

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090265** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.05

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.06.01

**(54) КОМПОЗИЦИИ, СПОСОБЫ И/ИЛИ НАБОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЙ
ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ДОМЕН CD38 ЧЕЛОВЕКА**

(31) **62/543788**

(32) **2017.08.10**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2018/053939**

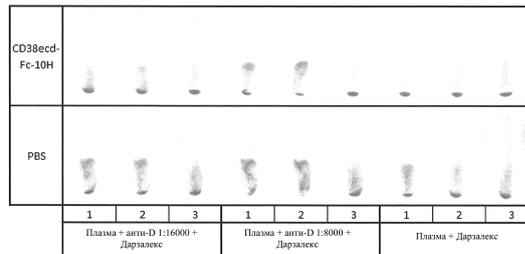
(87) **WO 2019/030581 2019.02.14**

(71) Заявитель:
**ГРИФОЛС ДАЙАГНОСТИК
СОЛЮШНЗ ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Холл Джон А. (US), Швинд Питэр
(СН), Берри Джоди, Фавалоро
Винченцо, Бут Элизабет (US), Бинда
Магтео (СН)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(57) Композиция, которая связывается с антителом анти-CD38, включает определенную последовательность рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента, которая интерферирует с активностью связывания антитела анти-CD38. Эта композиция может быть включена в набор для исследований по биомониторингу и диагностических анализов. Эту композицию можно использовать для нейтрализации антитела анти-CD38 в образце и/или выбора подходящей дозы эритроцитарной массы для пациента, получающего лечение антителами анти-CD38.



A1

202090265

202090265

A1

**КОМПОЗИЦИИ, СПОСОБЫ И/ИЛИ НАБОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ
РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ДОМЕН CD38 ЧЕЛОВЕКА****ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ФОРМАТЕ**

Настоящая заявка подана вместе с электронным перечнем последовательностей в формате текстового файла ASCII через EFS-Web. Электронный перечень последовательностей представлен в виде файла с названием SEQLISTCD38PCT.txt, созданного и окончательно сохраненного 31 мая 2018 года, размер которого составляет 73000 байтов. Информация электронного перечня последовательностей включена в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических продуктов. Некоторые воплощения настоящего изобретения относятся к композициям, способам и/или наборам, содержащим растворимую рекомбинантную форму внеклеточного домена CD38 и/или его фрагментов, экспрессируемых в клетках млекопитающих и/или в бактериях. Также настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим олигомеризационную метку, и способам олигомеризации рекомбинантных слитых белков с использованием указанной метки.

Предшествующий уровень техники

Трансмембранный белок человека CD38 экспрессируется на высоком уровне в определенных злокачественных миеломах. Моноклональные антитела анти-CD38 используют в качестве терапевтических средств для разрушения множественной миеломы и других гематологических опухолей.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых воплощениях предложена композиция для связывания с антителом анти-CD38. В некоторых воплощениях эта композиция содержит рекомбинантную растворимую форму внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента, которая интерферирует с активностью связывания антитела анти-CD38, где последовательность рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента

выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.

В некоторых воплощениях композиции размер рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента находится в диапазоне от примерно 5 аминокислот до примерно 300 аминокислот.

В некоторых воплощениях композиции антитело анти-CD38 представляет собой антитело к CD38 человека; CD38, происходящему не от человека, или их комбинацию.

В некоторых воплощениях композиции антитело анти-CD38 является моноклональным, поликлональным или их комбинацией.

В некоторых воплощениях композиции антитело анти-CD38 выбрано из группы, состоящей из дарзалекса, изатуксимаба и MOR202.

В некоторых воплощениях композиции рекомбинантная растворимая форма внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента экспрессируется в эукариотической системе экспрессии или прокариотической системе экспрессии.

В некоторых воплощениях композиции концентрация рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента находится в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 400 мг/мл.

В некоторых воплощениях предложен набор для исследований по биомониторингу и диагностических анализов. В некоторых воплощениях набор содержит композицию, содержащую рекомбинантную растворимую форму внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента, которая интерферирует с активностью связывания антитела анти-CD38, где последовательность рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, планшет и реагенты для определения присутствия антител.

В некоторых воплощениях набора планшет и реагенты набора укомплектованы для анализа ELISA.

В некоторых воплощениях набора планшет и реагенты набора представляют собой планшет и реагенты из набора для анализа, доступного в продаже под торговой маркой PROMONITOR® на дату подачи настоящей заявки.

В некоторых воплощениях предложен способ нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 в образце. В некоторых воплощениях способ нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 включает обеспечение

объема образца, содержащего антитело анти-CD38, и инкубирование с объемом композиции по п. 1, достаточным для нейтрализации антитела анти-CD38 в образце.

В некоторых воплощениях способа нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 образец выбран из группы, состоящей из крови, плазмы и сыворотки.

В некоторых воплощениях способа нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 антитело анти-CD38 выбрано из группы, состоящей из дарзалекса, изатуксимаба и MOR202.

В некоторых воплощениях способа нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 объем образца находится в диапазоне от примерно 25 мкл до примерно 250 мкл.

В некоторых воплощениях способа нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 объем композиции находится в диапазоне от примерно 0,5 мкл до примерно 50 мкл.

В некоторых воплощениях способа нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 концентрация антитела анти-CD38 в образце находится в диапазоне от примерно 0,005 мкг/мл до примерно 2000 мкг/мл.

В некоторых воплощениях способа нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 концентрация рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента в композиции находится в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 400 мг/мл.

В некоторых воплощениях способа нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 нейтрализующий эффект рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента находится в диапазоне от примерно 70% до примерно 100%.

В некоторых воплощениях способа нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 активность связывания антитела анти-CD38 выбрана из группы, состоящей из интерференции при тестировании крови перед переливанием, интерференции при перекрестной пробе на совместимость крови и интерференции при терапии антителами.

В некоторых воплощениях предложен способ выбора подходящей дозы эритроцитарной массы для пациента, которого лечат антителами анти-CD38. В некоторых воплощениях способ выбора подходящей дозы эритроцитарной массы включает получение образца от пациента, где указанный образец представляет собой кровь или образец, полученный из крови пациента, нейтрализацию антитела анти-CD38 в образце, в

соответствии со способом, предложенным здесь для нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 в образце, тестирование образца на совместимость с определенными дозами эритроцитарной массы и выбор на основании данного тестирования дозы эритроцитарной массы, которая является совместимой с образцом.

В некоторых воплощениях предложен способ удаления анти-CD38 из плазмы, сыворотки и/или крови человека во время обработки плазмы, сыворотки и/или крови. В некоторых воплощениях способ удаления анти-CD38 включает осуществление воздействия на плазму, сыворотку и/или кровь композиции, содержащей рекомбинантную растворимую форму внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента, которая интерферирует с активностью связывания антитела анти-CD38, где последовательность рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, где рекомбинантная растворимая форма внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента помечена аффинной меткой.

В некоторых воплощениях способа удаления анти-CD38 обработка включает обработку, выбранную из группы, состоящей из гемодиализа, перитонеального диализа, гемофильтрации, гемодиофильтрации, обменного переливания плазмы и плазмафереза.

В некоторых воплощениях способа удаления анти-CD38 аффинная метка выбрана из группы, состоящей из глутатион-S-трансферазы (GST); малых убиквитин-подобных модификаторов (SUMO); AviTag; кальмодулиновой метки; полиглутаматной метки; E-метки; FLAG-метки; HA-метки; His-метки; Muc-метки; NE-метки; S-метки; SBP-метки; Softag 1; Softag 3; Strep-метки; метки TC; метки V5; VSV-метки; метки Xpress; Isopeptag; SpyTag; SnoopTag; биотин-карбоксильного белка-носителя (BCCP); глутатион-S-трансферазной метки; метки зеленым флуоресцентным белком; метки другими флуоресцентными белками; HaloTag; метки мальтоза-связывающим белком; Nus-метки, тиоредоксин-метки; Fc-метки; искусственных внутренне неупорядоченных меток, содержащих аминокислоты, вызывающие нарушение порядка; метки Tu.

В некоторых воплощениях предложен слитый белок. В некоторых воплощениях слитый белок содержит рекомбинантный полипептид, слитый с олигомеризационной меткой. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка содержит Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент и домен polyHis.

В некоторых воплощениях слитого белка олигомеризационная метка обладает способностью образовывать димеры более высокого порядка вплоть до 12-меров или 6-меров из 2-меров и возможно олигомеров более высокой степени олигомеризации.

В некоторых воплощениях слитого белка домен polyHis имеет от 4 до 24 остатков гистидина.

В некоторых воплощениях слитого белка домен polyHis имеет от 6 до 10 остатков гистидина.

В некоторых воплощениях слитого белка домен polyHis имеет 6, 8 или 10 остатков гистидина.

В некоторых воплощениях слитого белка последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина представляет собой SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15.

В некоторых воплощениях слитого белка последовательность рекомбинантного полипептида и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

В некоторых воплощениях слитого белка последовательность слитого белка и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

В некоторых воплощениях предложена олигомеризационная метка для рекомбинантного белка. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка содержит Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент и домен polyHis.

В некоторых воплощениях олигомеризационной метки для рекомбинантного белка домен polyHis имеет от 4 до 24 остатков гистидина.

В некоторых воплощениях олигомеризационной метки для рекомбинантного белка домен polyHis имеет от 6 до 10 остатков гистидина.

В некоторых воплощениях олигомеризационной метки для рекомбинантного белка домен polyHis имеет 6, 8 или 10 остатков гистидина.

В некоторых воплощениях олигомеризационной метки для рекомбинантного белка последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина представляет собой SEQ ID NO: 15.

В некоторых воплощениях олигомеризационной метки для рекомбинантного белка последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15.

В некоторых воплощениях олигомеризационной метки для рекомбинантного белка последовательность олигомеризационной метки выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В некоторых воплощениях предложен способ олигомеризации рекомбинантного слитого белка. В некоторых воплощениях способ олигомеризации рекомбинантного слитого белка включает следующие стадии:

а) генетическое слияние нуклеотидной последовательности, кодирующей олигомеризационную метку по настоящему изобретению, с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид;

б) экспрессию полученной на стадии а) нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине;

в) очистку рекомбинантного слитого белка, полученного на стадии б).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлено воплощение искусственно синтезированной аминокислоты, кодирующей рекомбинантный CD38ecd-Fc-10H (SEQ ID NO: 7).

На Фиг. 2 представлено воплощение искусственно синтезированной аминокислоты, кодирующей рекомбинантный CD38ecd-10H (SEQ ID NO: 8).

На Фиг. 3 представлено воплощение искусственно синтезированной аминокислоты, кодирующей рекомбинантный 10H-MBPt-CD38ecd (SEQ ID NO: 9).

На Фиг. 4 представлено воплощение искусственно синтезированной аминокислоты, кодирующей рекомбинантный 10Ht-CD38ecd (SEQ ID NO: 10).

На Фиг. 5 представлено воплощение искусственно синтезированной аминокислоты, кодирующей рекомбинантный 10H-MBPt-DARA-эпитопы (SEQ ID NO: 11).

На Фиг. 6 представлено воплощение аминокислотной последовательности внеклеточного домена CD38 (CD38ecd) (SEQ ID NO: 1).

На Фиг. 7 представлено воплощение аминокислотной последовательности DARA-эпитопов (SEQ ID NO: 2).

На Фиг. 8 представлено воплощение аминокислотной последовательности DARA-эпитопа (эпитоп #1) (SEQ ID NO: 3).

На Фиг. 9 представлено воплощение аминокислотной последовательности DARA-эпитопа (эпитоп #2) (SEQ ID NO: 4).

На Фиг. 10 представлено воплощение аминокислотной последовательности мышиного Fc-10H (SEQ ID NO: 5).

На Фиг. 11 представлено воплощение аминокислотной последовательности 10H-MBPt (SEQ ID NO: 6).

На Фиг. 12 схематически изображены различные рекомбинантные белки CD38 с использованием альтернативных каркасов.

На Фиг. 13 представлены данные, относящиеся к идентификации низкого титра антитела анти-D после ингибирования анти-CD38 посредством CD38ecd-Fc-10H.

На Фиг. 14 представлены данные, относящиеся к идентификации очень слабо детектируемых непредвиденных антител после ингибирования анти-CD38 посредством CD38ecd-Fc-10H.

На Фиг. 15 представлены данные, относящиеся к ингибированию анти-CD38 посредством CD38ecd-Fc-10H или rhCD38.

На Фиг. 16 показаны эквивалентные функциональные свойства преобработок с CD38ecd-Fc-10H при разных температурах и разном времени инкубирования.

На Фиг. 17 показано превосходство функциональных свойств CD38ecd-Fc-10H и CD38ecd-flex-Fc-10H по сравнению с CD38ecd-10H.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

РЕКОМБИНАНТНЫЙ CD38ecd ЧЕЛОВЕКА

Даратумумаб (DARA) представляет собой иммуноглобулин (Ig)G1k - моноклональное антитело (mAb) человека, мишенью которого является трансмембранный белок CD38, экспрессируемый на высоком уровне в клетках злокачественной миеломы (de Weers M, *et al.* Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol.* 2011 Feb 1;186(3):1840-8; Lokhorst HM, *et al.* Targeting CD38 with Daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2015 Sep 24;373(13):1207-19) и используемый для лечения человека. В 2016 году монотерапия DARA была одобрена Управлением по контролю за продуктами питания и лекарствами США (FDA) для лечения пациентов с множественной миеломой, получивших по меньшей мере три предшествующих линии терапии.

Сообщалось, что DARA интерферирует с рутинными тестами на совместимость крови (Chapuy CI *et al.* Resolving the DARA interference with blood compatibility testing. *Transfusion.* 2015 Jun;55(6 Pt 2):1545-54; Oostendorp M *et al.* When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. *Transfusion.* 2015 Jun;55(6 Pt 2):1555-62). DARA специфически распознает эндогенный внеклеточный домен CD38 на клеточной поверхности эритроцитов (RBC), вызывая ложноположительные реакции в определенных диагностических тестах *in vitro*.

Образцы плазмы от пациентов, получающих лечение DARA, стабильно дают положительные реакции в непрямых антиглобулиновых тестах (IAT), таких как тесты детекции (скрининга) антител, панели идентификации антител и перекрестные реакции с глобулином человека (AHG). Детекция транзиторных антител в плазме пациента скрыта на протяжении вплоть до 6 месяцев после последней инфузии DARA. Все непредвиденные/транзиторные антитела, такие как аллоантитела и аутоантитела, представляют собой антитела, которые могут вызывать несовместимость при переливаниях крови. Транзиторные антитела наиболее часто относятся к типу IgG. Такая интерференция мешает рутинному тестированию перед переливанием и усложняет выбор подходящих единиц RBC (эритроцитов) для пациентов, получающих лечение DARA. Дополнительно к DARA два других CD38-специфичных антитела (изатуксимаб и MOR202) находятся на стадии клинических исследований, и несколько других находятся на доклинической разработке (van de Donk NW, *et al.* Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev.* 2016 Mar;270(1):95-112).

