

VARIANTES DE INTERFERON $\alpha 2b$

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos que
5 comprenden ligandos dirigidos contra antígenos de superficie
celular e interferón glicosilado $\alpha 2b$ (IFN $\alpha 2b$) y el uso de estos
polipéptidos en el tratamiento de cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Numerosas moléculas de péptidos y polipéptidos han
10 sido descritas por su interacción con un receptor sobre una
superficie celular, de este modo estimulan, inhiben o de otra
manera modulan una respuesta biológica, usualmente implicando
vías de transducción de señales dentro de la célula que gatilla
dicho receptor. Ejemplos de tales moléculas incluyen hormonas
15 peptídicas y polipeptídicas, citoquinas, quimiocinas, factores
de crecimiento, factores inductores de apoptosis y similares.
Estas moléculas pueden ser solubles o pueden unirse a la
superficie de otra célula.

[0003] Debido a la actividad biológica de tales moléculas,
20 algunas tienen un potencial uso como agentes terapéuticos.
Varias moléculas de péptido o polipéptido han sido aprobadas
por organismos reguladores como productos terapéuticos,
incluyendo, por ejemplo, hormona de crecimiento humana,
insulina, interferón IFN $\alpha 2b$, IFN $\alpha 2a$, IFN β , eritropoyetina, G-

CSF y GM-CSF. Muchos de estos y otros péptidos han demostrado tener potencial en aplicaciones terapéuticas, pero también han mostrado toxicidad cuando se administran a pacientes humanos. Una de las razones de la toxicidad es que la mayoría de estas moléculas activan receptores en una variedad de células, incluyendo células distintas de aquellas que median el efecto terapéutico. Por ejemplo, cuando IFN α 2b se usa para tratar mieloma múltiple, su utilidad reside, al menos en parte, en su unión a receptores de interferón de tipo I en las células de mieloma, lo que a su vez provoca una reducción en la proliferación celular y por lo tanto limita la progresión de la enfermedad. Desafortunadamente, este IFN también se une a muchas otras células normales dentro del cuerpo, desencadenando una variedad de otras respuestas celulares, algunas de las cuales son dañinas (por ejemplo, síntomas similares a la gripe, neutropenia, depresión). Una consecuencia de dicha actividad "off-target (inespecífica)" de los péptidos es que muchos péptidos no son adecuados como candidatos a fármacos. En este contexto, la "actividad inespecífica" se refiere a la actividad sobre el receptor natural del péptido, pero sobre la superficie de células distintas de aquellas que median efectos terapéuticamente beneficiosos.

[0004] Aunque algunos péptidos, tales como IFN α 2b, están aprobados para el tratamiento de afecciones médicas, son poco tolerados debido a su actividad biológica “inespecífica”. La actividad inespecífica y la pobre tolerancia asociada también
5 generan que algunos de estos fármacos basados en péptidos no pueden administrarse a dosis suficientemente altas para producir efectos terapéuticos óptimos sobre las células diana que median el efecto terapéutico.

[0005] De manera similar, desde mediados de la década de
10 1980 se sabe que los interferones, en particular el IFN α , son capaces de aumentar la apoptosis y disminuir la proliferación de ciertas células cancerosas. Estas actividades biológicas están mediadas por receptores de interferón tipo I en la superficie de las células cancerosas que, cuando se estimulan,
15 inician varias vías de transducción de señales que conducen a una proliferación reducida y/o a la inducción de diferenciación terminal o apoptosis. IFN α ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de varios cánceres incluyendo melanoma, carcinoma de células renales, linfoma de células B, mieloma múltiple,
20 leucemia mielógena crónica (CML) y leucemia de células pilosas. Un efecto “directo” del IFN α sobre las células tumorales está mediado por la unión directa de IFN α al receptor IFN de tipo I en esas células y estimula la apoptosis, la diferenciación terminal o la proliferación reducida. Un efecto “indirecto”

del IFN α en células no cancerosas es estimular el sistema inmunológico, lo que puede producir un efecto anticancerígeno adicional haciendo que el sistema inmunitario rechace el tumor.

[0006] Desafortunadamente, el receptor de interferón tipo

5 I también está presente en la mayoría de las células no cancerosas. La activación de este receptor en tales células por IFN α causa la expresión de numerosas citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas, lo que conduce a toxicidad. Tal toxicidad impide la dosificación de IFN α a un sujeto a niveles
10 que ejercen la actividad anti-proliferativa y pro-apoptótica máxima sobre las células cancerosas.

