планшет-ридера MSD 6000 (Meso Scale Discovery). Данные о концентрации в сыворотке крови были проанализированы с использованием некомпартментных методов с Phoenix® (Phoenix 64, сборка 6.4.0.768, Pharsight® Corp., Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Результаты анализа ПК можно найти на фиг. 15. Как показано на фиг. 15a) (показатель любых видов, связывающих TRAILR2): [1] ПК гомодимера TTR-антитело к TRAILR2 ("1") лучше, чем ПК исходного Ab (конатумумаб ("3"); и конатумумаб-341-G1 ("2")); [2] ПК гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 ("5") является неудовлетворительной, и это, вероятно, объясняется тем фактом, что Fab не содержит Fc-области и, следовательно, у него отсутствует способность опосредовать/продлить период его полужизни; и [3] ПК гомотетрамера TTR-антитело к TRAILR2 ("4") аналогична таковой у исходного mAb (конатумумаба). Примечательно, что гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 демонстрирует намного лучшую ПК по сравнению с его исходным антителом (конатумумабом), что отличается от того, что наблюдалось в отношении гомотетрамера TTR-антитело к GITR (который не был таким же устойчивым, как исходное mAb, хотя он тем не менее продемонстрировал значительно улучшенную ПК по сравнению с Fab). Это наблюдение предполагает, что ПК гомотетрамерных слитых белков TTR-антитело может зависеть от антитела и/или мишени. На фиг. 15b) (показатель как видов, связывающих TTR-антитело к TRAILR2, так и видов TTR) продемонстрировано, что ПК интактных слитых белков TTR-антитело к TRAILR2 соответствует таковой, наблюдаемой на фигуре 15a), что указывает на то, что протеолиз *in vivo* не освобождает TRAILR2-связывающую часть от каждого слитого белка на основе TTR. Гомодимер TTR-антитело к TRAILR2 ("1"); гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 ("2") и гомотетрамер TTR-Fab к TRAILR2 ("3") оценены на фиг. 15b).

Клеточные анализы активности.

Оценивали активность слитых белков TTR-антитело к TRAILR2 по сравнению с конатумумабом + белок G на линии клеток меланомы WM35 (ATCC). WM35 экспрессирует DR5, но не DR4. TRAIL активирует как DR5, так и DR4. Клетки WM35 высевали по 10⁴ клетки на лунку микротитрационного планшета, а затем инкубировали с конатумумабом, гомодимерным слитым белком TTR-антитело к TRAILR2, гомотетрамерным слитым белком TTR-антитело к TRAILR2 или гомотетрамерным слитым белком TTR-Fab к TRAILR2 в отсутствие или в присутствии 1 мкг/мл белка G (Pierce) в целях содействия перекрестному связыванию. Образцы были проанализированы в трех повторностях. После инкубации в течение 24 ч при 37°C, 5% CO² жизнеспособность клеток оценивали с использованием анализа Cell Titer-glo (Promega). Реакцию Cell Titer-glo проводили в соответствии с инструкциями производителя, а люминесценцию измеряли с использованием Perkin Elmer Envision. На оси Y показан люминесцентный сигнал в относительных световых единицах (RLU); при этом снижение RLU отражает снижение выработки АТФ и уменьшение количества жизнеспособных клеток. На оси X показана концентрация белка.

На фиг. 16 показаны результаты анализа WM35. Конатумумаб ("1") неэффективен при уничтожении клеток, если только он не образует кластер с белком G (у которого есть два сайта связывания Ig; "5"). Гомодимер TTR-антитело к TRAILR2 ("2") несколько лучше в уничтожении клеток WM35, чем исходный конатумумаб. Гомотетрамер TTR-Fab к TRAILR2 ("4") обладает несколько лучшей способностью уничтожать клетки WM35, чем конатумумаб. Однако гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 ("3") значительно более активен, чем конатумумаб, в отношении уничтожения клеток WM35 и даже более активен, чем кластерный комплекс конатумумаб/белок G. Кроме того, кластеризация гомодимера TTR-антитело к TRAILR2 ("6") с белком G улучшала активность слитых белков, в то время как кластеризация

гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 с белком G ("8") имела незначительный эффект. Интересно, что кластеризация гомотетрамера TTR-антитело к TRAILR2 с белком G ("7") несколько снижала активность слитого белка. Эти результаты демонстрируют, что опосредованная гомотетрамером TTR-антитело кластеризация может усиливать противоопухольевую активность.

Оценивали активность продуктов слияния TTR-антитело к TRAILR2 по сравнению с конатумумабом + белок G на первичных кератиноцитах человека (Lonza). Первичные кератиноциты высевали в количестве 10^4 клеток на лунку микротитрационного планшета, а затем инкубировали с TRAIL в отдельности, конатумумабом с 1 мкг/мл белка G (Pierce) для стимулирования перекрестного связывания или TRAIL плюс 1 мкг/мл конатумумаба. Образцы получали в трех повторностях для каждого условия. После инкубации в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂ жизнеспособность клеток оценивали с использованием анализа Cell Titer-glo (Promega). Первичные кератиноциты также высевали в количестве 10^4 клеток на лунку микротитрационного планшета, а затем инкубировали с гомотетрамером TTR-антитело к TRAILR2, гомотетрамером TTR-Fab к TRAILR2, конатумумабом или TRAIL в указанных концентрациях. TRAIL в комбинации с 1 мкг/мл конатумумаба также тестировали. Образцы получали в трех повторностях. После инкубации в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂ жизнеспособность клеток измеряли с использованием анализа Cell Titer-glo (Promega).

На фиг. 17 показаны результаты анализа кератиноцитов. Опять же, конатумумаб ("1") оказался неэффективным в уничтожении первичных кератиноцитов человека. Гомотетрамер TTR-Fab к TRAILR2 ("2") демонстрирует несколько лучшую активность, чем конатумумаб. Опять же, гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 ("3") является значительно более активным, чем конатумумаб, в отношении уничтожения первичных кератиноцитов человека. Эти результаты снова показывают, что опосредованная гомотетрамером TTR-антитело кластеризация может усиливать активность в анализах уничтожения клеток *in vitro*.

Анализ активности на мышинной модели аденокарциномы Colo205.