Для преодоления этой проблемы были разработаны и опубликованы различные решения. Каждое решение имеет свои преимущества и недостатки, которые описаны в Таблице 1 (Charuy C.I., *et al.* DARA-DTT Study Group* for the BEST Collaborative. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion.* 2016 Dec;56(12):2964-2972).

Таблица 1. Преимущества и недостатки современных способов минимизации интерференции анти-CD38

| ТАБЛИЦА 1. Преимущества и недостатки современных способов минимизации интерференции анти-CD38 | | | |
|--|--|--|---|
| Способ | Механизм минимизации | Преимущества | Недостатки |
| ДТТ (дителиотрейтол) ⁶ | Денатурирует CD38 на реагирующих клетках | Недорогой Довольно простой ДТТ используется в рутинной практике многих | Должен давать К-единицы Никогда не способен детектировать антитела к: KEL, DO, IN, JMН, KN, LW Часто не способен детектировать антитела к: YТ, LU, MER2, CROM ¹² |

| | | банков крови | |
|---|---|---|---|
| Трипсин ⁶ | Расщепляет CD38 на реагирующих клетках | Недорогой Довольно простой Детектирует антитела к группе антигенов KEL | Используется реже, чем DTT Никогда не способен детектировать антитела к: Vp ^a , Ch/Rg, XG, IN, JMН, M, N, En ^a TS, Ge2, Ge4, LU, MER2, KN, DO ¹² |
| Скрининг антител клеток пуповины (Cord cell) ⁸ | Сниженный уровень экспрессии CD38 на клетках пуповины | Недорогой Довольно простой Не требует никакой химической или ферментативной обработки | Не доступен в продаже Не практикуется для идентификации антител Никогда не способен детектировать антитела к: Le ^a , Ch/Rg, AnWj, Sd ^a Часто не способен детектировать антитела к: Le ^b , P1, Lu ^a , Lu ^b , Yt ^a , JMН, Xg ^a , Vel, Vg, KN, DO, Fy3 ¹² |
| Растворимый CD38 ^{6,7,13} | Нейтрализация анти-CD38 | Простой Не пропускает никаких антител Доступен в продаже Работает с любыми анти-CD38 | Дорогой Короткий период полужизни Требует дополнительной валидации |
| Анти-CD38 идиотип ^{6,7} | Нейтрализация анти-CD38 | Простой Не пропускает никаких антител | Не доступен в продаже Требует дополнительной валидации Требует разных анти-идиотипов для анти-CD38 от разных производителей |
| Сопоставление фенотипов | Не серологический | Входит в рутинную | Редко: клинически значимые антитела могут быть потеряны в |

| | | | |
|--------------------------------------|--------------------------|--|--|
| | способ | практику банков крови | зависимости от степени совпадения Исходное фенотипирование должно быть сделано до начала анти-CD38 Редко: даже с расширенным соответствием дополнительные клинически значимые антитела могут быть продуцированы Доступность соответствующих единиц и возможно увеличенное время для получения |
| Сопоставление генотипов ⁹ | Не серологический способ | Позволяет идентифицировать индивидуумы, не имеющие “высокочастотные” антигены (например, Yt ^a) Можно выполнять после начала лечения анти-CD38 | Дорогой Редко: результаты генотипирования не дают возможность правильно предсказать фенотип Редко: клинически значимые антитела могут быть потеряны в зависимости от степени соответствия Редко: даже с расширенным соответствием, дополнительные клинически значимые антитела могут быть получены Доступность соответствующих единиц и возможно увеличенное время для получения |

Нейтрализация анти-CD38 растворимой формой внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента (sCD38ecd, также называемого здесь sCD38) представляет собой привлекательный способ, так как он не повреждает никакой эпитоп на поверхности RBC, он может нейтрализовать любое антитело анти-CD38, и его осуществление в рутинных лабораторных тестах требует только инкубирования образца крови, плазмы и/или

сыворотки пациента с sCD38. Основным недостатком заключается в возможно высокой стоимости рекомбинантного sCD38ecd. Этот недостаток является субъективным, поскольку рекомбинантные белки широко используются в различных областях диагностики *in vitro* (IVD), что позволяет сохранять стоимость доступной для рутинного использования. Еще один возможный недостаток использования sCD38 заключается в разведении крови и/или плазмы пациента, которое происходит при нейтрализации анти-CD38 с использованием раствора sCD38, что может привести к потере клинически-значимых транзитных антител группы крови в последующем скрининге и/или идентификации антител. Следовательно, желательно иметь доступным sCD38 с высокой концентрацией, так чтобы требовались только маленькие объемы sCD38 при нейтрализации анти-CD38 антител в образце крови и/или плазмы пациента.

Альтернативные решения включают использование химических денатурирующих агентов для обработки RBC, которые оказывают очень широкое и неспецифическое действие. В настоящее время способ выбора для устранения интерференции DARA представляет собой обработку RBC посредством DTT, вызывающая уменьшение CD38, так что он не распознается антителами DARA. Однако, эта обработка также разрушает некоторые другие антигены групп крови, антитела к которым больше не могут быть определены и идентифицированы на соответствующих клетках. Например, обработка RBC в наборе Reagent Red Blood Cells восстанавливающим агентом дитиотрейтолом (DTT) и повторная постановка теста фактически устраняет присоединение DARA к CD38 на поверхности эритроцитов. Однако, DTT инактивирует и разрушает несколько антигенов на поверхности эритроцитов путем неспецифического разрушения дисульфидных связей, например, системы антигенов Kell, которая важна для типирования крови и реакций переливания.

Напротив, sCD38 не повреждает никакие эпитопы на поверхности RBC и может нейтрализовать любое антитело анти-CD38, при условии что sCD38 содержит один или более чем один эпитоп, с которым может связываться антитело анти-CD38.

Настоящее изобретение относится к композициям, способам и/или наборам, содержащим рекомбинантный sCD38 человека и его фрагменты. Также настоящее изобретение относится к композициям, способам и/или наборам, содержащим рекомбинантный sCD38 человека и его фрагменты, экспрессируемые в эукариотических и/или прокариотических системах экспрессии.

В некоторых воплощениях рекомбинантный sCD38 и/или его фрагмент переводят в растворимую форму способами, известными в данной области техники. В некоторых

воплощениях предложен разработанный авторами настоящего изобретения рекомбинантный sCD38 в качестве блокатора интерференции с DARA и/или другими терапевтическими антителами анти-CD38, находящимися в разработке. Следовательно, некоторые воплощения настоящего изобретения относятся к рекомбинантному sCD38 и/или его фрагментам для интерференции с одним или более чем одним антителом, которое связывается с CD38. В некоторых воплощениях рекомбинантный sCD38 и/или его фрагменты интерферируют с одним или более чем одним поликлональным антителом, которое связывается с CD38. В некоторых воплощениях рекомбинантный sCD38 и/или его фрагменты интерферируют с одним или более чем одним моноклональным антителом, которое связывается с CD38. В некоторых воплощениях рекомбинантный sCD38 и/или его фрагменты интерферируют с одним или более чем одним поликлональным и моноклональным антителом, которое связывается с CD38. В некоторых воплощениях рекомбинантный sCD38 и/или его фрагмент интерферирует с одним или более чем одним белком, который связывается с CD38.

Некоторые воплощения настоящего изобретения относятся к рекомбинантному белку sCD38 и/или его фрагменту, который интерферирует со связыванием DARA. В некоторых воплощениях рекомбинантный sCD38 и/или его фрагменты интерферируют со связыванием изатуксимаба. В некоторых воплощениях рекомбинантный sCD38 и/или его фрагменты интерферируют со связыванием MOR202. В некоторых воплощениях рекомбинантный sCD38 и/или его фрагменты интерферируют со связыванием одного или более чем одного из DARA, изатуксимаба или MOR202. В некоторых воплощениях sCD38 и/или его фрагмент относится к белку CD38 человека и/или его фрагментам. В некоторых воплощениях sCD38 и/или его фрагмент относится к белку CD38, происходящему не от человека. Неограничивающие примеры источников CD38, отличных от человека, включают собак, кошек, кроликов, мышей, морских свинок, обезьян, коров, овец, коз, зебру и так далее.

В некоторых воплощениях CD38ecd (экспрессируемый как sCD38) является таким, как раскрыто на Фиг. 6. В некоторых воплощениях CD38ecd (экспрессируемый как sCD38) является таким, как раскрыто в SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях CD38ecd представляет собой фрагмент белка CD38, содержащий остатки с 45 по 300 (SEQ ID NO: 1) аминокислотной последовательности CD38 человека согласно UniProt # P28907. В некоторых воплощениях CD38ecd представляет собой фрагмент части белка CD38, для которого предсказано, что он экспонируется на клеточной поверхности при экспрессии в естественных условиях на клеточной поверхности. В некоторых воплощениях CD38ecd

представляет собой предполагаемый внеклеточный домен белка CD38, экспрессируемый в естественных условиях на клеточной поверхности.

Некоторые воплощения настоящего изобретения относятся к экспрессии CD38ecd (SEQ ID NO: 1) как sCD38, где CD38ecd (SEQ ID NO: 1) представляет собой часть белка CD38 человека, для которой предсказано, что она экспонируется на клеточной поверхности. В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к экспрессии фрагмента CD38ecd (SEQ ID NO: 1) как sCD38, где CD38ecd (SEQ ID NO: 1) представляет собой часть белка CD38 человека, для которой предсказано, что она экспонируется на клеточной поверхности.

Специалисту в данной области техники понятно, что рекомбинантный CD38ecd или его фрагмент может экспрессироваться с использованием одной или более чем одной системы экспрессии, известной в данной области техники. Неограничивающие примеры включают бактериальные системы экспрессии и/или эукариотические системы экспрессии, включая, без ограничения, клетки насекомых, дрожжи и типы клеток млекопитающих.

В некоторых воплощениях система экспрессии представляет собой эукариотическую систему экспрессии, включающую клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых и так далее. В некоторых воплощениях эукариотическая система экспрессии выбрана из группы, состоящей из клеток CHO, HEK, BHK, NSO, Sp2/0, COS, C127, HT-10780, PER.C6, HeLa и/или Jurkat. В некоторых воплощениях неограничивающие преимущества эукариотической системы экспрессии (например, включающей клетки млекопитающих), относящиеся к экспрессии sCD38 или его фрагментов, включают корректный фолдинг sCD38 или его фрагментов для связывания с антителами анти-CD38, правильные посттрансляционные модификации, подходящий сортинг в компартменты секреторного пути, подходящие функциональные свойства и так далее.

В некоторых воплощениях sCD38 экспрессируется в форме слитого белка, содержащего фрагмент Fc иммуноглобулина IgG1, как показано на Фиг. 1 (обозначен здесь как CD38ecd-Fc-10H; SEQ ID NO: 7). В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый искусственно сконструированной нуклеиновой кислотой, кодирующей фрагмент константной области иммуноглобулина IgG2. В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый искусственно сконструированной нуклеиновой кислотой, кодирующей фрагмент константной области иммуноглобулина IgG2. В

некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый искусственно сконструированной нуклеиновой кислотой, кодирующей фрагмент константной области иммуноглобулина IgG3. В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый искусственно сконструированной нуклеиновой кислотой, кодирующей фрагмент константной области иммуноглобулина IgG4. В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый искусственно сконструированной нуклеиновой кислотой, кодирующей фрагмент константной области иммуноглобулина любого из вышеупомянутых изотипов IgG с шарнирной областью, измененной таким образом, чтобы экспрессировался мономерный Fc-гибрид (Fc-fusion). В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H содержит CD38ecd, слитый с N-концом SEQ ID NO: 5 (Фиг. 10), содержащим фрагмент константной области иммуноглобулина IgG, содержащего шарнирную область, домен CH2 и домен CH3, на C-конце которого пришита метка из 10 остатков гистидина и стоп-кодон. В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H экспрессируется на клеточной поверхности. В некоторых воплощениях константная область IgG1 мыши улучшает одно или более чем одно из экспрессии, растворимости и стабильности экспрессированного белка. В некоторых воплощениях константная область IgG1 мыши улучшает одно или более чем одно из экспрессии, растворимости и стабильности белка, экспрессированного на клеточной поверхности. В некоторых воплощениях His-метка делает возможной очистку CD38ecd-Fc-10H путем очистки методом аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла (ИМАС).

Как используют здесь, “нуклеиновая кислота” может быть на основе ДНК, на основе РНК или представлять собой их комбинацию. Неограничивающие примеры включают плазмиды, космиды, фазы, вирусные векторы, аденовирусные векторы, миникольца, модифицированные нуклеиновые кислоты, аналоги нуклеиновых кислот и так далее, которые хорошо известны в данной области техники. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота сконструирована для эффективной экспрессии или белка, пептида или и того, и другого в эукариотической системе экспрессии, прокариотической системе экспрессии или и той, и другой. Также в объем изобретения включены вакцинные векторы на основе нуклеиновых кислот. Неограничивающие примеры включают ДНК-вакцинные векторы, РНК-вакцинные векторы, вакцинные векторы на основе вирусов (например, вакцинные векторы на основе аденоассоциированных вирусов) и так далее.

Без ограничения какой-либо теорией, в данной области техники считают, что естественным состоянием для CD38 в мембране является димер и/или тетрамер (Bruzzone S *et al.* Dimeric and tetrameric forms of catalytically active transmembrane CD38 in transfected HeLa cells. *FEBS Lett.* 1998 Aug 21;433(3):275-8). В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H экспрессируется в виде димерного белка. В некоторых воплощениях этот димерный белок представляет собой гомодимер CD38ecd-Fc-10H. В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H может экспрессироваться в форме олигомерного белка, содержащего более чем две копии CD38ecd-Fc-10H. В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H экспрессируется в форме олигомерного белка. В некоторых воплощениях CD38ecd-Fc-10H экспрессируется в форме олигомерного белка, содержащего от двух копий CD38ecd-Fc-10H до 12 копий CD38ecd-Fc-10H. В некоторых воплощениях His-метка делает возможной очистку CD38ecd-Fc-10H путем очистки методом ИМАС.