[0007] Ozzello *et al.* (Breast Cancer Research and Treatment 25:265-76, 1993) describieron la unión covalente de IFN α humano

a un anticuerpo dirigido al tumor, localizando de este modo la
15 actividad inhibidora directa del IFN α al tumor como una forma de reducir las tasas de crecimiento tumoral y demostraron que tales conjugados tienen actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de un cáncer humano. El mecanismo de la actividad anticancerosa observada se atribuyó a un efecto directo de
20 IFN α sobre las células cancerosas, puesto que el IFN α humano utilizado en los experimentos no interaccionó apreciablemente con el receptor de IFN de tipo I murino, lo que podría conducir a un efecto indirecto anti-efecto de cáncer. Debido a esta falta de unión del IFN α humano a las células murinas; sin

embargo, los autores no pudieron evaluar la toxicidad del conjugado de anticuerpo- $\text{IFN}\alpha$ en relación con $\text{IFN}\alpha$ libre. Estos autores utilizaron un método químico para unir el $\text{IFN}\alpha$ al anticuerpo.

5 [0008] Alkan *et al.*, (Journal of Interferon Research, volumen 4, número 3, páginas 355-63, 1984) demostraron que acoplar $\text{IFN}\alpha$ humano a un anticuerpo que se une al antígeno de membrana (AM) del virus Epstein-Barr (EBV) aumentó sus actividades antiproliferativas hacia células que expresan el
10 antígeno EBV-MA. Esta potencia aumentada dependía tanto de la expresión del antígeno por las células diana como de la especificidad de unión del anticuerpo. La línea celular probada fue la línea celular cancerosa QIMR-WIL, una leucemia mieloblástica. Los autores sugirieron que la unión de $\text{IFN}\alpha$ a
15 un anticuerpo podría usarse como un tratamiento para el cáncer ya que reduciría el crecimiento del tumor. Alkan *et al* no abordaron la toxicidad potencial de estos conjugados de anticuerpo- $\text{IFN}\alpha$ que surgen de sus interacciones con células normales negativas al antígeno.

20 [0009] También se sabe que la unión entre un anticuerpo y $\text{IFN}\alpha$ puede lograrse haciendo una construcción de proteína de fusión. Por ejemplo, IDEC (W001/97844) describe una fusión directa de $\text{IFN}\alpha$ humano con el extremo C de la cadena pesada de una IgG dirigida al antígeno tumoral CD20. Otros grupos han

descrito el uso de varios enlazadores entre el extremo C-terminal de una cadena pesada de IgG y el IFN α . Por ejemplo, el documento US 7.456.257 describe que el extremo C de una región constante de cadena pesada del anticuerpo puede estar
5 conectado al IFN α a través de un enlazador intermedio rico en serina-glicina (S/G) de la secuencia (GGGS) n , donde n puede ser 1, 2 o 3, y que no hay diferencias significativas en la actividad de IFN α de la construcción de proteína de fusión independientemente de la longitud del enlazador.

10 [0010] Morrison *et al.* (US2011/0104112 A1; y Xuan C, Steward KK, Timmerman JM, Morrison SL. La administración dirigida de interferón- α por fusión a anti-CD20 da como resultado una potente actividad antitumoral contra el linfoma de células B. Blood 2010; 115: 2864-71) también describen IFN α unido al
15 extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo IgG dirigido contra el cáncer, con un enlazador S/G intermedio, y observaron que la fusión de la IgG y el enlazador al IFN α reducía la actividad del IFN α en células que no expresan el antígeno correspondiente en la superficie celular. La disminución de la
20 actividad de IFN de estas construcciones de proteína de fusión fue modesta cuando se comparó con la proteína no fusión humana IFN α (IFN α libre) que actuaba sobre células humanas, pero parecía ser más significativa para IFN α murino en células murinas. La disminución de la actividad del IFN α humano que

resulta de su fusión al extremo C de un anticuerpo, según lo observado por Morrison *et al.*, Y en el documento US 7,456,257 es modesta y se considera generalmente como una desventaja ya que reduce la potencia del IFN. Esta desventaja fue señalada, por ejemplo, por Rossi *et al.* (Blood vol. 114, No. 18, pp. 3864-71), que usaron una estrategia alternativa de fijar el IFN α a un anticuerpo dirigido al tumor de tal manera que ninguna pérdida en la actividad de IFN α fue observada.