Активность конатумумаба, гомодимерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2, гомотетрамерного слитого белка TTR-антитело к TRAILR2 и гомотетрамерного слитого белка TTR-Fab к TRAILR2 оценивали на мышинной модели аденокарциномы толстой кишки человека Colo205. Клетки аденокарциномы толстой кишки человека Colo205 поддерживали при 37°C и 5% CO₂ в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS (Sigma, 2442-500 мл), 4 mM L-глутамина (Hyclone, SH30034.01), 1 mM HEPES (Hyclone, SH30237.01), 1 mM пирувата натрия (Sigma, S8636-100 мл) и 2,5 г/л глюкозы (Sigma, G8769). На 3 пассаже клетки собирали и ресуспендировали в бессывороточной среде, чтобы получить конечную концентрацию 10×10^6 клеток/мл. По исключению окрашивания трипановым синим определяли, что жизнеспособность клеток составляет 98%.

Шестидесяти самкам голых мышей NU/NU вводили 1×10^6 клеток (в объеме 100 мкл) подкожно в правый бок, в то время как мыши находились под анестезией изофлуораном. В день 7 после имплантации опухоли 50 мышей с объемами опухоли от 34 мм³ до 99 мм³ распределили на 5 групп обработки по 10 мышей в каждой так, чтобы в каждой группе были одинаковые средние объемы опухоли в диапазоне от 40 мм³ до 48 мм³. Десять мышей с меньшими или большими опухолями были исключены из этого исследования.

Пять групп животных получали два раза в неделю (b.i.w) внутривнутрибрюшинные дозы конатумумаба (0,69 мкг/животное), конатумумаба-341-G1 (0,69 мкг/животное), гомодимера TTR-антитело к TRAILR2 (0,34 мкг/животное), гомотетрамера TTR-антитело к TRAILR2 (0,17 мкг/животное) и гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 (0,17 мкг/животное) в течение 3 недель и всего 6 обработок. Средства обработки нормализовали таким образом, чтобы все содержали такое же количество сайтов связывания, что и конатумумаб, за исключением гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 (который содержал только половину сайтов связывания, по сравнению с остальными средствами обработки). Все обработки начинались в день 8 и заканчивались в день 25 после имплантации опухоли (обработки проводилось в дни 8, 11, 15, 19, 22 и 25). Все средства обработки были свежеприготовленными в разбавителе (DPBS) в день лечения непосредственно перед инъекцией.

Измерение объема опухоли: длину и ширину опухолей измеряли с помощью штангенциркуля с солнечным элементом питания ABS Digimatic, модель № Cd-S6"C (Mitutoyo Corporation, Япония). Объем опухоли рассчитывали как $0,5 \times L \times W^2$, где W был меньшим из двух измерений, и выражали в мм³.

Измерение веса тела: для измерения веса тела животных помещали в чаши весов на весах (Mettler Toledo модель PB602-S, Швейцария). Средние значения веса тела определяли в течение 3-секундного периода с использованием функции динамического веса на весах. Вес тела указывается как изменение веса тела, которое рассчитывается как $100 \times (W_c/W_i)$, где W_c представляет собой текущий вес тела, а W_i представляет собой вес тела в начале обработки. Для этого исследования вес тела в день 4 использовали в качестве W_i для всех животных.

Умерщвление: пять животных умерщвляли до конца исследования, потому что размер опухоли достиг 1500-2000 мм³. Группа конатумумаба-341-G1: двух мышей умерщвляли из-за чрезмерного объема опухоли в день 25; еще двух мышей умерщвляли из-за чрезмерного объема опухоли в день 35. Десять

мышей в группе гомодимера TTR-антитело к TRAILR2 и оставшиеся шесть мышей в группе конатумумаба-341-G1 умерщвляли в день 42 из-за среднего объема опухоли $>1200 \text{ мм}^3$ или потери более половины мышей в когorte. Одну мышшь из группы гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 умерщвляли из-за объема опухоли $>2000 \text{ мм}^3$ в день 42. Одну мышшь из группы гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 умерщвляли из-за чрезмерного объема опухоли в день 49. Всех оставшихся животных умерщвляли в день 63 в связи с завершением исследования. Животных умерщвляли с помощью передозировки изофлуораном с последующим забором крови путем пункции сердца.

Измерения опухоли: данные в период между днями 4 и 63 выражали как средние значения плюс или минус стандартные ошибки и наносили на график в зависимости от времени. Статистическую значимость наблюдаемых различий между кривыми роста оценивали путем многократного дисперсионного анализа данных по трансформированному объему опухоли с учетом множественных сравнений, скорректированных по Даннетту. Анализ проводили с использованием процедуры SAS PROC MIXED с эффектами модели трансформированного исходного объема опухоли, дня, обработки и взаимодействия между днем и обработкой; оператора REPEATED, где день был повторным значением, животное представляло собой субъект, и ковариационной структуры Теплица; и оператора LSMEANS для проведения анализа по Даннетту, сравнивающего контрольную группу с другими группами обработки. Данные преобразовывали логарифмически или с помощью преобразования квадратного корня в соответствии с методом Хорвица, и трансформированный исходный объем опухоли включали в модель в качестве ковариаты для учета возможных различий в объеме опухоли до обработки. Если логарифмическое преобразование или преобразование квадратного корня не смогло обеспечить правильное остаточное распределение, использовали непараметрический анализ дисперсии с повторным измерением с использованием той же модели для ранга объема опухоли. Значения $P < 0,05$ считали статистически значимыми. Группы конатумумаба (дикого типа) и конатумумаба-341-G1 использовали в качестве контрольных групп в анализе.

На фиг. 18 показаны результаты тестирования мышшиной модели Colo205. Все из конатумумаба ("группа 1"; $0,69 \text{ мкМ/животное}$), гомотетрамера TTR-антитело к TRAILR2 ("группа 4"; $0,17 \text{ мкМ/животное}$) и гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 ("группа 5"; $0,17 \text{ мкМ/животное}$) подавляют рост опухоли *in vivo* во время дозирования, при этом гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 демонстрирует лучший уровень подавления во время дозирования. Гомодимер TTR-антитело к TRAILR2 ("группа 3"; $0,34 \text{ мкМ/животное}$) был лишь незначительно лучше, чем контрольная среда-носитель (конатумумаб-341-G1, "группа 2"; $0,69 \text{ мкМ/животное}$) при подавлении роста опухоли. Примечательно, что гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 продолжал подавлять рост опухоли еще долго после того, как введение доз было остановлено. Кроме того, и что удивительно, хотя гомотетрамер TTR-Fab к TRAILR2 имеет плохой PK-профиль (фиг. 15), конструкция так же эффективна, как конатумумаб, в отношении подавления роста опухоли. Без ограничения конкретной теорией, возможно, что первоначальное воздействие гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 запускает цепочку событий в клетке-мишени, которая приводит к уничтожению и не требует длительного связывания. Кроме того, относительно небольшой размер конструкции Fab может обеспечить ей лучший доступ к опухолевой среде, компенсируя плохую PK. Наконец, физическая конфигурация конструкции Fab может быть более эффективной *in vivo*.