В некоторых воплощениях sCD38 экспрессируется в форме слитого белка, как показано на Фиг. 2 (обозначенного здесь как CD38ecd-10H; SEQ ID NO: 8). В некоторых воплощениях CD38ecd-10H представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый искусственно сконструированной нуклеиновой кислотой, кодирующей CD38ecd с His-меткой (то есть меткой, содержащей 10 остатков гистидина). В некоторых воплощениях His-метка делает возможной очистку CD38ecd-10H путем очистки методом ИМАС.

В некоторых воплощениях активность олигомерного CD38ecd-Fc-10H лучше, чем активность мономерного CD38ecd-10H в растворе, на твердой поверхности или в обоих случаях. В некоторых воплощениях термин “активность” относится к способности sCD38 нейтрализовать антитело анти-CD38. В некоторых воплощениях термин “активность” относится к способности sCD38 нейтрализовать один или более чем один эффект, относящийся к антителу анти-CD38 на твердой поверхности или в растворе, или в обоих случаях. В некоторых воплощениях эффективность/продуктивность этой “активности” находится в диапазоне от примерно более 70% до примерно 100%. В некоторых воплощениях эффективность/продуктивность этой “активности” составляет примерно 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% или величину в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых значений. В некоторых воплощениях эффективность/продуктивность этой “активности” находится в диапазоне от примерно более 90% до 100%. В некоторых воплощениях эффективность/продуктивность этой “активности” составляет примерно более 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 98,5; 99; 99,5 или 100% или величину в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых значений.

В некоторых воплощениях sCD38 экспрессируется в бактериальной системе экспрессии. В некоторых воплощениях неограничивающие преимущества бактериальной системы экспрессии включают более дешевую стоимость при сохранении функциональных свойств эукариотического белка. В некоторых воплощениях система экспрессии представляет собой бактериальную систему экспрессии. В некоторых воплощениях sCD38 экспрессируется в форме слитого белка, как показано на Фиг. 3 (обозначенного здесь 10H-MBPt-CD38ecd; SEQ ID NO: 9). В некоторых воплощениях 10H-MBPt-CD38ecd представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый искусственно сконструированной нуклеиновой кислотой, кодирующей CD38ecd, к N-концу которого пришта метка 10H-MBPt (SEQ ID NO: 6; Фиг. 11 или SEQ ID NO: 19), содержащая 10 остатков гистидина и полноразмерный бактериальный мальтоза-связывающий белок (MBP) (Uniprot # P0AEX9; аминокислотные остатки 29-393). В некоторых воплощениях метку из 10 остатков гистидина используют для очистки методом ИМАС. В некоторых воплощениях MBP улучшает одно или более чем одно из экспрессии, растворимости или фолдинга.

В некоторых воплощениях 10H-MBPt-CD38ecd содержит последовательность для расщепления протеазой вируса табачной мозаики (TEV). В некоторых воплощениях 10H-MBPt-CD38ecd содержит последовательность для расщепления протеазой TEV между MBP и CD38ecd (Фиг. 3). В некоторых воплощениях последовательность для расщепления протеазой TEV между MBP и CD38ecd дает возможность отщепления 10H-MBP от CD38ecd, давая в результате очищенный CD38ecd без каких-либо дополнительных последовательностей.

Один или более чем один сайт расщепления протеазой или не протеазой также предусмотрены. Неограничивающие примеры включают протеазу вируса ящура (FMDV), протеиназу Arg-C, эндопептидазу Asp-N, BNPS-скатол, каспазы, химотрипсин высокой специфичности, химотрипсин низкой специфичности, клострипаин (клостридиопептидазу B), CNBr, энтерокиназу, фактор Ха, муравьиную кислоту, глутамилэндопептидазу, гранзим B, гидроксилламин, йодобензойную кислоту, LysC, LysN, NTCB (2-нитро-5-тиоцианобензойную кислоту), эластазу нейтрофилов, пепсин, пролинэндопептидазу, протеиназу K, стафилококковую пептидазу I, термолизин, тромбин, трипсин и другие сайт-специфические ферменты, известные специалисту в данной области техники.

В некоторых воплощениях sCD38 экспрессируется в форме слитого белка, как показано на Фиг. 4 (обозначенного здесь как 10Ht-CD38ecd; SEQ ID NO: 10). В некоторых воплощениях 10Ht-CD38ecd представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый

искусственно сконструированной нуклеиновой кислотой, кодирующей CD38ecd, к N-концу которого пришта метка, содержащая 10 остатков гистидина. В некоторых воплощениях метку из 10 остатков гистидина используют для очистки методом ИМАС. В некоторых воплощениях 10Н-CD38ecd содержит последовательность для расщепления протеазой вируса табачной мозаики (TEV). В некоторых воплощениях 10Н-CD38ecd содержит последовательность расщепления для протеазы TEV между 10Н и CD38ecd (Фиг. 4). В некоторых воплощениях последовательность для расщепления протеазой TEV между 10Н и CD38ecd дает возможность отщепления 10Н от CD38ecd, давая в результате очищенный CD38ecd без каких-либо дополнительных последовательностей.

В некоторых воплощениях sCD38 экспрессируется в форме слитого белка, как показано на Фиг. 5 (обозначенного здесь как 10Н-MBPt-DARA-эпитопы; SEQ ID NO: 11). В некоторых воплощениях 10Н-MBPt-DARA-эпитопы представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый искусственно сконструированной нуклеиновой кислотой, кодирующей содержащую аминокислотную последовательность (остатки от 230 до 280 Uniprot # P28907; как показано в SEQ ID NO: 2) человеческого CD38, содержащего два эпитопа DARA, к N-концу которого присоединена метка из 10 остатков гистидина и мальтоза-связывающий белок, как показано на Фиг. 5. В некоторых воплощениях два эпитопа DARA представляют собой DARAepitope #1 (Uniprot # P28907 от 235 до 246 остатка; как показано в SEQ ID NO: 3) и DARAepitope #2 (Uniprot # P28907 от 267 до 280 остатка; как показано в SEQ ID NO: 4).

В некоторых воплощениях один или более чем один эпитоп sCD38 может связываться с антителом анти-CD38 с измеримой аффинностью от примерно 10^{-6} (аффинность пептида) до 10^{-10} (очень сильная аффинность антитела).

В некоторых воплощениях метку из 10 остатков гистидина используют для очистки методом ИМАС. В некоторых воплощениях 10Н-MBPt-DARA-эпитопы содержит последовательность для расщепления протеазой вируса табачной мозаики (TEV). В некоторых воплощениях 10Н-MBPt-DARA-эпитопы содержит последовательность для расщепления протеазой TEV между MBP и DARA-эпитопами (Фиг. 5). В некоторых воплощениях последовательность для расщепления протеазой TEV между MBP и DARA-эпитопами дает возможность отщепления 10Н-MBP от DARA-эпитопов, давая в результате очищенные DARA-эпитопы без каких-либо дополнительных последовательностей. В некоторых воплощениях MBP улучшает одно или более чем одно из экспрессии, растворимости или фолдинга.

В некоторых воплощениях фрагмент sCD38 представляет собой один или более чем один эпитоп в CD38ecd, с которым связывается одно или более чем одно поликлональное и/или моноклональное антитело анти-CD38. В некоторых воплощениях размер sCD38 и/или его фрагмента находится в диапазоне от примерно 5 аминокислот до примерно 300 аминокислот. В некоторых воплощениях этот размер находится в диапазоне от примерно 10 до примерно 150 аминокислот. В некоторых воплощениях размер составляет примерно 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 аминокислот или значение в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых значений.

Одну или более чем одну другую метку для очистки, растворения, детекции и тому подобного также рассматривают. Неограничивающие примеры включают GST, SUMO, AviTag, кальмодулиновую метку, полиглутаматную метку, E-метку, FLAG-метку, HA-метку, His-метку, Мус-метку, NE-метку, S-метку, SBP-метку, Softag 1, Softag 3, Strep-метку, метку TC, метку V5, VSV-метку, метку Xpress, Isopeptag, SpyTag, SnoopTag, ВССР (биотин-карбоксильный белок-носитель), глутатион-S-трансферазную метку, метку зеленым флуоресцентным белком, метку другими флуоресцентными белками, HaloTag, метку мальтоза-связывающим белком, Nus-метку, тиоредоксин-метку, Fc-метку, искусственные внутренне неупорядоченные метки, содержащие аминокислоты, вызывающие нарушение порядка (например, P, E, S, T, A, Q, G), метку Tu и так далее.

Настоящее изобретение относится к одной или более композициям, способам и/или наборам, содержащим любое одно или более из воплощений sCD38 и/или его фрагментов, описанных здесь, или их вариантов.

В некоторых воплощениях одна или более композиций, способов и/или наборов, содержащих sCD38 и/или его фрагменты, относится к универсальной предобработке крови, сыворотки и/или плазмы. В некоторых воплощениях предобработка минимизирует любую интерференцию антителом анти-CD38 в образце при детекции и/или идентификации транзиторных антител, а также других антител одним или более чем одним методом, известным специалисту в данной области техники.

В некоторых воплощениях интерференция антителом анти-CD38 включает одно или более чем одно из интерференции при перекрестной пробе на совместимость крови, интерференции при терапии антителами, агглютинации эритроцитов, интерференции при тестировании крови перед переливанием и тому подобного.

В некоторых воплощениях предобработка нейтрализует любое антитело анти-CD38, что делает возможной детекцию и/или идентификацию транзиторных антител, а также других антител в образце одним или более чем одним методом, известным

специалисту в данной области техники. Неограничивающие примеры одного или более чем одного метода, известного специалисту в данной области техники, включают традиционное тестирование в пробирках, многофункциональную карту (multicard), реакции иммуноагглютинации эритроцитов на твердой фазе, гелевые технологии, любые другие современные или будущие технологии для детекции/идентификации транзиторных антител.

Минимизация интерференции и/или нейтрализация антител анти-CD38 путем предобработки дает возможность детекции и/или идентификации транзиторных антител, а также других антител, которые являются релевантными и важными для тестирования совместимости. Следовательно, в некоторых воплощениях нейтрализацию анти-CD38 с помощью sCD38 и/или его фрагментов в образце плазмы, крови и/или сыворотки можно объединять с диагностическим применением, например, для скрининга антител, идентификации транзиторных антител групп крови и так далее.

В некоторых воплощениях sCD38 и/или его фрагменты можно использовать в качестве реагентов для предобработки при скрининге крови, скрининге плазмы, скрининге сыворотки или их комбинации на транзиторные антитела, а также другие антитела. В некоторых воплощениях sCD38 и/или его фрагменты можно использовать в качестве антигена в исследованиях по биомониторингу и диагностических тестах. Например, в некоторых воплощениях sCD38 и/или его фрагменты можно использовать в PROMONITOR® ELISA для тестирования биодоступности и иммуногенности лекарственных средств, например антител анти-CD38, таких как DARA, изатуксимаб или MOR202, у пациентов, которым прописана биологическая терапия для лечения хронических воспалительных заболеваний и других показаний (например, множественной миеломы). В некоторых воплощениях sCD38 можно использовать для семейства тестов PROMONITOR® для измерения как уровней лекарственного средства, так и уровней антител к лекарственным средствам валидированным ELISA. Брошюра для семейства тестов PROMONITOR® прилагается здесь как Приложение А.

В некоторых воплощениях эффективность минимизации интерференции и/или нейтрализации антител анти-CD38 путем предобработки можно тестировать с использованием одного или более чем одного метода, известного специалисту в данной области техники. Например, в некоторых воплощениях одну или более чем одну композицию, предложенную здесь, можно использовать в DG Gel®, уникальной 8-колоночной гелевой карте, основанной на технологии колоночной агглютинации для типирования групп крови и изучения непредвиденных антител. Таким образом, в

некоторых воплощениях предложенные здесь композиции можно использовать в качестве реагента в картах DG Gel® для тестирования эффективности нейтрализации анти-CD38. В некоторых воплощениях эта эффективность находится в диапазоне от примерно более 70% до примерно 100%. В некоторых воплощениях эффективность составляет примерно 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% или величину в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых воплощениях эффективность находится в диапазоне от примерно более 90% до 100%. В некоторых воплощениях эффективность составляет примерно более 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 98,5; 99; 99,5 или 100% или величину в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых воплощениях объем одной или более чем одной композиции, содержащей sCD38, используемой в картах DG Gel®, может находиться в диапазоне от примерно 0,1 мкл до примерно 40 мкл. В некоторых воплощениях объем композиций, содержащих sCD38, используемых в картах DG Gel®, может находиться в диапазоне от примерно 0,4 мкл до примерно 10 мкл. В некоторых воплощениях объем композиции, содержащей sCD38, используемой в картах DG Gel®, составляет примерно 2 мкл.

В некоторых воплощениях предложенные здесь композиции можно использовать в анализах для блокирования и/или нейтрализации одного или более чем одного из DARA, изатуксимаба или MOR202 в образцах крови, сыворотки и/или плазмы пациента.

В некоторых воплощениях композиции, способы и/или наборы, предложенные здесь, можно использовать в анализах для удаления одного или более чем одного антитела анти-CD38 из образцов крови, сыворотки и/или плазмы пациента. Например, образец от пациента, содержащий антитело анти-CD38, можно инкубировать с композицией, содержащей sCD38 и/или его фрагменты, содержащие одну или более чем одну метку, раскрытую здесь, обеспечивая возможность связывания меченого sCD38 и/или его фрагментов с антителом анти-CD38. Затем комплекс sCD38-анти-CD38 можно удалить одним или более чем одним методом аффинной хроматографии, известным специалисту в данной области техники.

В некоторых воплощениях меченый sCD38 и/или его фрагменты можно использовать для удаления анти-CD38 из плазмы, сыворотки и/или крови человека во время гемодиализа, перитонеального диализа, гемофильтрации, гемодиафильтрации, обменного переливания плазмы, плазмафереза, афереза и лейкоредукции. Например, меченый sCD38 и/или его фрагменты можно использовать для удаления одного или более

чем одного из DARA, изатуксимаба или MOR202 из образцов крови, сыворотки и/или плазмы пациента.

В некоторых воплощениях диапазон концентраций антитела анти-CD38 в образце находится в диапазоне от примерно 0,005 мкг/мл до примерно 2000 мкг/мл. В некоторых воплощениях диапазон концентраций антитела анти-CD38 в образце находится в диапазоне от примерно 0,05 мкг/мл до примерно 1000 мкг/мл. В некоторых воплощениях диапазон концентраций антитела анти-CD38 в образце находится в диапазоне от примерно 0,05 мкг/мл до примерно 500 мкг/мл. В некоторых воплощениях диапазон концентраций антитела анти-CD38 в образце находится в диапазоне от примерно 0,05 мкг/мл до примерно 20 мкг/мл. В некоторых воплощениях диапазон концентраций антитела анти-CD38 в образце находится в диапазоне от примерно 0,05 мкг/мл до примерно 100 мкг/мл. В некоторых воплощениях диапазон концентраций антитела анти-CD38 в образце составляет примерно 0,005; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 25; 50; 75; 100; 150; 250; 300; 400; 500; 750; 1000; 1500 или 2000 мкг/мл или величину в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений. В других воплощениях диапазон концентраций антитела анти-CD38 в образце находится в диапазоне от примерно 0,05 мкг/мл до примерно 2000 мкг/мл.