[0011] En general, la técnica anterior enseña a usar un IFN potente y dirigir este IFN a células cancerosas. Aunque este enfoque da como resultado un aumento de la actividad del IFN frente a las células cancerosas, no aborda la cuestión de la actividad del IFN en células normales "inespecíficas". En los ejemplos de la técnica anterior a los que se ha hecho referencia anteriormente, la porción de IFN α humano de la proteína de fusión de anticuerpo-IFN α mantiene una elevada proporción de actividad nativa de IFN α cuando se expone a células humanas que no expresan el antígeno correspondiente en sus superficies celulares. Esta actividad puede conducir a la toxicidad que surge de la activación de células normales no cancerosas ("inespecíficas") por la porción de IFN α de la proteína de fusión. Por consiguiente, existe la necesidad de disminuir la actividad "inespecífica" de fármacos basados en IFN, manteniendo al mismo tiempo el efecto terapéutico

“específico (on-target)” de tales fármacos. El mantenimiento de la actividad específica del objetivo y al mismo tiempo una reducción de la toxicidad no objetivo de estos tipos de agentes terapéuticos crearía una ventana de concentración terapéutica mayor para los péptidos terapéuticamente útiles. Por ejemplo, sería deseable utilizar IFN α humano en una forma tal que su actividad se pueda dirigir a las células cancerosas minimizando al mismo tiempo sus efectos sobre células humanas normales. Idealmente, el receptor de interferón tipo I sobre las células cancerosas sería estimulado al máximo, mientras que el mismo receptor en células no cancerosas experimentaría una estimulación mínima. Existe la necesidad de dirigir el IFN α humano a las células cancerosas de tal manera que tenga una actividad dramáticamente mayor en las células cancerosas, que muestran el antígeno, que en las células normales, que no muestran el antígeno. La misma lógica se aplica a otras moléculas potencialmente terapéuticas, por ejemplo, otras citoquinas, hormonas de péptidos y polipéptidos, quimiocinas, factores de crecimiento, factores inductores de apoptosis y similares.

[0012] La lógica de este enfoque se ha demostrado en WO 2013/059885 y WO 2014/178820, la descripción de cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia cruzada.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en el que el primer dominio comprende un ligando polipeptídico que se une a un antígeno asociado a la superficie celular y el segundo dominio comprende interferón $\alpha 2b$ aglicosilado humano (IFN $\alpha 2b$) que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y en la que el IFN $\alpha 2b$ aglicosilado comprende además una o más sustituciones o deleciones de aminoácidos que atenúan la actividad del IFN $\alpha 2b$ aglicosilado.

[0014] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 31, 61 a 77, 83 y 87, y una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 81, 82 y 84.

[0015] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 81.

[0016] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 85.

[0017] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86.

[0018] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende SEQ ID NO: 78.

[0019] En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el polipéptido de fusión de la presente invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0020] En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar un tumor en un sujeto que comprende administrar al sujeto el polipéptido de fusión de la presente invención o la composición de la presente invención en la que el primer dominio del polipéptido de fusión se une a las células del tumor.

[0021] En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del polipéptido de fusión de la presente invención en el tratamiento de un tumor en el que el primer dominio del polipéptido de fusión se une al tumor.

[0022] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado (s) que codifica el polipéptido (s) de fusión de la presente invención.

[0023] En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende uno o más polinucleótidos de la presente invención.

[0024] En otro aspecto la presente invención proporciona una célula transformada que comprende el vector de la presente invención.

[0025] En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar un polipéptido de fusión de IFN α 2b atenuado con ligando de polipéptido en células de mamífero, en el que el polipéptido de fusión de IFN α 2b atenuado con ligando de polipéptido tiene una heterogeneidad reducida y/o una unión a FcRn mejorada y/o una selectividad específica mejorada, comprendiendo el método el cultivo de una célula de mamífero recombinante que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión de IFN α 2b atenuado con ligando de polipéptido en el que T106 de la secuencia de IFN α 2b se reemplaza con otro aminoácido o se suprime de tal manera que a la expresión en células de mamífero el componente IFN α 2b de la proteína de fusión es aglicosilado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0026] Figura 1: Actividad antiproliferativa tras el tratamiento de células (A) ARP1 y (B) NCI-H929 con proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas anti-CD38 en la forma de IgG1 o IgG4 con y sin glicosilación O-ligada del IFN α 2b.