Анализ активности на мышшиной модели аденокарциномы SW403.

Клетки аденокарциномы толстой кишки человека SW403 поддерживали при 37°C в 5% CO_2 в культуральной среде RPMI-1640 (Sigma R0883) с добавлением 10% FBS (Sigma, 2442-500 мл), 4 мМ L-глутамин (Hyclone, SH30034.01). На 5 пассаже клетки собирали и ресуспендировали в бессывороточной среде, чтобы получить конечную концентрацию 50×10^6 клеток/мл. По исключению окрашивания трипановым синим определяли, что жизнеспособность клеток составляет 95%.

Семидесяти пяти самкам голых мышшей NU/NU вводили 5×10^6 клеток (в объеме 100 мкл) подкожно в правый бок, в то время как мышши находились под анестезией изофлуораном. В день 7 после имплантации опухоли 60 мышшей с объемами опухоли от 21 мм^3 до 160 мм^3 распределили на 6 групп обработки по 10 мышшей в каждой так, чтобы в каждой группе были одинаковые средние объемы опухоли в диапазоне от 58 мм^3 до 66 мм^3 . Пятнадцать мышшей с меньшими или большими опухолями были исключены из этого исследования.

Шесть групп животных получали два раза в неделю (b.i.w) внутривнутрибрюшинные дозы конатумумаба дикого типа ($1,38 \text{ мкМ/животное}$), конатумумаба-341-G1 ($1,38 \text{ мкМ/животное}$), гомодимера TTR-антитело к TRAILR2 ($0,69 \text{ мкМ/животное}$), гомотетрамера TTR-антитело к TRAILR2 ($0,34 \text{ мкМ/животное}$) и гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 ($0,34 \text{ мкМ/животное}$) и DPBS (контрольная среда-носитель) в течение 3 недель и всего 6 обработок. Средства обработки нормализовали таким образом, чтобы каждое содержало одинаковое количество сайтов связывания, что и конатумумаб дикого типа, за исключением гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2, который содержал только половину сайтов связывания, по сравнению с остальными средствами обработки. Все обработки начинались в день 15 и заканчивались в день 32 после имплантации опухоли (обработки проводилось в дни 15, 19, 22, 26, 29 и 32). Все средства обработки были свежеприготовленными в разбавителе (DPBS) в день лечения непосредственно перед инъекцией.

Измерение объема опухоли: длину и ширину опухолей измеряли с помощью штангенциркуля с

солнечным элементом питания ABS Digimatic, модель № Cd-S6"С (Mitutoyo Corporation, Япония). Объем опухоли рассчитывали как $0,5 \times L \times W^2$, где W был меньшим из двух измерений, и выражали в мм^3 .

Измерение веса тела: животных помещали в чаши весов на весах (Mettler Toledo модель PB602-S, Швейцария). Средние значения веса тела определяли в течение 3-секундного периода с использованием функции динамического веса на весах. Вес тела указывается как изменение веса тела, которое рассчитывается как $100 \times (W_c/W_i)$, где W_c представляет собой текущий вес тела, а W_i представляет собой вес тела в начале обработки. Для этого исследования вес тела в день 4 использовали в качестве W_i для всех животных.

Умерщвление и сбор тканей: восемь животных умерщвляли до конца исследования, потому что размер опухоли достиг $1500\text{--}2000 \text{ мм}^3$. Одну мышь из группы конатумумаба-341-G1 умерщвляли из-за чрезмерного объема опухоли в день 33. Другую мышь из группы конатумумаба-341-G1, двух из группы контрольной среды-носителя DPBS и одну из группы гомодимера TTR-антитело к TRAILR2 умерщвляли в день 36. Остальных животных в группах конатумумаба-341-G1, контрольной среды-носителя DPBS и гомодимера TTR-антитело к TRAILR2 умерщвляли в день 39. Одну мышь из группы конатумумаба WT умерщвляли в день 39. Другую мышь из группы конатумумаба WT и одну из группы гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 умерщвляли в день 46. Всех оставшихся животных в группах конатумумаба WT, гомотетрамера TTR-антитело к TRAILR2 и гомотетрамера TTR-Fab к TRAILR2 умерщвляли в день 49 в конце исследования. Все процедуры умерщвления проводили с помощью передозировки изофлуораном с последующим забором крови путем пункции сердца.

Измерения опухоли: данные в период между днями 7 и 49 выражали как средние значения плюс или минус стандартные ошибки и наносили на график в зависимости от времени. Статистическую значимость наблюдаемых различий между кривыми роста оценивали путем многократного дисперсионного анализа данных по трансформированному объему опухоли с учетом множественных сравнений, скорректированных по Даннетту. Анализ проводили с использованием процедуры SAS PROC MIXED с эффектами модели трансформированного исходного объема опухоли, дня, обработки и взаимодействия между днем и обработкой; оператора REPEATED, где день был повторным значением, животное представляло собой субъект, и ковариационной структуры Теплица; и оператора LSMEANS для проведения анализа по Даннетту, сравнивающего контрольную группу с другими группами обработки. Данные преобразовывали логарифмически или с помощью преобразования квадратного корня в соответствии с методом Хорвица, и трансформированный исходный объем опухоли включали в модель в качестве ковариаты для учета возможных различий в объеме опухоли до обработки. Если логарифмическое преобразование или преобразование квадратного корня не смогло обеспечить правильное остаточное распределение, использовали непараметрический анализ дисперсии с повторным измерением с использованием той же модели для ранга объема опухоли. Значения $P < 0,05$ считали статистически значимыми. Все статистические расчеты были сделаны с использованием инструмента биостатистического анализа AMG (cld-pweb-taivd.amgen.com/biostats/Statistics). Группу конатумумаба WT использовали в качестве контрольной группы в анализе.