В некоторых воплощениях объем одной или более чем одной композиции, содержащей sCD38 и/или его фрагменты, используемой в способах и/или наборах, раскрытых здесь, может находиться в диапазоне от примерно 0,05 мкл до примерно 50 мкл. В некоторых воплощениях объем одной или более чем одной композиции, содержащей sCD38 и/или его фрагменты, используемой в способах и/или наборах, раскрытых здесь, может находиться в диапазоне от примерно 0,25 мкл до примерно 10 мкл. В некоторых воплощениях объем одной или более чем одной композиции, содержащей sCD38, используемой в способах и/или наборах, раскрытых здесь, составляет примерно 2 мкл.

В некоторых воплощениях объем образца (например крови, плазмы, сыворотки и так далее) может находиться в диапазоне от примерно 1 мкл до примерно 100 мкл. В некоторых воплощениях объем образца (например крови, плазмы, сыворотки и так далее) может находиться в диапазоне от примерно 100 мкл до примерно 5 мл. В некоторых воплощениях объем образца (например крови, плазмы, сыворотки и так далее) может находиться в диапазоне от примерно 5 мл до примерно 500 мл. В некоторых воплощениях объем образца (например крови, плазмы, сыворотки и так далее) может находиться в диапазоне от примерно 250 мл до примерно 10000 мл. В некоторых воплощениях объем

образца (например крови, плазмы, сыворотки и так далее) может находиться в диапазоне от примерно 25 мкл до примерно 250 мкл.

В некоторых воплощениях концентрация sCD38 и/или его фрагментов в композициях, предложенных здесь, может находиться в диапазоне от примерно 0,25 мг/мл до примерно 400 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация sCD38 и/или его фрагментов в композициях и композициях в составе наборов, предложенных здесь, находится в диапазоне от примерно 4 мг/мл до примерно 100 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация sCD38 и/или его фрагментов в композициях, предложенных здесь, составляет примерно 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275; 300; 325; 350; 375 или 400 мг/мл или величину в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых воплощениях концентрация sCD38 и/или его фрагментов в композициях, предложенных здесь, составляет примерно 20 мг/мл.

В некоторых воплощениях диапазон концентраций sCD38 и/или его фрагментов для оптимального ингибирования анти-CD38 составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 500 мг/мл. В некоторых воплощениях диапазон концентраций sCD38 и/или его фрагментов для оптимального ингибирования анти-CD38 составляет от примерно 5 мг/мл до примерно 100 мг/мл.

В некоторых воплощениях стабильность воплощений sCD38 и/или его фрагментов по настоящему изобретению находится в диапазоне от примерно 30 суток до примерно 300 суток при 37°C. В некоторых воплощениях стабильность sCD38 и/или его фрагментов находится в диапазоне от примерно 6 месяцев до примерно 48 месяцев при 2-8°C.

В некоторых воплощениях композиции, раскрытые здесь, могут быть предложены в форме одного или более чем одного набора.

В некоторых воплощениях композиции и композиции в составе наборов предложены в жидкой, твердой или полутвердой форме. Неограничивающие примеры включают капсулу, таблетку, суппозиторий, вкладыш, облатку, гранулу, пеллету, шарик, пилюлю, саше, спрей, пленку, крем, гель, сироп, восстанавливаемую твердую форму, суспензию, эмульсию, пастилку, порошок, тритурат, пластинку и так далее.

В некоторых воплощениях композиции и композиции в составе наборов содержат активные ингредиенты, неактивные ингредиенты, эксципиенты, добавки и/или фармацевтически приемлемые носители. Неограничивающие примеры включают полимерные соединения, неорганические соли, аминокислоты (неограничивающие примеры включают аргинин, гистидин, пролин и так далее), связывающие вещества, смазывающие

вещества, разрыхлители, поверхностно-активные вещества, загустители, агенты-покрытия, регуляторы pH, антиоксиданты, ароматизаторы, консерванты, красители и так далее. Неограничивающие примеры других фармацевтически приемлемых носителей включают жидкие носители, такие как вода, спирт, эмульсия, и твердые носители, такие как гель, порошок и так далее. В некоторых воплощениях композиции и композиции в составе наборов могут содержать подходящие соли и буферы, обеспечивающие стабильность носителей для доставки и возможность захвата клетками-мишенями.

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемые носители могут включать одно или более из следующего: растворитель, буфер, раствор, диспергирующую среду, покрытие, антибактериальное или противогрибковое средство, металлохелат (например EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)), изотонический агент и агент, замедляющий абсорбцию, и им подобные.

Водные композиции и композиции в составе наборов содержат эффективное количество sCD38 и/или его фрагмента (например, такого как белок, нуклеиновая кислота или и то, и другое) в носителе для доставки (например, липосомах, наночастицах или других комплексах), растворенное или диспергированное в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде. Другие эксципиенты включают растворимый в воде полимер, нерастворимые в воде полимеры, гидрофобные материалы, гидрофильные материалы, воска, разрыхлители, суперразрыхлители, разбавители, связывающие вещества и так далее.

Как его используют здесь, термин “субъект” или “пациент” относится к любому позвоночному, включая, без ограничения, человека, приматов, не являющихся человеком, домашний скот, овец, свиней, коз, лошадей, собак, кошек, мышей, крыс, морских свинок, куриц, индюков, уток, гусей. В некоторых воплощениях субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека. В некоторых воплощениях субъект принадлежит к мужскому или женскому роду.

ОЛИГОМЕРИЗАЦИОННАЯ МЕТКА ДЛЯ СЛИТЫХ БЕЛКОВ

Настоящее изобретение также относится к слитым белкам, содержащим олигомеризационную метку, и способам олигомеризации рекомбинантного слитого белка. Также настоящее изобретение относится к олигомеризационным меткам для рекомбинантных слитых белков, содержащих Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент и домен polyHis.

Слитые белки возможно могут быть слиты с олигомеризационной меткой для образования олигомеров, таких как димеры, тримеры, тетрамеры, пентамеры и/или

олигомеры более высокого порядка. Олигомеризационная метка может способствовать определенной стехиометрии, например, димерам, тримерам, тетрамерам или пентамерам, или олигомеризационная метка может давать возможность распределения олигомеров с различной стехиометрией. Олигомеризационная метка может быть разработана для образования гомоолигомеров, хотя различие между гомоолигомерами и гетероолигомерами специально не ограничено. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка способна образовывать гомодимер, гомотример, гомотетрамер или гомопентамер, например, когда олигомеризация рекомбинантного полипептида дает в результате преимущественно монодисперсный олигомер. Олигомеризационная метка обеспечивает несколько преимуществ для слитых белков, которые используют в анализах. Олигомеризационная метка может ориентировать рекомбинантные полипептиды друг относительно друга. Также олигомеризационная метка может увеличивать аффинность рекомбинантного полипептида к мишени. Также олигомеризационная метка может увеличивать авидность рекомбинантного полипептида, которая относится к функциональному “накоплению” аффинности со множеством связывающих групп.

В некоторых воплощениях слитый белок содержит рекомбинантный полипептид, слитый с олигомеризационной меткой. В некоторых воплощениях последовательность рекомбинантного полипептида и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка содержит Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент и домен polyHis. В некоторых воплощениях последовательность слитого белка и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21.

В некоторых воплощениях домен polyHis представляет собой домен очистки, слитый с рекомбинантным белком. В некоторых воплощениях домен polyHis представляет собой аффинную метку, слитую с рекомбинантным белком. В некоторых воплощениях домен polyHis представляет собой олигомеризационную метку, слитую с рекомбинантным белком. В некоторых воплощениях домен polyHis содержится внутри олигомеризационной метки вместе с другими доменами. В некоторых воплощениях домен polyHis содержится внутри олигомеризационной метки вместе с Fc-фрагментом иммуноглобулина или его фрагментом. Согласно воплощениям, изложенным здесь, домен polyHis обычно содержит от 2 до 24 остатков гистидина. В некоторых воплощениях домен polyHis содержит от 6 до 12 остатков гистидина. Согласно воплощениям, изложенным здесь, домен polyHis, обычно содержит 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 остатков гистидина.

В некоторых воплощениях слитый белок по настоящему изобретению экспрессируется слитым с олигомеризационной меткой, содержащей Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка включает аминокислотную последовательность шарнирной области Fc-фрагмента иммуноглобулина. В некоторых воплощениях слитый белок по настоящему изобретению экспрессируется слитым с олигомеризационной меткой, содержащей Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка содержит константную область иммуноглобулина IgG1. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка содержит константную область иммуноглобулина IgG2. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка содержит константную область иммуноглобулина IgG3. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка содержит константную область иммуноглобулина IgG4. В некоторых воплощениях олигомеризационная метка содержит фрагмент константной области иммуноглобулина любого из вышеупомянутых изотипов IgG с измененной шарнирной областью, так что экспрессируется мономерный Fc-гибрид (Fc-fusion). В некоторых воплощениях олигомеризационная метка содержит фрагмент константной области иммуноглобулина IgG, содержащий шарнирную область, домен CH2 и домен CH3, С-конец которого слит с доменом polyHis и стоп-кодоном.

Виды Fc-фрагмента иммуноглобулина могут быть выбраны на основании желаемого применения слитого белка. Например, виды Fc-фрагмента иммуноглобулина могут быть выбраны так, чтобы определенный реагент в исследовании либо был нацелен на Fc-фрагмент иммуноглобулина, либо игнорировал его. Fc-домен мыши может быть полезным, например, если никакие вторичные антитела против антител мыши не используют в исследовании для детекции других мышинных антител. Сходным образом, Fc-домен мыши может быть полезным для поперечной сшивки слитого белка с твердой подложкой или другим компонентом исследования с использованием антитела против антител мыши. Виды Fc-домена могут принадлежать человеку, мыши, кролику, крысе, хомяку, морской свинке, козе, овце, лошади, курице или представлять собой гибрид любых из вышеперечисленных видов, хотя виды Fc-домена специально не ограничены.

Пример олигомеризационной метки представляет собой Fc-домен IgG мыши, содержащий шарнирную область, который дает возможность рекомбинантным полипептидам, содержащим эту олигомеризационную метку, образовывать ковалентно связанный гомодимер.

В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность Fc-фрагмента олигомеризационной метки представляет собой SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина имеет от 90% до 100% идентичности с SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 15.

В дополнение к полезным качествам олигомеризационных меток, описанным выше, Fc-домены часто повышают уровень экспрессии и/или секреции рекомбинантного полипептида в клетках, в которых он экспрессируется.

Также Fc-домены могут способствовать очистке рекомбинантного полипептида, поскольку способы очистки полипептидов, содержащих Fc-домены, хорошо известны.

Другие олигомеризационные метки известны в данной области техники, и выбор определенной олигомеризационной метки специально не ограничен. В некоторых воплощениях слитый белок по настоящему изобретению содержит рекомбинантный полипептид и/или его фрагмент. В некоторых воплощениях рекомбинантный полипептид и/или его фрагмент представляет собой любой белок, представляющий интерес, который может быть слит с олигомеризационной меткой по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях рекомбинантный полипептид представляет собой рекомбинантную растворимую форму внеклеточного домена CD38 или его фрагмента. В некоторых воплощениях рекомбинантный полипептид представляет собой модифицированный внеклеточный домен CD47 или его фрагмент. В некоторых воплощениях рекомбинантный полипептид представляет собой модифицированный внеклеточный домен тромбоцитарного гликопротеина Ib (GpIb) или его фрагмент. В некоторых воплощениях последовательность рекомбинантного полипептида и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

В некоторых воплощениях последовательность олигомеризационной метки выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В некоторых воплощениях олигомеризационная метка дополнительно содержит участок или домен с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30.

Также настоящее изобретение относится к способам олигомеризации рекомбинантного слитого белка. В некоторых воплощениях способ олигомеризации рекомбинантного слитого белка включает стадии: а) генетического слияния нуклеотидной последовательности, кодирующей олигомеризационную метку согласно воплощениям настоящего изобретения, с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид; б) экспрессии нуклеотидной последовательности, полученной на стадии а) в клетке-хозяине; в) очистки рекомбинантного слитого белка, полученного на стадии б).

В некоторых воплощениях олигомеризационная метка, используемая в способе олигомеризации рекомбинантного слитого белка, содержит Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент и домен polyHis. В некоторых воплощениях домен polyHis содержит от 2 до 24 остатков гистидина. В некоторых воплощениях домен polyHis содержит от 6 до 12 остатков гистидина. Домен polyHis согласно воплощениям настоящего изобретения, обычно содержит 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 остатков гистидина. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность Fc-фрагмента олигомеризационной метки, используемой в способе олигомеризации рекомбинантного слитого белка, представляет собой SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина имеет от 90% до 100% идентичности с SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 15.

В некоторых воплощениях последовательность олигомеризационной метки, используемой в способе олигомеризации рекомбинантного слитого белка, выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В некоторых воплощениях олигомеризационная метка, используемая в способе олигомеризации рекомбинантного слитого белка, дополнительно содержит участок или домен с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30.

В некоторых воплощениях последовательность рекомбинантного слитого белка, полученного на стадии в) способа олигомеризации рекомбинантного слитого белка, раскрытого здесь, выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21.

ПРИМЕРЫ

Следующие Примеры являются неограничивающими, и специалист в данной области техники понимает, что другие варианты включены в объем настоящего изобретения.

Пример 1

Множество вариантов белка CD38 было сконструировано с целью воссоздать корректный фолдинг CD38ecd и блокировать терапевтические mAb так, чтобы они не вызывали проблем в анализе на определение транзиторных антител. Один вариант представлял собой мономерный внеклеточный домен, слитый с аффинной меткой (CD38ecd-10His). Во втором варианте, гибриде CD38ecd-Fc, CD38ecd был слит с мышинным Fc-фрагментом (шарнир-CH2-CH3), что таким образом создает димерные варианты (дублет), удерживаемые вместе Fc-фрагментом. В другом варианте, гибриде CD38ecd-Fc-10H, CD38ecd был слит с олигомеризационной меткой, которая таким образом создает мультимерные варианты. В еще одном варианте, CD38ecd-Clath, CD38ecd был слит с доменом клатрина. Домен клатрина дает возможность тримеризации. Еще один вариант, CD38ecd-p53, включал слияние с доменом p53. Известно, что домен p53 вызывает тетрамеризацию. Во всех случаях это новые композиции, не обнаруживаемые в природе. Эти варианты экспрессировали в клетках млекопитающих для того, чтобы сохранить все посттрансляционные модификации, существенные для поддержания функции CD38.