[0027] Figura 2 A, B, C, D y E. Actividad antiproliferativa de proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas anti-CD38 con diferentes sustituciones de aminoácidos quitando el sitio de glicosilación O-ligado del IFN α 2b atenuado.

5 [0028] Figura 3: Actividades específicas de proteínas de fusión (A) A10.21 y (B) A10.43 IFN α 2b atenuadas anti-CD38 con (T106T) y sin (T106A) glicosilación O-ligada del IFN α 2b.

[0029] Figura 4: Actividades inespecíficas de proteínas de fusión (A) A10.21 y (B) A10.43 IFN α 2b atenuadas anti-CD38 con
10 (T106T) y (T106A) sin glicosilación O-ligada del IFN α 2b.

[0030] Figura 5: Actividad inespecífica mediante proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas anti-CD38 con (T106T) y sin (T106A o Δ T106) glicosilación O-ligado del IFN α 2b.

[0031] Figura 6 A, B, C, D, E y F: Actividad inespecífica
15 de las proteínas de fusión de IFN α 2b atenuadas anti-CD38 con diferentes sustituciones de aminoácidos eliminando el sitio de glicosilación O-ligado del IFN α 2b atenuado.

[0032] Figura 7: Actividad inespecífica de las proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas anti-CD38 A10.43 con (T106T) o sin
20 (T106A) glicosilación O-ligada del IFN α 2b.

[0033] Figura 8: Potencia de dosificaciones subóptimas de proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas anti-CD38 con (T106T) o sin (T106A) glicosilación O-ligado en el tratamiento de tumores en un modelo murino de mieloma múltiple.

[0034] Figura 9: Número de especies cargadas de proteínas de fusión de IFN α 2b atenuadas anti-CD38 A10.21 con (T106T) o sin (G106A, Δ T106, T106S, T106V, T106G, T106E) glicosilación del IFN α 2b, como se evaluó por el número de bandas en gel IEF.

5 [0035] Figura 10: Número de especies cargadas de proteínas de fusión de IFN α 2b atenuadas con A10.21 anti-CD38 con (T106T) o sin (T106A) glicosilación O-ligado del IFN α 2b y con isotipos de Fc variables, evaluados por el número de bandas en gel IEF.

[0036] Figura 11: Número de especies cargadas de proteínas
10 de fusión IFN α 2b atenuadas anti-CD38 A10.21 (IgG4 con S228P) con (T106T) o sin (T106A) glicosilación O-ligada del IFN α 2b en presencia de sustituciones YTE en la región constante del anticuerpo, según se evaluó por el número de bandas en gel IEF.

15 [0037] Figura 12: Número de especies cargadas de proteínas de fusión de IFN α 2b atenuadas anti-CD38 A10.21 (IgG4 con S228P) con (T106T) o sin (T106A) glicosilación O-ligada del IFN α 2b en presencia de una variedad de sustituciones atenuantes de IFN, según se evaluó por el número de bandas en gel IEF.

20 [0038] Figura 13: Número de especies cargadas de anticuerpos con diferentes especificidades de blanco; Anticuerpo anti-CD138, anticuerpo anti-HLA y anticuerpo anti-CD38 (A02.12) (todos IgG4 con S228P) fusionados a IFN α 2b

atenuado con (T106T) o sin (T106A) glicosilación O-ligada del IFN α 2b, evaluado por el número de bandas en gel IEF.

[0039] Figura 14: Actividades “específicas” de proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas anti-CD38 (A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D)) con (T106T) y sin (T106A, Δ T106, T106S, T106V, T106G, T106E) glicosilación O-ligada del IFN α 2b.

[0040] Figura 15: Actividades “específicas” de dos diferentes proteínas de fusión IFN α 2b anticuerpo-atenuadas anti-CD38 (A02.12 y A10.21, ambas IgG4 con S228P) que se unen a epítomos diferentes sobre CD38 con (T106T) o sin (T106A) glicosilación O-ligado del IFN α 2b.

[0041] Figura 16: Actividades “específicas” de las proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas anti-CD38 A10.21 (A10.21 IgG4 (S228P) IFN) con (T106T) y sin (T106A) glicosilación O-ligada del IFN α 2b, con una variedad de sustituciones atenuantes de IFN (R33A, R144I, R145Q, A145K o A145G).