На фиг. 19 показаны результаты тестирования мышинной модели SW403. Гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2 ("группа 5") и гомотетрамер TTR-Fab к TRAILR2 ("группа 6") подавляют рост опухоли *in vivo* лучше, чем конатумумаб ("группа 1") во время дозирования. Гомодимер TTR-антитело к TRAILR2 ("группа 4") подавлял рост во время дозирования приблизительно на том же уровне, что и конатумумаб, хотя ни один из них не был значительно лучше в подавлении роста, чем контрольная среда-носитель ("группа 3"). Примечательно, что как гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2, так и гомотетрамер TTR-Fab к TRAILR2 замедляют рост опухоли даже после прекращения дозирования. Опять же, было удивительно наблюдать, что хотя гомотетрамер TTR-Fab к TRAILR2 имеет плохой PK-профиль (фиг. 15), конструкция так же эффективна, как и гомотетрамер TTR-антитело к TRAILR2, в замедлении роста опухоли даже после прекращения дозирования.

На фиг. 20 показано, что вес тела мышей мышинной модели Colo205 и мышей мышинной модели SW403, является аналогичным для всех протестированных соединений и, по-видимому, находится на нормальной тенденции к повышению. Этот результат указывает на то, что тестируемые соединения не являются явно токсичными (поскольку мыши были достаточно здоровы, чтобы нормально питаться и набирать вес).

Краткое описание SEQ ID NO:

SEQ ID NO	Описание
1	Последовательность белка транстиретина человека с C10A + K15A
2	Последовательность нуклеиновой кислоты транстиретина человека с C10A + K15A
3	Последовательность белка транстиретина мыши

4	Последовательность нуклеиновой кислоты транстиретина мыши
5	Последовательность белка тяжелой цепи антитела к CB1R
6	Последовательность белка тяжелой цепи антитела к CB1R с EU E356K и EU D399K
7	Последовательность белка тяжелой цепи антитела к CB1R с EU K392D и EU K409D
8	Последовательность белка CDR1 тяжелой цепи антитела к CB1R
9	Последовательность белка CDR2 тяжелой цепи антитела к CB1R
10	Последовательность белка CDR3 тяжелой цепи антитела к CB1R
11	Последовательность белка легкой цепи антитела к CB1R
12	Последовательность белка CDR1 легкой цепи антитела к CB1R
13	Последовательность белка CDR2 легкой цепи антитела к CB1R
14	Последовательность белка CDR3 легкой цепи антитела к CB1R
15	Последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи антитела к CB1R
16	Последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи антитела к CB1R с E416K + D459K
17	Последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи антитела к CB1R с K420D + K437D
18	Последовательность белка тяжелой цепи антитела 9H6 с N297G
19	Последовательность белка тяжелой цепи антитела к GITR с N297G, E356K, D399K
20	Последовательность белка тяжелой цепи антитела к GITR с N297G, K392D, K409D
21	Последовательность белка тяжелой цепи Fab к GITR с S183E
22	Последовательность белка CDR1 тяжелой цепи к GITR
23	Последовательность белка CDR2 тяжелой цепи к GITR
24	Последовательность белка CDR3 тяжелой цепи к GITR
25	Последовательность белка легкой цепи 9H6
26	Последовательность белка легкой цепи Fab к GITR с S176K
27	Последовательность белка CDR1 легкой цепи к GITR
28	Последовательность белка CDR2 легкой цепи к GITR
29	Последовательность белка CDR3 легкой цепи к GITR
30	Линкер GG + His-метка

31	Последовательность белка тяжелой цепи антитела IgG1 к TRAILR2
32	Последовательность белка тяжелой цепи антитела IgG1 к TRAILR2 с N297G, KK
33	Последовательность белка тяжелой цепи антитела IgG1 к TRAILR2 с N297G, DD
34	Последовательность белка тяжелой цепи Fab IgG2 к TRAILR2 с S183E
35	Последовательность белка CDR1 тяжелой цепи к TRAILR2
36	Последовательность белка CDR2 тяжелой цепи к TRAILR2
37	Последовательность белка CDR3 тяжелой цепи к TRAILR2
38	Последовательность белка легкой цепи антитела к TRAILR2
39	Последовательность белка легкой цепи Fab к TRAILR2 с S176K
40	Последовательность белка CDR1 легкой цепи к GITR
41	Последовательность белка CDR2 легкой цепи к GITR
42	Последовательность белка CDR3 легкой цепи к GITR
43	Последовательность белка транстиретина человека без C10A + K15A
44	Последовательность белка тяжелой цепи Fab к CB1R
45	Последовательность белка тяжелой цепи Fab к CB1R с S215E
46	Последовательность белка легкой цепи Fab к CB1R с S203K
47	Линкер GGGGS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гомодимерный слитый белок, содержащий два антигенсвязывающих белка, где указанные антигенсвязывающие белки связаны с транстиретин (TTR)-белковым комплексом, где указанный TTR-белковый комплекс содержит 4 субъединицы TTR, при этом каждая субъединица TTR-белкового комплекса содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и при этом аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 43 содержит следующие мутации: C10A и K15A.
2. Гомодимерный слитый белок по п.1, где антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, которое связывает глюкокортикоид-индуцированный TNFR-родственный белок (GITR), рецептор родственного фактору некроза опухоли лиганда, индуцирующего апоптоз 2 (TRAIL2) или каннабиноидный рецептор-1.
3. Гомодимерный слитый белок по п.1 или 2, где указанные антигенсвязывающие белки непосредственно слиты без линкера с указанным TTR-белковым комплексом.
4. Гомодимерный слитый белок по п.3, где указанный С-конец антигенсвязывающего белка непосредственно слит с N-концом субъединицы TTR.
5. Гомодимерный слитый белок по п.1 или 2, где указанные антигенсвязывающие белки слиты с указанным TTR-белковым комплексом с помощью линкера.
6. Гомодимерный слитый белок по п.5, где указанный С-конец антигенсвязывающего белка связан с N-концом субъединицы TTR.
7. Гомодимерный слитый белок по п.6, где указанный линкер представляет собой аминокислотный линкер.
8. Гомодимерный слитый белок по п.7, где длина указанного аминокислотного линкера составляет 1-40 аминокислот.
9. Гомодимерный слитый белок по п.8, где указанный аминокислотный линкер представляет собой GGGGS, (GGGGS)₂, (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, (GGGGS)₅ или (GGGGS)₆.
10. Гомотетрамерный слитый белок, содержащий четыре антигенсвязывающих белка, где указанные антигенсвязывающие белки связаны с TTR-белковым комплексом, где антигенсвязывающий белок представляет собой полноразмерное антитело или Fab, где указанный TTR-белковый комплекс содержит 4 субъединицы TTR,

при этом каждая субъединица TTR-белкового комплекса содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и

при этом аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 43 содержит следующие мутации: С10А и К15А.