Пример 2

Рекомбинантный белок CD38 доступен в продаже от нескольких компаний для применения в научных исследованиях. Однако количество и стоимость доступного в продаже CD38 является чрезмерно высокой для многих целей. Попытки других компаний получить рекомбинантный CD38 имели трудности, включая проблемы растворимости, достижения высокой концентрации и авидности эпитопов путем создания каркаса (scaffolding), и ни один из этих доступных в продаже белков CD38 не имеет такого состава белков CD38 и/или его фрагментов как предложено здесь.

Начальные тесты с системами экспрессии, описанными здесь, показывают, что CD38ecd-Fc-10H был растворимым и функциональным. Важно, что рекомбинантный CD38ecd-Fc-10H был растворимым в высоких концентрациях (вплоть до 35 мг/мл), что позволяет использовать всего 2 мкл концентрированного раствора CD38ecd Fc в картах DG Gel®.

Пример 3. Титры анти-CD38 в образцах от пациентов

Цель этого эксперимента заключалась в том, чтобы установить минимальное количество белка CD38ecd-Fc-10H, необходимое для ингибирования и полной нейтрализации в целом антитела анти-CD38 неизвестной концентрации и титра, обнаруженных в образцах плазмы пациентов, для полной элиминации эффекта антитела анти-CD38. Плазму от трех пациентов после обработки анти-CD38 титровали в непрямом антиглобулиновом тесте (IAT) с доступным в продаже эритроцитарным реагентом (“Reagent Red Blood Cell”) для скрининга антител. Эксперимент проводили следующим образом:

Титрование плазмы: 75 мкл плазмы, содержащей анти-CD38, от каждого пациента арифметически титровали в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), pH 7,4 до 1:8192.

Скрининг антител: 50 мкл из одной лунки Screen-Cyte 0,8% (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл плазмы соответствующего титра пипетированием вносили в инкубационную камеру микроколоники в карте DG Gel Coombs (Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты.

Установленные титры находились в диапазоне от 1:1 до 1:4096. Было сделано заключение, что для эффективной предобработки плазмы пациентов с sCD38 титр анти-CD38 по меньшей мере 1:2048, лучше 1:8192, должен быть нейтрализован.

Пример 4. sCD38 ингибирует антитела анти-CD38

Пример 4а: ингибирование с использованием препарата, содержащего 2,2 мг/мл CD38ecd-Fc-10H

Подготовка образца (тест ингибирования): 25 мкл плазмы от пациента 1, содержащей анти-CD38, неразведенной или арифметически оттитрованной в PBS, pH 7,4, инкубировали с 2-32 мкл препарата, содержащего 2,2 мг/мл CD38ecd-Fc-10H, и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. В качестве контрольного эксперимента вместо CD38ecd-Fc-10H в плазму пипетированием вносили от 2 мкл до 32 мкл PBS, pH 7,4.

Скрининг антител: 50 мкл Screen-Cyte 0,8% Лунка #3, лот 17005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл плазмы, предобработанной как описано выше, пипетированием вносили в инкубационную камеру микроколоники в карте DG Gel Coombs (lot 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. Полностью отрицательный результат (плоская “пуговка” клеток на дне микроколоники) являлся показателем полного ингибирования анти-CD38, присутствующего в образце от пациента.

2 мкл CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPSPBS смогли полностью ингибировать разведение плазмы 1:16. 32 мкл 2,2 мг/мл CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPSPBS смогли полностью ингибировать анти-CD38 в неразведенной плазме.

Пример 4б: ингибирование с использованием препарата, содержащего 35 мг/мл CD38ecd-Fc-10H

Подготовка образца (тест ингибирования): 25 мкл плазмы пациента 2, содержащей анти-CD38 (показывающей титр анти-CD38 1:4096), инкубировали с 2 мкл 35 мг/мл CD38ecd-Fc-10H и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. В качестве контрольного эксперимента вместо CD38ecd-Fc-10H в плазму пипетированием вносили 2 мкл PBS, pH 7,4.

Скрининг антител: 50 мкл из каждой лунки Screen-Cyte 0,8%, lot 17017 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл плазмы, предобработанной как описано выше, пипетированием вносили в инкубационную камеру микроколони в карте DG Gel Coombs (lot 16681.01 exp 2017-11; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. Полностью отрицательный результат (плоская “пуговка” клеток на дне микроколони) являлся показателем полного ингибирования анти-CD38, присутствующего в образце от пациента.

2 мкл CD38ecd-Fc10H-20170915-PROTA смогли полностью ингибировать плазму от пациента 2.

Пример 4в: ингибирование имитированной плазмы пациента с DARA (0,5 мг/мл) с использованием препарата, содержащего 33 мг/мл CD38ecd-Fc-10H

Получение имитированной плазмы пациента с добавлением DARA: терапевтическое лекарственное средство анти-CD38 (дарзалекс) добавляли в плазму АВ человека до конечной концентрации 0,5 мг/мл.

Подготовка образца (тест ингибирования): 25 мкл имитированной плазмы пациента с DARA инкубировали с 2 мкл 33 мг/мл CD38ecd-Fc-10H и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. В качестве контрольного эксперимента вместо CD38ecd-Fc-10H в плазму пипетированием вносили 2 мкл PBS, pH 7,4.

Скрининг антител: 50 мкл из каждой лунки Screen-Cyte 0,8%, lot 180005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл имитированной плазмы, предобработанной как описано выше, пипетированием вносили в инкубационную камеру микроколони в карте DG Gel Coombs (lot 17133.01 exp 2018-10; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту

центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. Полностью отрицательный результат (плоская “пуговка” клеток на дне микроколонки) являлся показателем полного ингибирования анти-CD38, присутствующего в образце от пациента.

2 мкл CD38ecd-FC10H-GDS20171106 смогли полностью ингибировать концентрацию 0,5 мг/мл, добавленную в донорскую плазму.

Пример 5. Ингибирование анти-CD38 с помощью CD38ecd-Fc-10H является специфичным и не интерферирует с основными антителами, имеющими отношение к группе крови

Пример 5a: детекция низкого титра анти-D в имитированной плазме с DARA после предобработки 2,2 мг/мл CD38ecd-Fc-10H

В имитированную плазму пациента, находящегося на лечении дарзалексом, добавляли поликлональные анти-D человека, которые становились детектируемыми с помощью доступной в продаже скрининговой панели только после предобработки sCD38. В имитированной плазме с добавкой, предварительно обработанной PBS, было невозможно корректно детектировать анти-D, поскольку дарзалекс интерферировал с процедурой скрининга антител, что таким образом приводило к положительным реакциям во всех лунках анализа по скринингу антител, полученных в результате скрининга лунок дарзалексом.

(1) Эксперименты по титрованию лекарственного средства: лекарственное средство Анти-CD38 (дарзалекс; lot GHS0901, Janssen, USA) использовали для получения имитированной плазмы пациента после разведения а плазме АВ человека, где в плазму АВ человека было добавлено поликлональное антитело анти-D человека. 75 мкл лекарственного средства анти-CD38 (дарзалекс) арифметически титровали в плазме АВ человека с получением имитированной плазмы пациента. 50 мкл Screen-Cyte 0,8% Cell #3, lot 17005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл каждого титра дарзалекса пипетированием вносили в инкубационную камеру микроколонки в карте DG Gel Coombs (lot 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. В этом эксперименте установлен титр анти-CD38, содержащихся в дарзалексе, как 1:64000.

(2) Титрование анти-D: Донорскую сыворотку с высоким титром анти-D арифметически титровали в плазме АВ человека. 50 мкл of Screen-Cyte 0,8% Cell #1, lot 17005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл каждого титра анти-D пипетированием вносили в инкубационную камеру микроколонки в карте DG Gel Coombs

(lot 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. В этом эксперименте установлен титр анти-D в донорской плазме как 1:16000 в лунке 1.

(3) Имитированная плазма пациента: к разведению 1:512 анти-D в плазме АВ человека добавляли разведения 1:16000 и 1:8000 дарзалекса для получения имитированной плазмы с концентрацией анти-CD38, которая может быть ингибирована 2 мкл 2,2 мг/мл CD38ecd-Fc-10H и иметь анти-D близкий к пределу детекции. Имитированная плазма с добавкой положительно реагировала во всех 3 лунках при скрининге антител, выполненном как предложено ниже в (5). Дополнительно, к 100 мкл плазмы пациента 2, содержащей анти-CD38 (TF1707/527), добавляли разведение анти-D 1:4000.

(4) Подготовка образца (тест ингибирования): 25 мкл имитированной плазмы с добавкой, полученной как описано в (1)-(3) выше, инкубировали с 2 мкл или 32 мкл 2,2 мг/мл CD38ecd-Fc-10H (CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPSPBS), соответственно, и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. В качестве контрольного эксперимента вместо CD38ecd-Fc-10H в плазму пипетированием вносили 2 мкл или 32 мкл PBS, pH 7,4.

(5) Скрининг антител: 50 мкл Screen-Cyte 0,8% Cells #1-3, lot 17005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл плазмы, предобработанной как описано выше, пипетированием вносили в инкубационную камеру микроколони в карте DG Gel Coombs (lot 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. Полностью отрицательный результат (плоская “пуговка” клеток на дне микроколони) являлся показателем полного ингибирования анти-CD38, присутствующего в образце от пациента.

2 мкл 2,2 мг/мл CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPSPBS смогли полностью ингибировать имитированную плазму с добавкой в отрицательной по D лунке #3 скрининговой панели антител. 32 мкл CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPSPBS смогли полностью ингибировать плазму от пациента 2 с добавкой в отрицательной по дарзалексу лунке #3 скрининговой панели антител (Фиг. 13). Лунки 1 и 2 оставались положительными после ингибирования, указывая на то, что тест ингибирования, выполненный как в (4), не влияет на реакционную способность добавленного антитела анти-D. Контрольные эксперименты с имитированной плазмой без добавки (полное ингибирование в лунках #1-3 и с плазмой с добавкой с использованием PBS вместо

CD38ecd-Fc-10H (полное отсутствие ингибирования) показали ожидаемые результаты (Фиг. 13).

Пример 5б: ингибирование анти-CD38 с помощью CD38ecd-Fc-10H дает возможность детекции релевантных непредвиденных антител в донорской плазме с добавкой анти-CD38.

Донорскую плазму с добавкой анти-CD38, содержащую непредвиденные антитела, использовали для оценки детекции непредвиденных антител после полного ингибирования анти-CD38 с помощью CD38ecd-Fc-10H. Anti-D, -E, -с, -Cw, -K, -Fya, -Jка, -S, -s, -M, -Lua, -Cоб становились детектируемыми с помощью доступной в продаже скрининговой панели только после предобработки CD38ecd-Fc-10H.

(1) Получение имитированной плазмы пациента: донорской плазмы АВ с добавкой анти-CD38 и аллоантител: терапевтическое лекарственное средство анти-CD38 (дарзалекс) добавляли в плазму АВ человека до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Каждое аллоантитело из перечисленных выше арифметически титровали в плазме АВ человека: 50 мкл Screen-Cyte 0,8% (для каждого антитела лунка панели, положительная по соответствующему антигену, была выбрана на основании антигенной матрицы продукта), и 25 мкл каждого разведения тестируемого аллоантитела пипетированием вносили в инкубационную камеру микроколони в карте DG Gel Coombs (lot 17133.01 exp 2018-10; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. Последнее разведение, которое давало слабо детектируемую положительную реакцию, использовали как разведение для добавки непредвиденного антитела в донорскую плазму с добавкой анти-CD38.

(2) Подготовка образца (тест ингибирования): 25 мкл донорской плазмы с добавкой анти-CD38, содержащей непредвиденные антитела, смешивали с 2 мкл 33,4 мг/мл CD38ecd-Fc-10H и инкубировали в течение 15 мин при 37°C.

(3) Скрининг антител: 50 мкл Screen-Cyte 0,8% лунки #1-3, lot 17026 или 18003 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл предобработанной имитированной плазмы вносили пипетированием в инкубационную камеру микроколони в карте DG Gel Coombs (lot 17133.01 exp 2018-10; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37 °C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты.

Соотношение 2 мкл CD38ecd-Fc-10H (33,4 мг/мл) на 25 мкл плазмы давало возможность детекции 16/16 основных антител, добавленных в слабо детектируемых

количествах в донорскую плазму с добавкой DARA (Фиг. 14, Таблица 2). Специфичности антител включали анти-D, -E, -c, -Cw, -K, -Fya, -Jka, -S, -s, -M, -Lua, -Cob.

Таблица 2. Детекция основных антител в донорской плазме с добавкой DARA

| Специфичность | Предварительная инкубация с 2 мкл CD38ecd-Fc-10H | | |
|---------------|--|---------|---------|
| | Лунка#1 | Лунка#2 | Лунка#3 |
| K | - | - | 1 |
| K | - | - | 1+ |
| D | 1 | 1 | - |
| D | +/- | 1 | - |
| E | - | 2 | - |
| E | - | 1 | - |
| Fya | - | - | 1 |
| Fya | - | - | 1 |
| Jka | 1 | - | 1- |
| s | - | +/- | - |
| S | - | - | 1- |
| c | - | 1- | 1- |
| Cob Fya | 2- | 1- | 2 |
| Lua | - | +/- | - |
| Cw | 1- | - | - |
| M | - | - | +/- |
| | Лунка#1 | Лунка#2 | Лунка#3 |

Пример 6. Прогнозирование стабильности CD38ecd-Fc-10H (Улучшенная стабильность)

Пример 6а: полное ингибирование неразведенной плазмы с анти-CD38

Пять аликвот по 100 мкл препарата CD38ecd-Fc-10H CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPSPBS разливали в отдельные пробирки, закрывали винтовыми крышками и помещали в инкубатор с постоянной температурой 37°C. Перед началом инкубации (то есть на сутки 0) и на сутки 7, 14, 21 и 31 одну пробирку переносили на 2-8°C до суток 31. На сутки 31 все аликвоты тестировали согласно следующей процедуре:

Подготовка образца (тест ингибирования): 25 мкл неразведенной плазмы от пациента 1, содержащей анти-CD38 (TF1715-197), инкубировали с 32 мкл CD38ecd-Fc-10H и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. В качестве контрольного эксперимента вместо CD38ecd-Fc-10H в плазму пипетированием вносили 32 мкл PBS, pH 7,4. Альтернативно, только плазму инкубировали в течение 15 мин при 37°C.