[0042] Figura 17: Actividades “específicas” de anticuerpos con diferentes especificidades de blanco; El anticuerpo anti-CD138 y el anticuerpo anti-HLA (ambos IgG4 con S228P) fusionados a IFN α 2b atenuado con (T106T) o sin (T106A) glicosilación O-ligada del IFN α 2b.

[0043] Figura 18: Actividades “específicas” de las proteínas de fusión IFN α 2b atenuada anti-CD38 A10.21 (A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D)) con (T106T) y sin (T106A)

glicosilación O-ligado del IFN α 2b, en presencia de la sustitución de YTE en la cadena pesada del anticuerpo.

[0044] Figura 19: Actividades “específicas” de las proteínas de fusión IFN α 2b atenuada anti-CD38 A10.21 (A145D) con (T106T) y sin (T106A) glicosilación O-ligada del IFN α 2b, con una variedad de inmunoglobulinas Fc isotipos.

[0045] Figura 20: Índice de selectividad de las proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas anti-CD38 A10.21 con y sin glicosilación O-ligada del IFN α 2b en presencia de una variedad de sustituciones de aminoácidos para eliminar la glicosilación del IFN, sustituciones YTE en la región constante de la inmunoglobulina para la semivida prolongada, la atenuación del IFN y los isotipos Fc.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0046] A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto lo exija de otro modo, la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “comprendiendo”, se entenderá que implica la inclusión de un elemento o grupo de elementos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o grupo de elementos.

[0047] La referencia en esta memoria descriptiva a cualquier publicación previa (o información derivada de ella), o a cualquier materia conocida, no es y no debe tomarse como

reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia que la publicación previa (o la información derivada de él) o materia conocida forma parte del conocimiento general común en el campo de esfuerzo al que se refiere esta memoria
5 descriptiva.

[0048] Todas las publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

[0049] Debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en la especificación objeto, las formas singulares “una” y “el”
10 incluyen aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “un agente” incluye un solo agente, así como dos o más agentes; la referencia a “una molécula” incluye una sola molécula, así como dos o más moléculas; etcétera.

15 [0050] Los constructos de la presente invención son constructos de fusión IFN α 2b aglicosilados atenuados ligando de polipéptidos, que muestran un índice de selectividad de antígeno elevado con respecto a la activación de vías de señalización debido a la acción tanto del ligando dirigido a
20 un receptor de superficie celular en una célula de interés y el IFN α 2b atenuado que tiene afinidad reducida a un receptor de IFN de la superficie celular. Estas construcciones se basan en el descubrimiento descrito en WO 2013/059885 que, en el contexto de una construcción de fusión de anticuerpo-IFN, la

porción de IFN puede ser mutada de tal manera que la actividad de IFN en células negativas a antígeno se atenúa dramáticamente, mientras que la actividad de IFN en las células positivas al antígeno es sólo moderadamente, si es que la hay, 5 atenuada. Dichas construcciones muestran una potencia mayor de una, dos, tres, cuatro o cinco órdenes de magnitud sobre las células positivas al antígeno en comparación con las células negativas al antígeno que la del IFN libre. En una realización, la construcción de IFN anticuerpo atenuada retiene al menos el 10 1%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40% o al menos el 50% de la potencia de las células positivas al antígeno como el IFN no atenuado libre (es decir, no unido a un anticuerpo). Además, en una realización, la construcción de IFN atenuada con anticuerpo retiene al menos el 30%, al 15 menos el 50%, al menos el 75% o al menos el 90% de la actividad máxima de la proteína IFN no atenuada libre (es decir, no unida a un anticuerpo); En este contexto, debe entenderse que la "actividad máxima" significa la cantidad de actividad de señalización (o efecto descendente de la misma) en la porción 20 alta de meseta de una curva dosis-respuesta, en la que otros incrementos en el agente no incrementan adicionalmente la cantidad de respuesta).

[0051] Los presentes inventores han encontrado ahora que se obtiene una ventaja inesperada utilizando construcciones que

comprenden IFN α 2b aglicosilado en comparación con las construcciones que comprenden IFN α 2b O-glicosilado. En algunas realizaciones, estas ventajas incluyen uno o más de un incremento en la actividad específica, una mayor selectividad por el objetivo y una mayor afinidad para FcRn, proporcionando al mismo tiempo un producto menos heterogéneo que el IFN α 2b O-glicosilado cuando se produce en un sistema de expresión de células de mamífero. Es deseable una unión FcRn mejorada para mejorar el pK de un agente terapéutico biológico que comprende una región Fc. Es deseable una mayor selectividad de diana, ya que potencialmente reduce la toxicidad inespecífica manteniendo sustancialmente la actividad de específica. Una reducción en la heterogeneidad permite aumentos en los rendimientos de producto purificado de un sistema de cultivo de células de mamífero.