11. Гомотетрамерный слитый белок по п.10, в котором антитело или Fab связывает глюкокортикоид-индуцированный TNFR-родственный белок (GITR), рецептор родственного фактору некроза опухоли лиганда, индуцирующего апоптоз 2 (TRAIL2) или каннабиноидный рецептор-1 (CB1R).

12. Гомотетрамерный слитый белок по п.10 или 11, где указанные антигенсвязывающие белки непосредственно слиты без линкера с указанным TTR-белковым комплексом.

13. Гомотетрамерный слитый белок по п.12, где указанный С-конец антигенсвязывающего белка непосредственно слит с N-концом субъединицы TTR TTR-белкового комплекса.

14. Гомотетрамерный слитый белок по п.10 или 11, где указанные антигенсвязывающие белки слиты с указанным белковым комплексом с помощью линкера.

15. Гомотетрамерный слитый белок по п.14, где указанный С-конец антигенсвязывающего белка связан с N-концом субъединицы TTR.

16. Гомотетрамерный слитый белок по п.15, где указанный линкер представляет собой аминокислотный линкер.

17. Гомотетрамерный слитый белок по п.16, где длина указанного аминокислотного линкера составляет 1-40 аминокислот.

18. Гомотетрамерный слитый белок по п.17, где указанный аминокислотный линкер представляет собой GGGGS, (GGGGS)₂, (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, (GGGGS)₅ или (GGGGS)₆.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая гомодимерный слитый белок по любому из пп.1-9.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая гомотетрамерный слитый белок по любому из пп.10-18.

21. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая гомодимерный слитый белок по любому из пп.1-9.

22. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая гомодимерный слитый белок по любому из пп.10-17.

23. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.21 или 22.

24. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.21 или 22 или вектор по п.23.

25. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.24, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку E5, клетку почки новорожденного хомячка (ВНК), клетку почки обезьяны (COS), клетку гепатоцеллюлярной карциномы человека или клетку эмбриональной почки человека 293 (HEK 293).

26. Способ получения гомодимерного слитого белка по любому из пп.1-9, при этом указанный способ включает

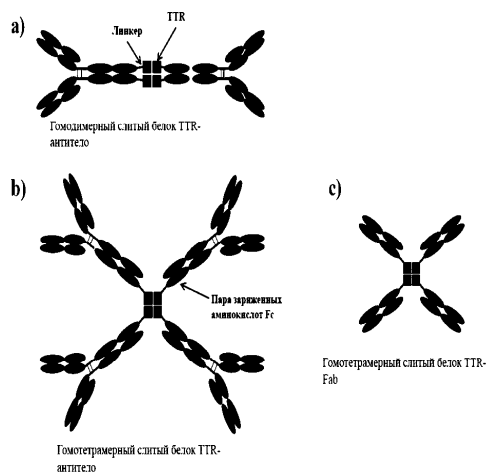
а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по п.22 или 23; и

б) выделение гомодимерного слитого белка из указанной культуры.

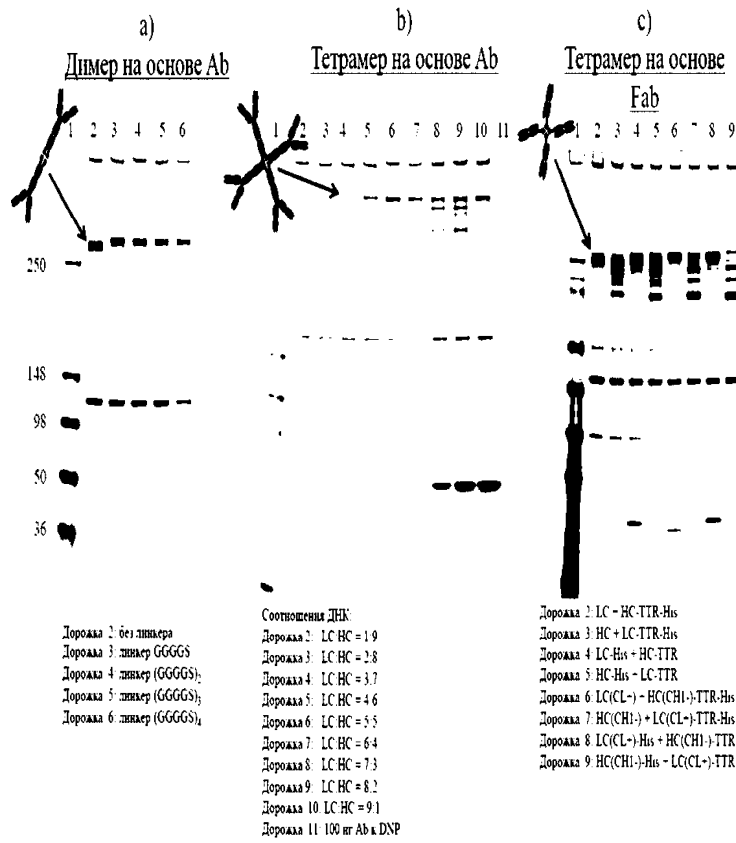
27. Способ получения гомотетрамерного слитого белка по любому из пп.10-18, при этом указанный способ включает