Скрининг антител: 50 мкл 1% разведения эритроцитов группы крови O в DG Gel Sol (lot 16015 exp 2018-04; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и 25 мкл плазмы, предобработанной как описано выше, вносили пипетированием в инкубационную камеру микроколони в карте DG Gel Coombs (lot 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. Полностью отрицательный результат (плоская “пуговка” клеток на дне микроколони) являлся показателем полного ингибирования анти-CD38, присутствующего в образце от пациента. Результаты на сутки 0, 7, 14, 21 и 31 в равной степени демонстрировали полное ингибирование, в то время как контрольный эксперимент демонстрировал показатель реакции (reaction score) 2, то есть отсутствие ингибирования. На основании графика Аррениуса показанная стабильность CD38ecd-Fc-10H в течение 31 суток при 37°C может быть переведена в стабильность в течение по меньшей мере 24 месяцев при хранении при 2-8°C.

Пример 6б: ингибирование титрованной анти-CD38 плазмы с помощью 2 мкл 2,2 мг/мл CD38ecd-Fc-10H

Пять аликвот по 100 мкл препарата CD38ecd-Fc-10H CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAERCPBS разливали в отдельные пробирки, закрывали винтовыми крышками и помещали в инкубатор при постоянной T 37°C. Перед началом инкубации и на сутки 7, 14, 21, 31 одну пробирку переносили на 2-8° до суток 31. На сутки 31 все аликвоты тестировали согласно следующей методике: 200 мкл плазмы от пациента 1, содержащей анти-CD38 (TF1715-197), арифметически титровали в PBS, pH 7,4 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) после того, как в предварительных экспериментах было установлено, что 25 мкл плазмы, разведенной 1:8, могут быть полностью ингибированы объемом 2 мкл CD38ecd-Fc-10H.

Подготовка образца (тест ингибирования): 25 мкл плазмы от пациента 1 (TF1715-197), содержащей соответствующий титр анти-CD38, инкубировали с 2 мкл 2,2 мг/мл CD38ecd-Fc-10H и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. В качестве контрольного эксперимента вместо CD38ecd-Fc-10H в плазму пипетированием вносили 2 мкл PBS, pH 7,4.

Скрининг антител: 50 мкл 1% разведения эритроцитов группы крови O в DG Gel Sol (lot 16015 exp 2018-04; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и 25 мкл плазмы, предобработанной как описано выше, пипетированием вносили в инкубационную камеру микроколонки в карте DG Gel Coombs (lot 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. Полностью отрицательный результат (плоская “пуговка” клеток на дне микроколонки) являлся показателем полного ингибирования анти-CD38, присутствующего в образце от пациента. Результаты на сутки 0, 7, 14, 21 и 31 в равной степени показывали полное ингибирование при титре 1:8, в то время как контроль демонстрировал показатель реакции (reaction score) 2, то есть отсутствие ингибирования на протяжении всего титрования. На основании графика Аррениуса показанная стабильность CD38ecd-Fc-10H в течение 31 суток при 37°C может быть представлена как стабильность в течение по меньшей мере 24 месяцев при хранении при 2-8°C.

Пример 7. Сравнение функциональных свойств рекомбинантного CD38ecd-Fc-10H и рекомбинантного CD38 человека (rhCD38)

Получение имитированной плазмы пациента с добавкой DARA: терапевтическое лекарственное средство анти-CD38 (дарзалекс) добавляли в плазму АВ человека до конечной концентрации 0,5 мг/мл.

Подготовка образца (тест ингибирования): 25 мкл донорской плазмы с добавкой анти-CD38 смешивали с 2 мкл 33,4 мг/мл CD38ecd-Fc10H или с 0,447 мг/мл rhCD38 (CD38-6H, R&D Systems, cat #2404-AC-010, lot. PEH0417081, Minneapolis, USA) или с PBS, pH 7,4 и инкубировали в течение 15 мин при 37°C.

Скрининг антител: 50 мкл Screen-Cyte 0,8% Лунки #1-3, lot 18001 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл предобработанной имитированной плазмы вносили пипетированием в инкубационную камеру микроколонки в карте DG Gel Coombs (lot 17108.01 exp 2018-09; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. Полностью отрицательный результат (плоская “пуговка” клеток на дне микроколонки) являлся показателем полного ингибирования анти-CD38, присутствующего в образце от пациента.

2 мкл рекомбинантного CD38ecd-Fc10H обеспечивали полное ингибирование 0,5 мг/мл анти-CD38. Напротив, доступный в продаже rhCD38, используемый в таких же

экспериментальных условиях, не мог ингибировать такую же нагрузку анти-CD38 (Фиг. 15).

Пример 8. Сравнение времени инкубации и температур инкубации для ингибирования анти-CD38 с помощью CD38ecd-Fc10H

Подготовка образца (тест ингибирования): терапевтическое лекарственное средство анти-CD38 (дарзалекс; lot GHS0901, Janssen, USA) разводили в BPS pH 7,4 до конечной концентрации 2 мг/мл. 150 мкл этого раствора арифметически титровали в PBS, pH 7,4 до 1:8. 25 мкл каждого разведения анти-CD38 смешивали с 2 мкл 33,4 мг/мл CD38ecd-Fc10H и инкубировали в течение 15 минут при 37°C, 15 минут при комнатной температуре или 30 мин при комнатной температуре.

Скрининг антител: 50 мкл Screen-Cyte 0,8% Лунка #3, lot 17025 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл образца, предобработанного как описано выше, вносили пипетированием в инкубационную камеру микроколони в карте DG Gel Coombs (lot 17108.01 exp 2018-09; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и считывали результаты. Полностью отрицательный результат (плоская “пуговка” клеток на дне микроколони) являлся показателем полного ингибирования анти-CD38, присутствующего в образце от пациента.

2 мкл CD38ecd-Fc10H обеспечивали полное ингибирование в образцах с разведением 1:4 (соответствует 0,5 мг/мл анти-CD38) во всех трех предобработках (Фиг. 16).

Пример 9. Сравнение активностей CD38ecd-Fc-10H и CD38ecd-flex-Fc-10H и CD38ecd-10H

Подготовка образца (тест ингибирования): терапевтическое средство анти-CD38 (дарзалекс; lot GHS0901, Janssen, USA) растворяли в BPS pH 7,4 до конечной концентрации 1 мг/мл. 150 мкл этого раствора арифметически титровали в PBS, pH 7,4 до 1:8. 25 мкл каждого из разведений анти-CD38 смешивали с 2 мкл примерно 8,5 мг/мл CD38ecd-Fc-10H, или примерно 8,5 мг/мл CD38ecd-flex-Fc-10H, или примерно 5 мг/мл CD38ecd-10H и инкубировали в течение 15 минут при 37°C.

Скрининг антител: 50 мкл Screen-Cyte 0,8% Лунка #3, lot 18009 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland) и 25 мкл образца, предобработанного как описано выше, вносили пипетированием в инкубационную камеру микроколони в карте DG Gel Coombs (lot 17133.01 exp 2018-10; Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем карту центрифугировали в центрифуге для карт DG Gel и

считывали результаты. Полностью отрицательный результат (плоская “пуговка” клеток на дне микроколоники) являлся показателем полного ингибирования анти-CD38, присутствующего в образце от пациента.

2 мкл CD38ecd-Fc-10H и 2 мкл CD38ecd-flex-Fc-10H обеспечивали полное ингибирование в образцах с разведением 1:8 (соответствует 0,125 мг/мл анти-CD38). 2 мкл CD38ecd-10H не обеспечивали полного ингибирования образца с разведением 1:8. Только разведение образца 1:128 (соответствует 0,008 мг/мл анти-CD38) могло быть полностью ингибировано с помощью 2 мкл CD38ecd-10H (Фиг. 17).

Пример 10. Олигомеризация слитых белков Fc-PolyHis

Три белка, представляющих интерес, CD38ecd, CD47ecd1 и Gp1ba, были рекомбинантно слиты с различными вариантами олигомеризационной метки Fc-polyHis для исследования способности образовывать олигомеры полученных в результате рекомбинантных слитых белков.

Один вариант представлял собой рекомбинантный белок sCD38, слитый с меткой Fc-10His. Этот белок экспрессировали и очищали вплоть до 50 мг/мл, без обнаружения видимой агрегации. Во втором варианте рекомбинантный белок sCD38 сливали с меткой flex-Fc-10His. В этом варианте слитого белка шарнирная область Fc была заменена на гибкий линкер без остатков цистеина. В третьем варианте рекомбинантный белок sCD38 сливали с Fc-фрагментом. В четвертом варианте рекомбинантный белок sCD38 сливали с меткой 10His.

С целью применения способа олигомеризации слитых белков для других белков, представляющих интерес, олигомеризационную метку Fc-10His сливали с белком CD47ecd1 в одном варианте этого белка. Другой вариант олигомеризационной метки также сливали с белком Gp1ba. В первом варианте рекомбинантный белок Gp1ba был слит с меткой Fc-8His. Во втором варианте рекомбинантный белок Gp1ba был слит с меткой 6His. В третьем варианте рекомбинантный белок Gp1ba был слит с меткой SBP-6H. В четвертом варианте рекомбинантный белок Gp1ba был слит с меткой p53-6His. Метки Fc-10His и Flex-Fc-10His сами по себе также использовали в качестве контролей.

Разные варианты слитых белков экспрессировали и очищали в эукариотической системе экспрессии. Путем эксклюзионной хроматографии с детекцией многоугольного лазерного рассеивания (SEC-MALS/DLS) измеряли массу (M_w), гидродинамический радиус ($R_h(w)$) и полидисперсность (M_w/M_n) белков в растворе (Таблица 3). Степень олигомеризации рассчитывали из соотношения между измеренной массой (M_w) и теоретической массой ($Th.M_w$).

Для слитых белков sCD38 способность белка титровать антитело, как в IAT по ингибированию анти-CD38 (ДАРАТУМУМАБ), также тестировали с использованием CD38ecd-Fc-10H в качестве референтного показателя.

Таблица 3. Степень олигомеризации рекомбинантных слитых белков

| Рекомбинант- ный белок | Th. Mw (кДа) | Mw (кДа) | Mw/Th .Mw | Поли- дисперсност ь Mw/Mn | Rh*(w) (нм) | Степень олигомери- зации | Функцио- нальные свойства |
|---|--------------------|-----------------|--------------|---------------------------------|----------------|--------------------------------|---------------------------------|
| CD38ecd-Fc- 10H | 57 | 668,9 (0,1%) | 11,7 | 1,002 (0,2%) | 9,8 (7%) | 12-мер | 100% |
| CD38ecd-flex- Fc-10H | 57 | 700,8 (0,6%) | 12,3 | 1,002 (0,8%) | 9,6 (6%) | 12-мер | 100% |
| CD38ecd-Fc | 56 | 113,7 (0,8%) | 2,3 | 1,009 (1%) | < 9 | 2-мер | 50% |
| CD38ecd-10H | 31 | 35,6 (3%) | 1,2 | 1,000 (4%) | < 9 | 1-мер | 12,5% |
| CD47ecd1-Fc- 10H | 41 | 513,3 (0,9%) | 12,5 | 1,005 (1%) | 9,3 (28%) | 12-мер | н/о |
| Gp1b α -Fc-G- 8H + 10 мМ EDTA | 59 | 144 (1,842%) | 2,4 | 1,012 (2,6%) | < 9 | 2-мер | н/о |
| Gp1b α -Fc-G- 8H Без обработки EDTA | 59 | 773 (1,5%) | 13 | 1,06 (2,34%) | 9,10 (44%) | 12-мер | н/о |
| Gp1b α -6H | 33 | 36,23 (3%) | 1,1 | 1,016 (3,75%) | < 9 | 1-мер | н/о |
| Gp1b α -SBP-6H | 37 | 41,77 (0,6%) | 1,12 | 1,003 (0,88%) | < 9 | 1-мер | н/о |
| Gp1b α -p53-6H | 37 | 146 (1,081%) | 3,94 | 1,006 (1,57%) | < 9 | 4-мер | н/о |
| Fc-10H | 30 | 393,6 (2%) | 13,12 | 1,072(3%) | < 9 | 12-мер | 0% |
| flex-Fc-10H | 30 | 303,5(2%) | 10,1 | 1,021(3%) | < 9 | 10-мер | 0% |

*Rh(w) молекул менее чем 9 нм является недостоверным. н/о – не определены

Олигомеризационные метки, содержащие специфическую комбинацию Fc-фрагмента и домена poly-His (Fc-polyHis), запускают олигомеризацию (по меньшей мере 12-мер или 6-мер из димеров) по меньшей мере для 3 белков, представляющих интерес (sCD38, CD47ecd1 and Gr1ba), будучи слиты с их N-концом. Сама по себе метка Fc-10His без слитого с ней белка, представляющего интерес, также образует олигомеры. Данные, представленные в Таблице 3, ясно указывают, что олигомеризация представляет собой внутреннее свойство меток Fc-polyHis, которое не связано с используемым белком, представляющим интерес. Олигомеризация белка, представляющего интерес, не зависит от шарнирной области Fc, поскольку белки, слитые с Flex-Fc-10His, также демонстрируют олигомеризацию. Слитые белки, содержащие только метку polyHis без Fc-фрагмента, не вызывают какой-либо олигомеризации, и полученные белки представляют собой мономеры, как ожидается. Все слитые белки, содержащие олигомеризационную метку Fc-polyHis, являются в высокой степени монодисперсными, что указывает на то, что они не являются агрегатами развернутых молекул.

Наконец, слияние олигомеризационной метки Fc-polyHis с белками sCD38 увеличивает avidность CD38ecd при титровании анти-CD38.

Хотя данное описание представлено в контексте определенных воплощений и примеров, специалист в данной области техники понимает, что настоящее изобретение охватывает не только конкретно раскрытые воплощения, но также другие альтернативные воплощения и/или применения этих воплощений и их очевидные модификации и эквиваленты. Дополнительно, в то время как несколько вариантов воплощений было представлено и описано подробно, специалист в данной области техники на основании данного описания легко представит другие модификации, которые входят в объем настоящего изобретения. Также предполагается, что различные комбинации или субкомбинации специфических признаков и аспектов этих воплощений могут быть выполнены, не выходя из объема настоящего изобретения. Следует понимать, что различные признаки и аспекты раскрытых воплощений можно комбинировать друг с другом или заменять друг на друга для получения различных форм или воплощений изобретения. Таким образом, подразумевается, что объем настоящего изобретения, раскрытого здесь, не ограничен определенными раскрытыми воплощениями, описанными здесь.