[0052] En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende un primer y un segundo dominio, en el que el primer dominio comprende un ligando polipeptídico que se une a un antígeno asociado a la superficie celular y el segundo dominio comprende interferón α aglicosilado 2b (IFN α 2b) que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y en la que el IFN α 2b aglicosilado comprende además una o más sustituciones o deleciones de aminoácidos que atenúan la actividad del IFN α 2b aglicosilado.

[0053] En una realización de la presente invención, la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en el que el residuo en la posición 106 es A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W o Y. Esto representa una sustitución del T106 normalmente presente en IFN α 2b humano con un aminoácido natural que no permite la glicosilación O-ligada en esta posición cuando se produce en cultivo de células de mamífero. En otra realización de la presente invención, la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 2. Esto representa una 5 delección del residuo que se desactiva. Como se demuestra en el presente documento, cada una de las sustituciones o delecciones elimina el sitio de O-glicosilación del IFN α 2b atenuado humano y reduce la heterogeneidad de la molécula medida en geles de IEF, cuando se expresa por células CHO y mientras que al menos 15 sustancialmente mantiene la actividad del IFN α 2b atenuado para unir receptores IFN de la superficie celular y para iniciar la señalización posterior.

[0054] En realizaciones adicionales, la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificado por una mutación 20 atenuante seleccionado del grupo que se compone L15A, R22A, R23A, S25A, L26A, F27A, L30A, L30V, K31A, D32A, R33A, R33K, R33Q, H34A, Q40A, D114R, L117A, R120A, R120E, R125A, R125E, K131A, E132A, K133A, K134A, M148A, R149A, S152A, L153A, N156A, (L30A, H57Y, E58N y Q61S), (M148A, H57Y, E58N y Q61S), (L153A,

H57Y, E58N y Q61S), (R144A, H57Y, E58N y Q61S), (N65A, L80A, Y85A y Y89A,) (N65A, L80A, Y85A, Y89A y D114A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A y L117A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A y R120A), (Y85A, Y89A y D114A), (D114A y R120A), (L117A y R120A), (L117A, R120A y K121A), (R120A y K121A), (R120E y K121E), sustitución de R en la posición 144 por A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V o Y, sustitución de A en la posición 145 por D, E, G, H, I, K, L, T, V o Y, y delección de los residuos L161 a E165.

[0055] En realizaciones adicionales, la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 2 modificado por una mutación atenuante seleccionado del grupo que se compone de L15A, R22A, R23A, S25A, L26A, F27A, L30A, L30V, K31A, D32A, R33A, R33K, R33Q, H34A, Q40A, D113R, L116A, R119A, R119E, R124A, R124E, K130A, E131A, K132A, K133A, M147A, R148A, S149A, L152A, N155A, (L30A, H57Y, E58N y Q61S), (M147A, H57Y, E58N y Q61S), (L152A, H57Y, E58N y Q61S), (R143A, H57Y, E58N y Q61S), (N65A, L80A, Y85A y Y89A,) (N65A, L80A, Y85A, Y89A y D113A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A y L116A), (N65A, L80A, Y85A, Y89A y R1190A), (Y85A, Y89A y D113A), (D113A y R119A), (L116A y R119A), (L116A, R119A y K120A), (R119A y K120A), (R119E y K120E), sustitución de R en la posición 143 por A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V o Y, sustitución de A en la posición 144 por D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V y Y, y delección de los residuos L160 a E164.

[0056] En otra realización, la secuencia del IFN α 2b aglomerado modificado por una mutación atenuante se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3 a 30 y SEQ ID NO: 32 a 47.