а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по п.22 или 23; и

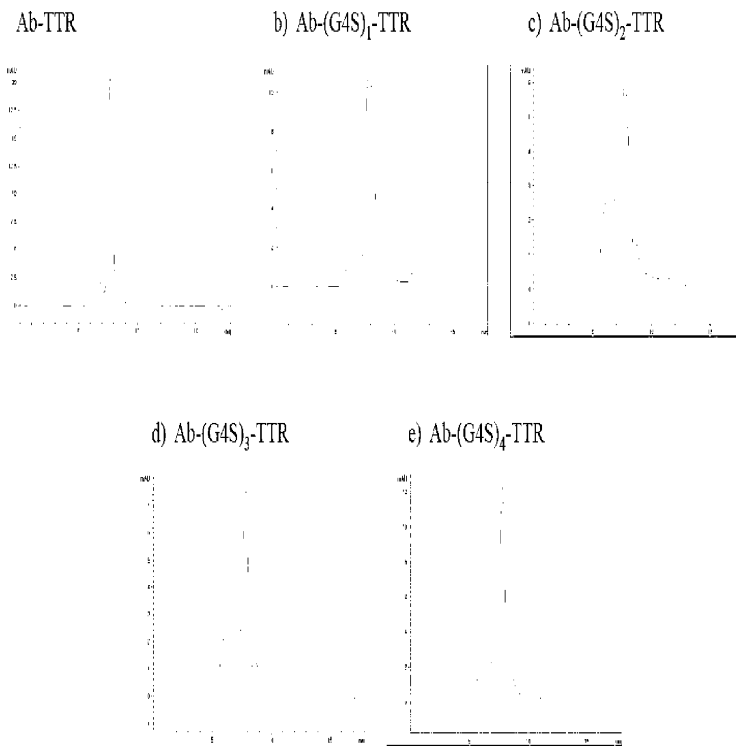
б) выделение гомотетрамерного слитого белка из указанной культуры.