Как их используют здесь, заголовки разделов предназначены исключительно для организационных целей, и их не следует рассматривать как каким-либо образом

ограничивающие объект изобретения. Все литературные источники и подобные материалы, процитированные в данной заявке, включая патенты, заявки на патенты, статьи, книги, научные работы и сайты в интернете, но не ограничиваясь ими, специально включены в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте для любой цели. Когда определения терминов во включенных процитированных источниках по-видимому отличаются от определений, предложенных в настоящем описании, определение, предложенное в настоящем описании, будет иметь преимущество. Следует понимать, что перед значениями температур, концентраций, времени и так далее, обсуждаемых в настоящем описании, присутствует соответствующий термин “примерно”, с тем чтобы небольшие и несущественные отклонения входили в объем настоящего изобретения.

В данном описании использование терминов в единственном числе включает множественное число, если специально не указано иное. Также использование терминов “составляют”, “составляет”, “составляющий”, “содержат”, “содержит”, “содержащий”, “включают”, “включает”, “включающий” не является ограничивающим.

Все литературные источники, процитированные в данном описании, включены в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для связывания с антителом анти-CD38, содержащая рекомбинантную растворимую форму внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента, которая интерферирует с активностью связывания антитела анти-CD38, где последовательность рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.
2. Композиция по п. 1, где размер рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента находится в диапазоне от примерно 5 аминокислот до примерно 300 аминокислот.
3. Композиция по п. 1, где антитело анти-CD38 направлено против CD38 человека, CD38, происходящего не от человека, или их комбинации.
4. Композиция по п. 1, где антитело анти-CD38 является моноклональным, поликлональным или их комбинацией.
5. Композиция по п. 1, где антитело анти-CD38 выбрано из группы, состоящей из дарзалекса, изатуксимаба и MOR202.
6. Композиция по п. 1, где рекомбинантная растворимая форма внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента экспрессируется в эукариотической системе экспрессии или прокариотической системе экспрессии.
7. Композиция по п. 1, где концентрация рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента находится в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 400 мг/мл.
8. Набор для исследований по биомониторингу и диагностических анализов, содержащий композицию по п. 1, планшет и реагенты для выявления присутствия антител.
9. Набор по п. 8, где планшет и реагенты набора укомплектованы для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).
10. Набор по п. 9, где планшет и реагенты набора являются такими как в наборе для анализа, доступном в продаже под товарным знаком PROMONITOR® на дату подачи настоящей заявки.

11. Способ нейтрализации или блокирования связывания антитела анти-CD38 в образце, включающий:

предоставление объема образца, содержащего антитело анти-CD38; и

инкубирование с объемом композиции по п. 1, достаточным для нейтрализации антитела анти-CD38 в образце.

12. Способ по п. 11, где образец выбран из группы, состоящей из крови, плазмы и сыворотки.

13. Способ по п. 11, где антитело анти-CD38 выбрано из группы, состоящей из дарзалекса, изатуксимаба и MOR202.

14. Способ по п. 11, где объем образца находится в диапазоне от примерно 25 мкл до примерно 250 мкл.

15. Способ по п. 11, где объем композиции находится в диапазоне от примерно 0,5 мкл до примерно 50 мкл.

16. Способ по п. 11, где концентрация антитела анти-CD38 в образце находится в диапазоне от примерно 0,005 мкг/мл до примерно 2000 мкг/мл.

17. Способ по п. 11, где концентрация рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента в композиции находится в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 400 мг/мл.

18. Способ по п. 11, где нейтрализующий эффект рекомбинантной растворимой формы внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента находится в диапазоне от примерно 70% до примерно 100%.

19. Способ по п. 11, где активность связывания антитела анти-CD38 выбрана из группы, состоящей из интерференции при тестировании крови перед переливанием, интерференции при перекрестной пробе на совместимость крови и интерференции при терапии антителами.

20. Способ выбора подходящей дозы эритроцитарной массы для пациента, которого лечат антителами анти-CD38, включающий:

получение образца от пациента, где указанный образец представляет собой кровь или образец, полученный из крови пациента;

нейтрализацию антитела анти-CD38 в образце согласно способу по п. 11;

тестирование образца на совместимость с определенными дозами эритроцитарной массы; и

выбор на основании данного тестирования дозы эритроцитарной массы, совместимой с образцом.

21. Способ удаления анти-CD38 из плазмы, сыворотки и/или крови человека во время обработки плазмы, сыворотки и/или крови, включающий осуществление воздействия композиции по п. 1 на плазму, сыворотку и/или кровь, где рекомбинантная растворимая форма внеклеточного домена CD38 и/или его фрагмента помечена аффинной меткой.

22. Способ по п. 21, где обработка включает обработку, выбранную из группы, состоящей из гемодиализа, перитонеального диализа, гемофильтрации, гемодиализации, обменного переливания плазмы и плазмафереза.

23. Способ по п. 21, где аффинная метка выбрана из группы, состоящей из глутатион-S-трансферазы (GST), малых убиквитин-подобных модификаторов (SUMO), AviTag, кальмодулиновой метки, полиглутаматной метки, E-метки, FLAG-метки, HA-метки, His-метки, Muc-метки, NE-метки, S-метки, SBP-метки, Softag 1, Softag 3, Strep-метки, TC-метки, V5-метки, VSV-метки, метки Xpress, Isopeptag, SpyTag, SnoopTag, биотин-карбоксильного белка-носителя (BCCP), глутатион-S-трансферазной метки, метки зеленым флуоресцентным белком, метки другими флуоресцентными белками, HaloTag, метки мальтоза-связывающим белком, Nus-метки, тиоредоксиновой метки, Fc-метки, искусственных внутренне неупорядоченных меток, содержащих аминокислоты, вызывающие нарушение порядка, метки Tu.

24. Слитый белок, содержащий рекомбинантный полипептид, слитый с олигомеризационной меткой, где олигомеризационная метка содержит Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент и домен polyHis.

25. Слитый белок по п. 24, где олигомеризационная метка обладает способностью образовывать димеры более высокого порядка вплоть до 12-меров или 6-меров из 2-меров.

26. Слитый белок по п. 24, где домен polyHis имеет от 4 до 24 остатков гистидина.

27. Слитый белок по п. 24, где домен polyHis имеет от 6 до 10 остатков гистидина.

28. Слитый белок по п. 24, где домен polyHis имеет 6, 8 или 10 остатков гистидина.

29. Слитый белок по любому из п.п. 24-28, где последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина представляет собой SEQ ID NO: 15.

30. Слитый белок по любому из п.п. 24-28, где последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15.

31. Слитый белок по любому из п.п. 24-30, где последовательность рекомбинантного полипептида и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

32. Слитый белок по любому из п.п. 24-30, где последовательность слитого белка и/или его фрагмента выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21.

33. Олигомеризационная метка для рекомбинантного слитого белка, содержащего Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент и домен polyHis.

34. Олигомеризационная метка по п. 33, где домен polyHis имеет от 4 до 24 остатков гистидина.

35. Олигомеризационная метка по п. 33, где домен polyHis имеет от 6 до 10 остатков гистидина.

36. Олигомеризационная метка по п. 33, где домен polyHis имеет 6, 8 или 10 остатков гистидина.

37. Олигомеризационная метка по любому из п.п. 33-36, где последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина имеет последовательность SEQ ID NO: 15.

38. Олигомеризационная метка по любому из п.п. 33-36, где последовательность Fc-фрагмента иммуноглобулина по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15.

39. Олигомеризационная метка по п. 33, где последовательность олигомеризационной метки выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

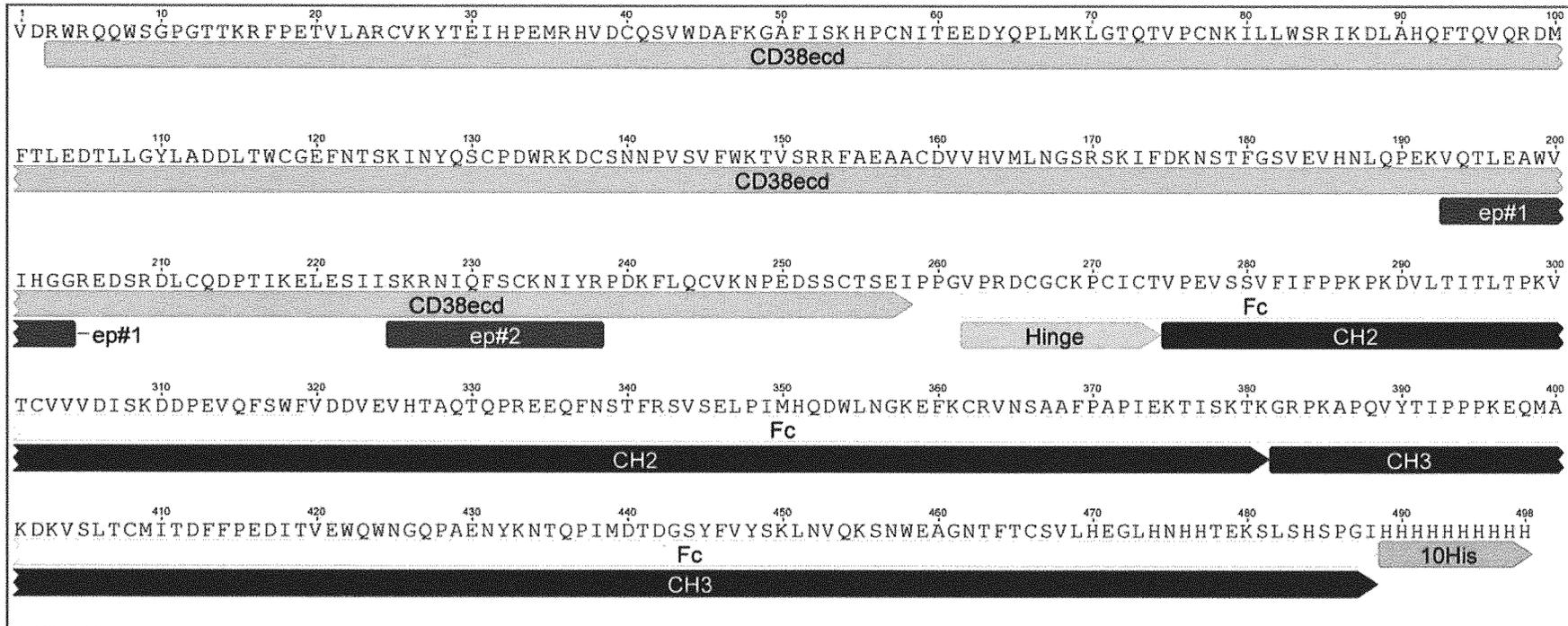
40. Способ олигомеризации рекомбинантного слитого белка, включающий следующие стадии:

а) генетическое слияние нуклеотидной последовательности, кодирующей олигомеризационную метку по любому из п.п. 33-39, с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид;

б) экспрессию полученной на стадии а) нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине;

в) очистку рекомбинантного слитого белка, полученного на стадии б).