5 [0057] En otra realización, el antígeno asociado a la superficie celular se selecciona del grupo que consta en CD38, CD138, ligando RANK, HM1.24, CD56, CS1, CD20, CD74, IL-6R, Blys (BAFF), BCMA, HLA-SR , HLA-DR, quinínógeno, microglobulina beta2, FGFR3, ICAM-1, matriptasa, CD52, EGFR,
10 GM2, integrina alfa4, IFG-1R, KIR, CD3, CD4, CD8, CD24, CD44, CD69, CD71, CD79, CD81 , CD86, CD96, HLA, PD-1, ICOS, CD33, CD115, CD11c, CD19, CD52, CD14, FSP1, FAP, PDGFR alfa, PDGFR beta, ASGR1, ASGR2, FSP1, RTI140/Ti-alfa, HTI56, De VEGF, CD241, producto del gen RCHE, CD117 (c-kit), CD71 (receptor de
15 transferencia), CD36 (receptor de trombospondina), CD34, CD45RO, CD45RA, CD115, CD168, CD235, CD236, CD237, CD238, CD239 Y CD240.

[0058] En ciertas realizaciones, el ligando polipeptídico es un anticuerpo o un acto de unión un antígeno del mismo.

20 [0059] En otra realización, el ligando polipeptídico es un anticuerpo que se une a CD38. Se prefiere que la secuencia VH del anticuerpo se seleccione del grupo que se convierte en SEQ ID No.: 48 a 56 y 58 y que la secuencia VL del anticuerpo se

selecciona del grupo que se convierte en SEQ ID NO: 81, 82 y 84.

[0060] En otra realización, el ligando polipeptídico es un anticuerpo que se encuentra en un CD138. Se prefiere que la
5 secuencia VH del anticuerpo SEQ ID NO: 59 y que la secuencia VL del anticuerpo SEQ ID NO: 85.

[0061] En otra realización, el ligando polipeptídico se une al ligando RANK. Se prefiere la secuencia del ligando polipeptídico del mar SEQ ID NO: 57.

10 [0062] En otra realización, el primer dominio está unido al segundo dominio a través de un enlace peptídico. El primer dominio puede estar enlazado al segundo dominio directamente por un enlace peptídico (un "enlazador de longitud cero") o a través de un enlazador peptídico de 1 a 20 aminoácidos de
15 longitud. El enlazador puede ser (SGGGGS)_n en el que n es 1 a 3. Ejemplos de enlazadores incluyen SGGGGS y SGGGGS₂SGGGGS.

[0063] En otra realización, el extremo C del primer dominio está unido al extremo N del segundo dominio.

20 [0064] En otra realización, la secuencia de aminoácidos del primer dominio está glicosilada.

[0065] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, 61 a 77,

83 y 87, y una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 81, 82 y 84.

[0066] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende SEQ ID NO: 87 y SEQ ID
5 NO: 81.

[0067] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 85.

[0068] En otro aspecto, la presente invención proporciona
10 un polipéptido de fusión que comprende SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86.

[0069] En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende SEQ ID NO: 78.

[0070] Como se comprenderá a partir de la discusión
15 anterior, las formas particulares del polipéptido de fusión de la presente invención son las siguientes:

- a. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es A.
- 20 b. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es C.

- c. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es D.
- d. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es E.
- e. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es F.
- 10 f. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es G.
- g. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 15 106 es H.
- h. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es I.
- i. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 20 106 es K.
- j. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es L.

- k. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es M.
- l. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es N.
- m. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es P.
- 10 n. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es Q.
- o. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 15 106 es R.
- p. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es V.
- q. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 20 106 es W.
- r. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 en la que el residuo en la posición 106 es Y.

- s. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante L15A.
- t. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante A19W.
- u. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante R22A.
- v. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante R23A.
- w. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante S25A.
- x. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante L26A.
- y. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante F27A.
- z. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante L30A o L30V.

- aa. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante K31A.
- bb. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del
5 IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante D32A.
- cc. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante R33A, R33K o R33Q.
- 10 dd. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante H34A.
- ee. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada
15 por la mutación atenuante Q40A.
- ff. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante D114R o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante D113R.
- 20 gg. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante L117A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante L116A.

- hh. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante R120A o R120E o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante R119A o R119E.
- 5 ii. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante R125A o R125E o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante R124A o R124E.
- jj. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del
10 IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante K131A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante K130A.
- kk. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación
15 atenuante E132A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante E131A.
- ll. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante K133A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación
20 atenuante K132A.
- mm. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante K134A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante K133A.

nn. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante M148A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante M147A.