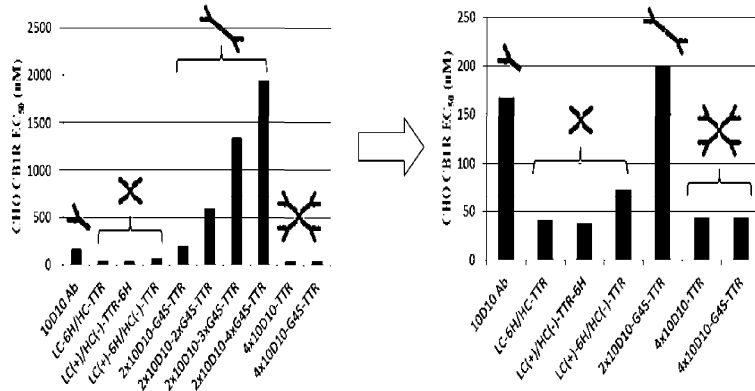
Фиг. 1



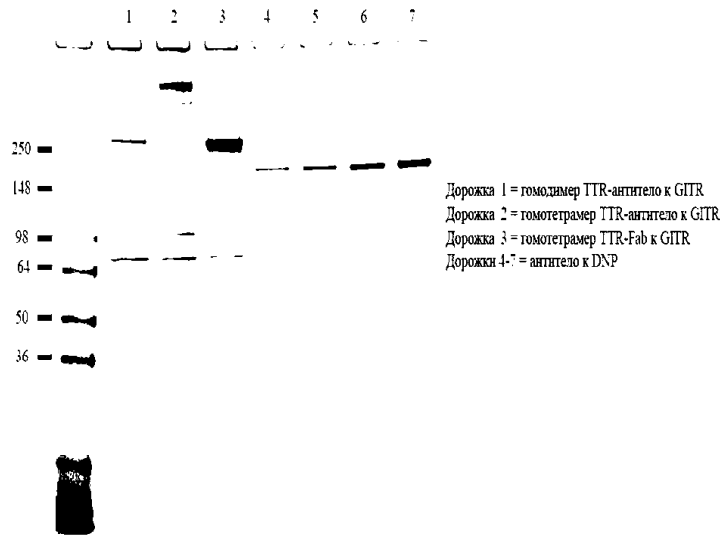
Фиг. 2



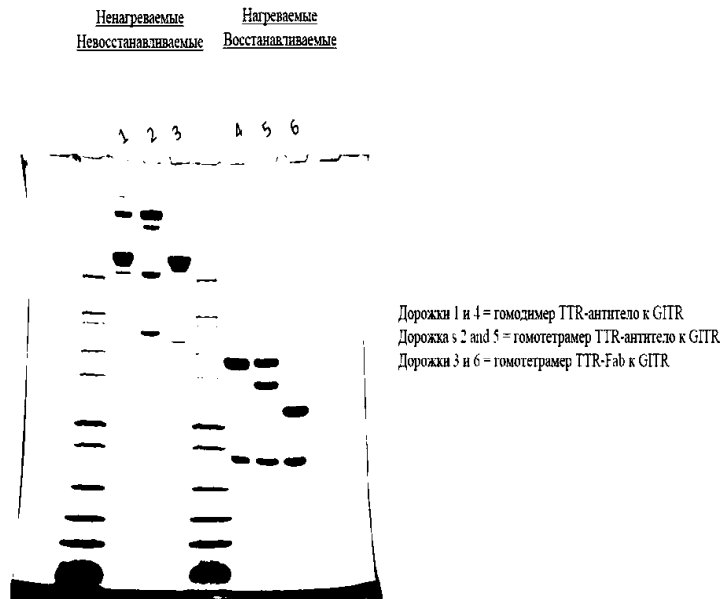
Фиг. 3



Фиг. 4

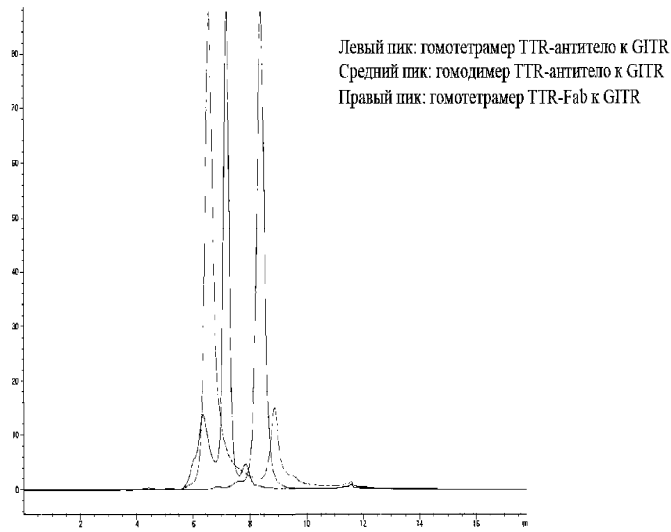


Фиг. 5

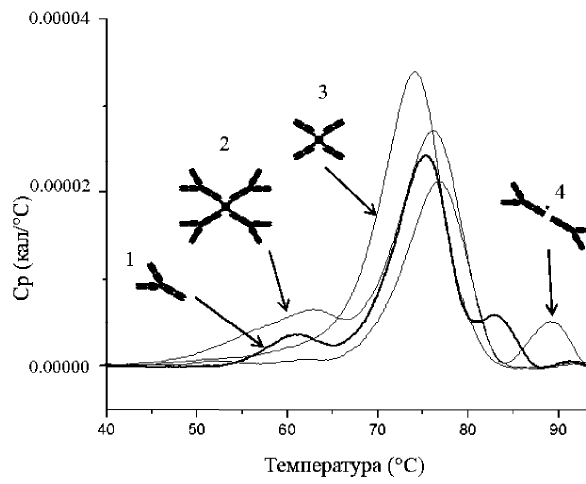


Фиг. 6

Анализ посредством SEC каждого из слитых белков TTR-антитело к G1TR



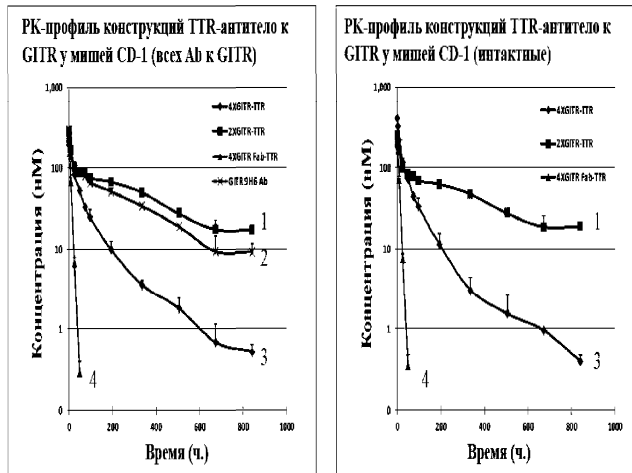
Фиг. 7



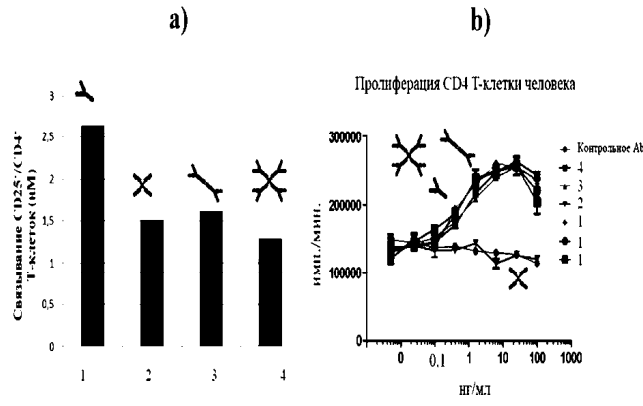
Фиг. 8

a)

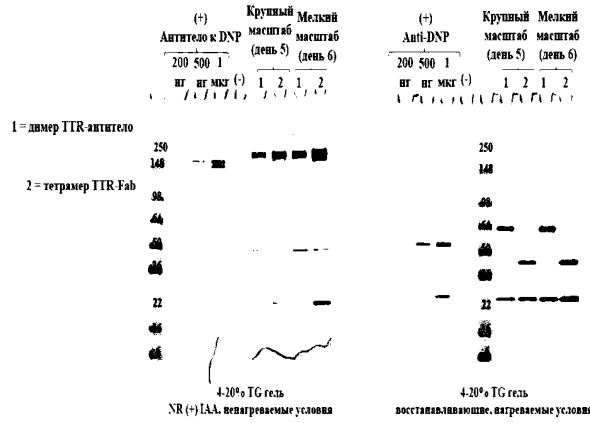
b)