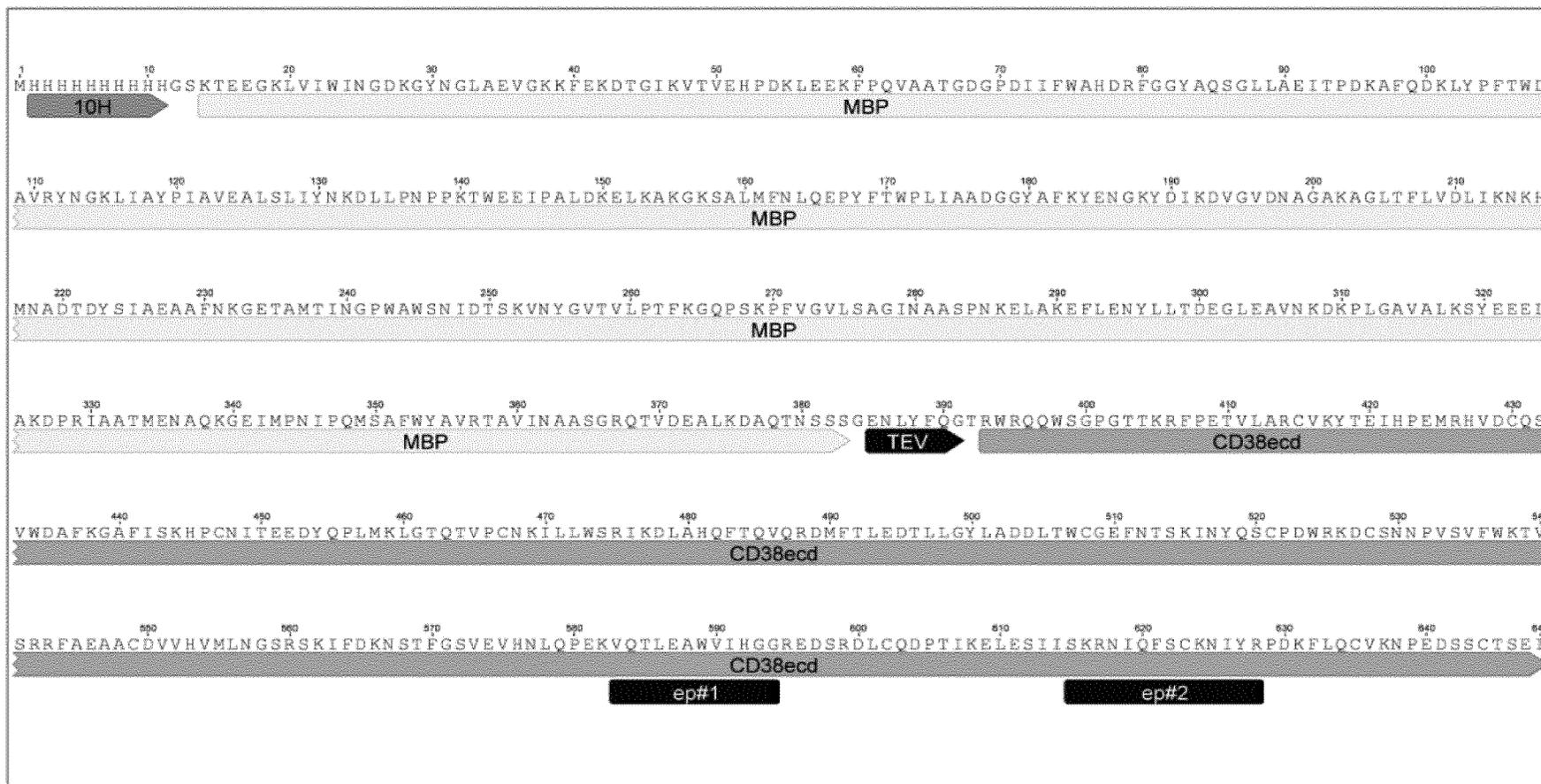
Фиг. 1



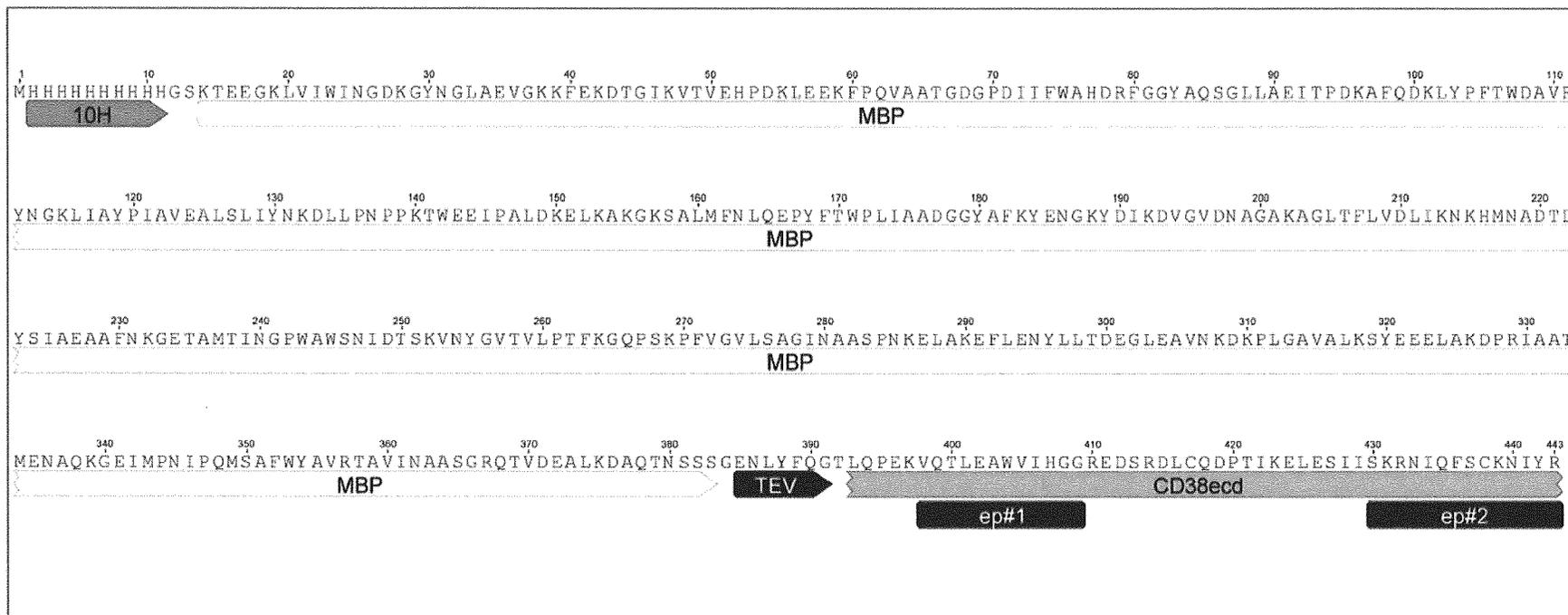
Фиг. 2

VDRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHV
DCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPC
NKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLT
WCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRF
AEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEK
VQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIFSC
KNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEIGIHHHHHHHHHHH
(SEQ ID NO: 8)

Фиг. 3



Фиг. 5



Фиг. 6

PRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVD
CQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCN
KILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTW
CGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAE
AACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQ
TLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFCKNI
YRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI (SEQ ID NO: 1)

Фиг. 7

LQPEKVQTLLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRN

IQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 2)

Фиг. 8

VQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3)

Фиг. 9

SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 4)

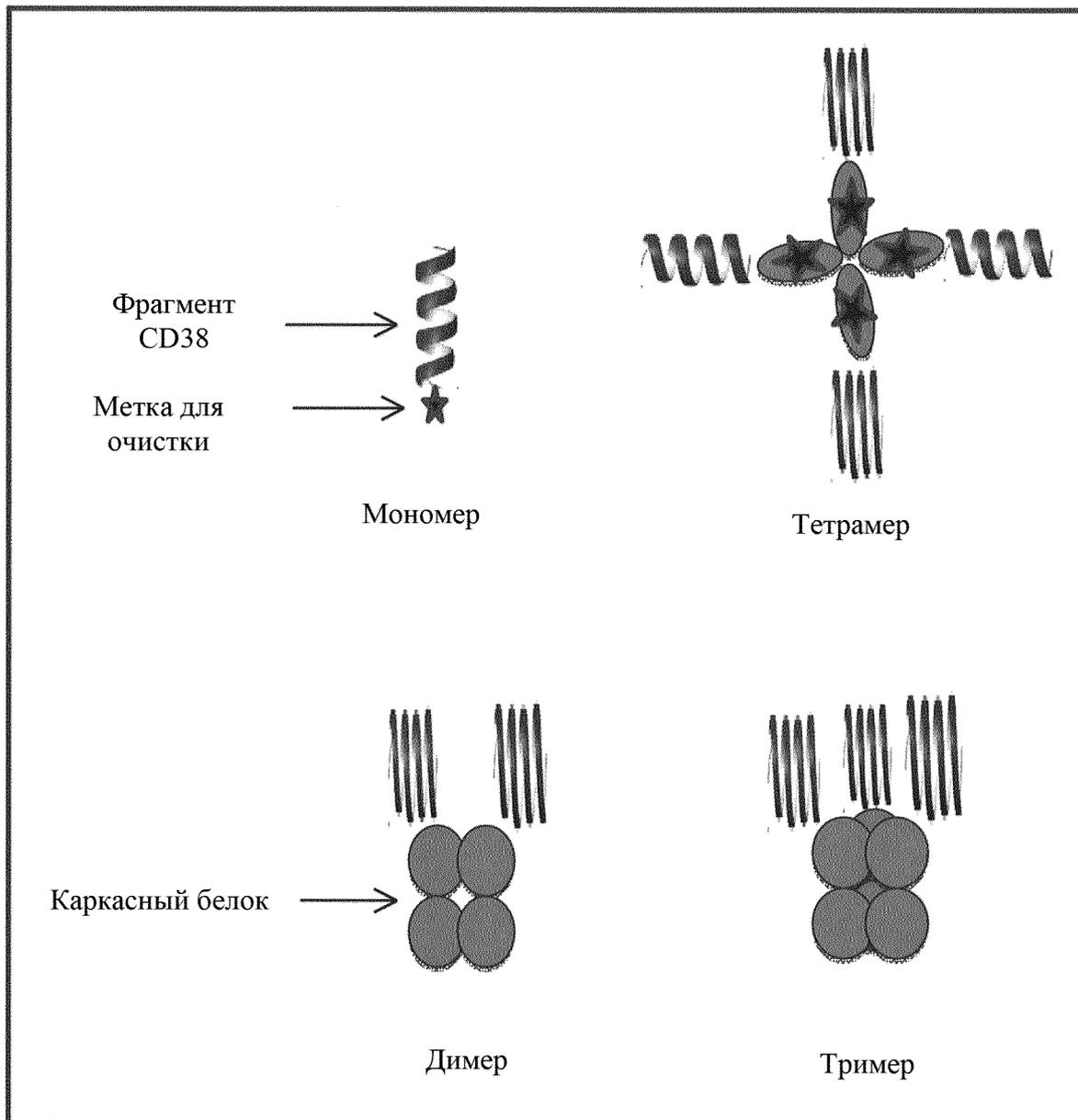
Фиг. 10

HGVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKV
TCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNS
TFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK
TKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDIT
VEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKS
NWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGIHHHHHHHH
HHH (SEQ ID NO: 5)

Фиг. 11

MHHHHHHHHHHGSKTEEGKLVWINGDKGYNGLAEV
KKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDII
HDFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAV
RYNG
KLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPAL
DKELKAK
GKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENG
KYDIKD
VGVDNAGAKAGLTFLVDLIK NKHMNADTDYSIA
EAAFN
KGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFK
GQPSKP
FVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLE
AVNKD
KPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEI
MPNIPQ
MSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSS
SGEN
LYFQGT (SEQ ID NO: 6)

Фиг. 12



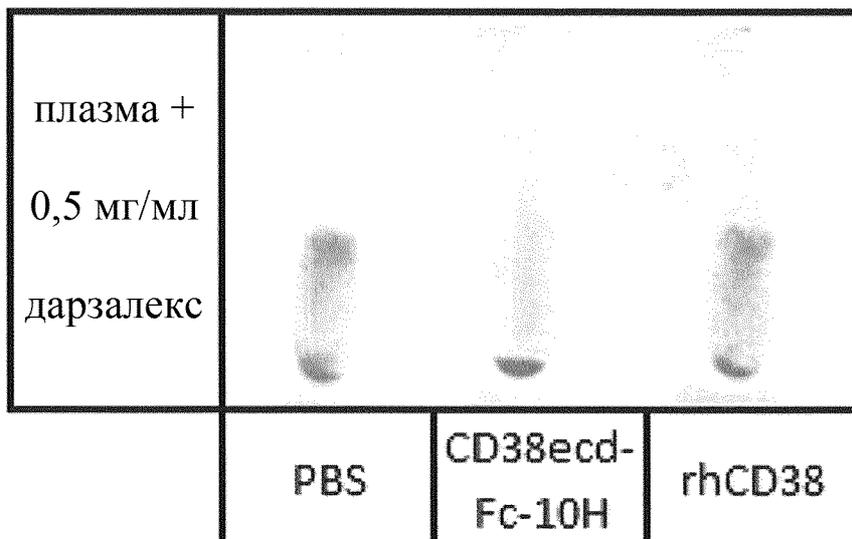
Фиг. 13

| | | | | | | | | | |
|--|---|--|---------------------------------------|---|--|--------------------|---|--|--|
| CD38ecd- Fc-10H | | | | | | | | | |
| | 1 | | | 2 | | | 3 | | |
| PBS | | | | | | | | | |
| | 1 | | | 2 | | | 3 | | |
| Плазма + анти-D 1:16000 + Дарзалекс | | | Плазма + анти-D 1:8000 + Дарзалекс | | | Плазма + Дарзалекс | | | |

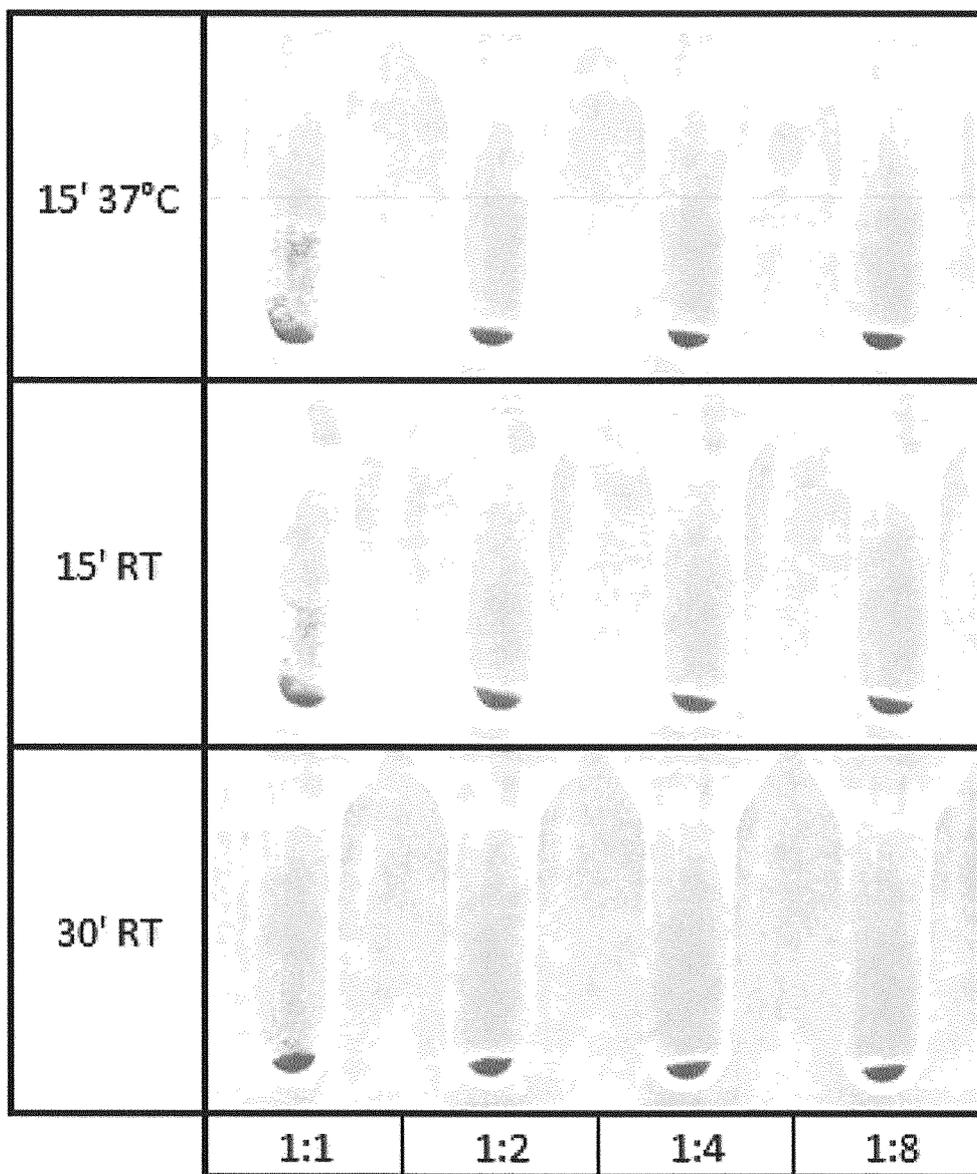
Фиг. 14

| | | | | | | | | | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|
| Предвари- тельная инкубация с 2 мкл CD38ecd- Fc-10H | | | | | | | | | | | |
| Предвари- тельная инкубация с 2 мкл PBS | | | | | | | | | | | |
| Fya+b- Cob+ | Fya-b+ Cob- | Fya-b+ Cob- | Fya+b+ Cob- | Fya+b+ Cob- | Fya-b+ Cob- | Fya-b+ Cob- | Fya+b- Cob- | Fya+b+ Cob- | Fya-b+ Cob+ | Fya+b+ Cob- | |
| Лунка #1 | Лунка #2 | Лунка #3 | Лунка #4 | Лунка #5 | Лунка #6 | Лунка #7 | Лунка #8 | Лунка #9 | Лунка #10 | Лунка#11 | |

Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