Фиг. 9

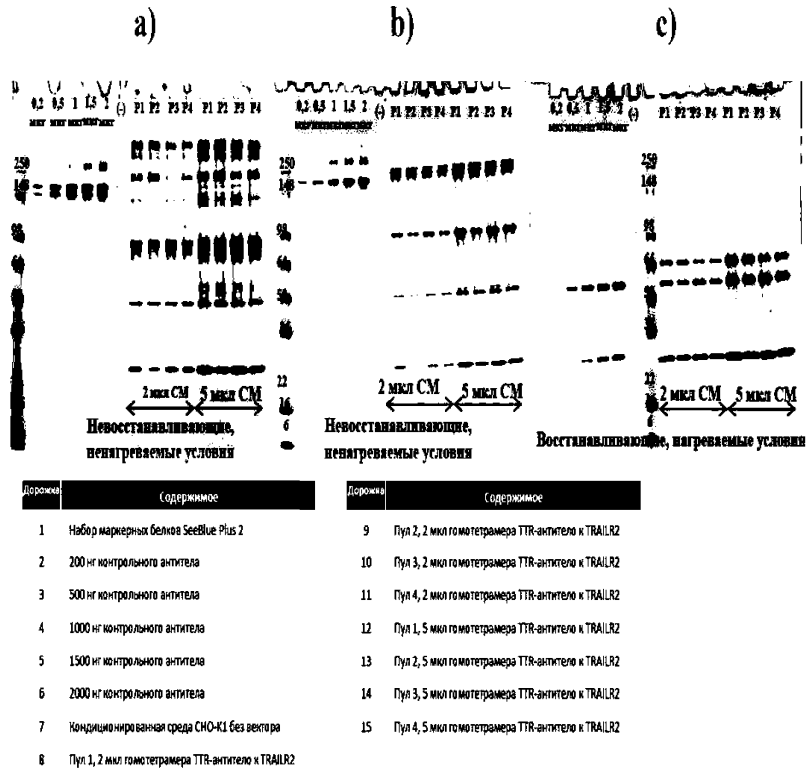


Фиг. 10

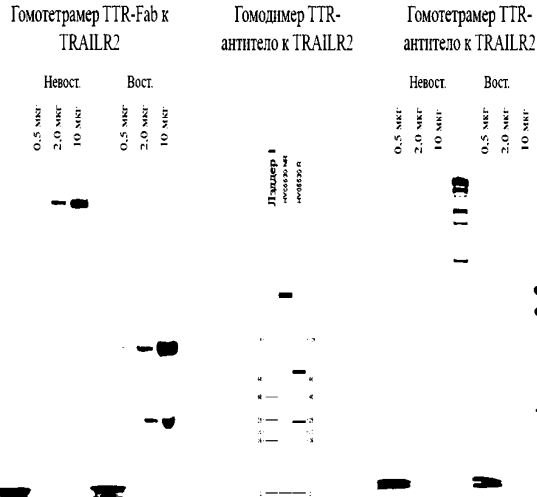


Фиг. 11

Гомотетрамер на основе антитела к TRAILR2

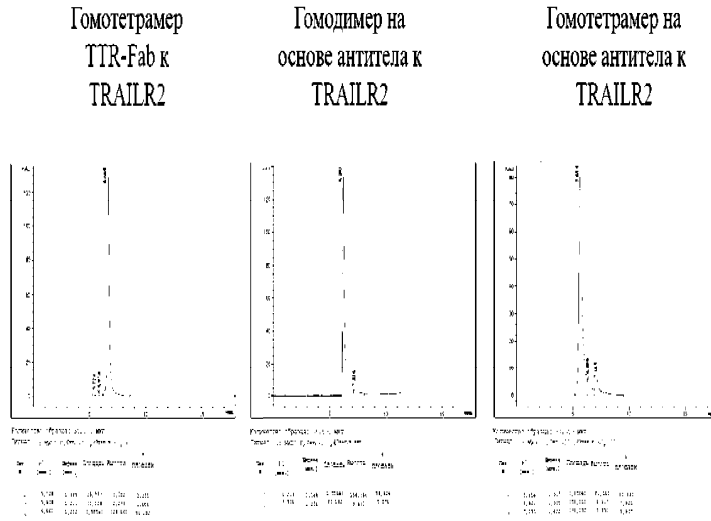


Фиг. 12



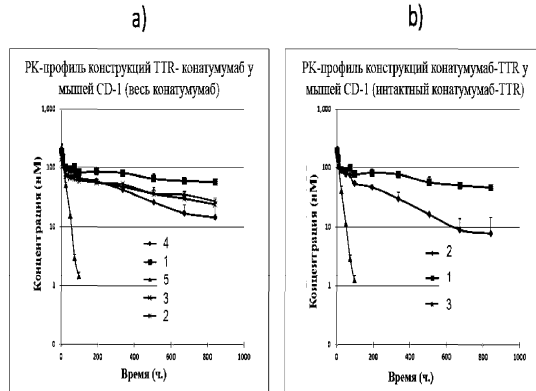
Фиг. 13

Очищенные посредством SEC продукты слияния TTR-антитело к TRAILR2



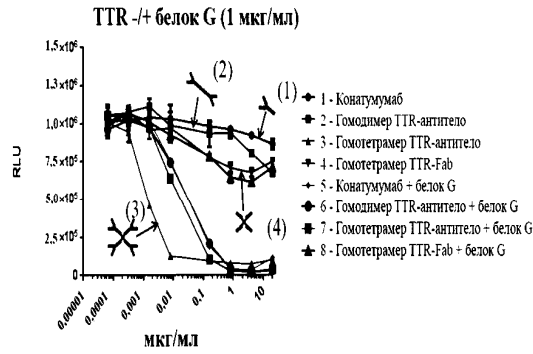
Фиг. 14

PK у мышей конъюгатов TTR-антитело к TRAILR2



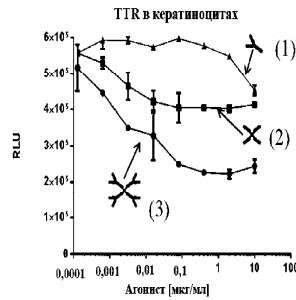
Фиг. 15

Тетрамеризация конатумумаба значительно улучшает активность в клеточном анализе



Фиг. 16

Тетрамеризация конатумумаба улучшает активность в отношении первичных кератиноцитов человека



Фиг. 17

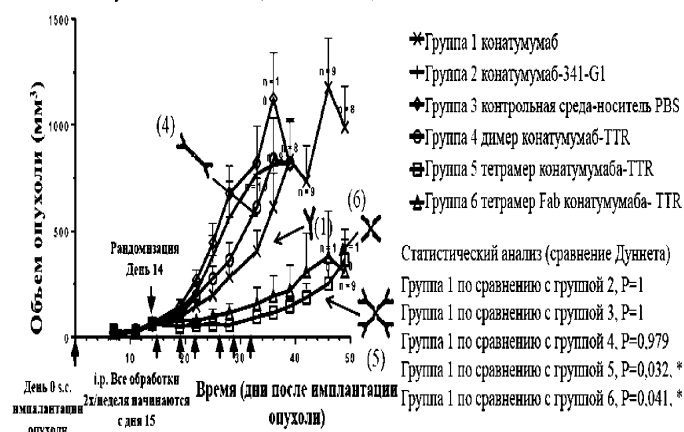
Тетрамеризация конатумумаба уменьшает опухоли в мышинной модели Colo205



Фиг. 18

Тетрамеризация конатумумаба уменьшает опухоли в мышинной модели SW403

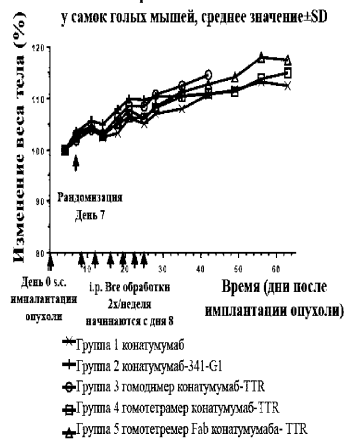
График эффективности молекул конатумумаб-TTR по сравнению с ксенотрансплантатами SW403 в отношении объема опухоли у самок голых мышей, среднее значение±SEM (n=10, все данные)



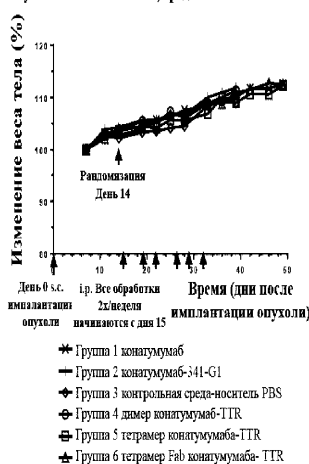
Фиг. 19

Обработка мышей продуктами слияния конатумумаб-TTR не влияет на вес тела

График изменения веса в зависимости от молекул конатумумаб-TTR по сравнению с ксенотрансплантатами Colo205 у самок голых мышей, среднее значение±SD



Молекулы конатумумаб-TTR по сравнению с ксенотрансплантатами SW403 у самок голых мышей, среднее значение±SD



Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2