5 oo. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante R149A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante R148A.

pp. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del
10 IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante S152A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante S151A.

qq. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación
15 atenuante L153A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación atenuante L152A.

rr. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por la mutación atenuante N156A o SEQ ID NO: 2 modificada por la mutación
20 atenuante N155A.

ss. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por las mutaciones atenuantes L30A, H57Y, E58N y Q61S.

tt. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones atenuantes M148A, H57Y, E58N y Q61S o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones atenuantes M147A, H57Y, E58N y
5 Q61S.

uu. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones atenuantes L153A, H57Y, E58N y Q61S o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones atenuantes L152A, H57Y, E58N y
10 Q61S.

vv. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones atenuantes R144A, H57Y, E58N y Q61S o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones atenuantes R143A, H57Y, E58N y
15 Q61S.

ww. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 modificada por las mutaciones atenuantes N65A, L80A, Y85A y Y89A.

xx. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del
20 IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones atenuantes N65A, L80A, Y85A, Y89A y D114A o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones atenuantes N65A, L80A, Y85A, Y89A y D113A.

yy. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones atenuantes N65A, L80A, Y85A, Y89A y L117A o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones atenuantes N65A, L80A, Y85A, Y89A y L116A.

zz. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones atenuantes N65A, L80A, Y85A, Y89A y R120A o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones atenuantes N65A, L80A, Y85A, Y89A y R119A.

aaa. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones atenuantes Y85A, Y89A y D114A o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones atenuantes Y85A, Y89A y D113A.

bbb. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones atenuantes D114A y R120A o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones atenuantes D113A y R119A.

ccc. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones atenuantes L117A y R120A o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones atenuantes L116A y R119A.

ddd. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las

mutaciones L117A, R120A y K121A o SEQ ID NO: 2 modificadas por las mutaciones L116A, R119A y K120A.

eee. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones R120A y K121A o SEQ ID NO: 2 modificada por las mutaciones R119A y K120A.

fff. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por las mutaciones R120E y K121E o SEQ ID NO: 2 modificada por las mutaciones R119E y K120E.

ggg. El polipéptido de fusión en el que la secuencia de la SEQ ID NO: 1 modificada por sustitución de R en la posición 144 por A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V o Y o SEQ ID NO: 2 se modifica sustituyendo R en la posición 143 por A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V o Y.

hhh. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por sustitución de A en la posición 145 por D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V o Y o SEQ ID NO: 2 modificado por sustitución de A en la posición 144 por D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V o Y.

iii. El polipéptido de fusión en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado es SEQ ID NO: 1 modificada por delección de los residuos L161 a E165 o SEQ ID NO: 2 modificada por delección de los residuos L161 a E165.

jjj. El polipéptido de fusión según la reivindicación 1, en el que la secuencia del IFN α 2b aglicosilado se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 a 30 y SEQ ID NO: 32 a 47.

[0071] El término anticuerpo, como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, variante, mutante, o su derivación, que retiene las características esenciales de unión de epítipo de una molécula de Ig. Tales formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados son conocidos en la técnica, realizaciones no limitantes de las cuales se discuten a continuación.

[0072] En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL, que en los seres humanos puede ser de la clase κ o λ . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas

regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

10 [0073] El término “dominio de unión al antígeno” o “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo, como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo o proteína que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD38). Se ha

15 demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales realizaciones de anticuerpos también pueden ser formatos biespecíficos, específicos duales, o multi-específicos, que se unen específicamente a dos o más

20 antígenos diferentes. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y $CH1$; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende

dos fragmentos Fab además de una parte de la región bisagra, unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo
5 brazo de un anticuerpo, (v) un anticuerpo del dominio (dAb) (Ward et al., 1989 Nature 341 544-6, Winter et al., Publicación PCT WO 90/05144 Al incorporado aquí como referencia), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región aislada de determinación de la complementariedad (CDR). Además, aunque
10 los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una única cadena proteica en la que el VL Y las regiones VH se unen para formar moléculas monovalentes
15 (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv), véase, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242 423-6, Huston et. al., 1988 Proc Natl Acad Sci USA 85 5879-83). Tales anticuerpos de cadena única también están destinados a estar comprendidos dentro del término "porción de unión al antígeno" de un
20 anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir

el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios De otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (ver, por ejemplo, Holliger, P., *et al.*, 1993, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, RJ, *et al.* 2: 1121 - 112). Tales porciones de unión a anticuerpos son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering 2001 Springer-Verlag, New York, 790 pp., ISBN 3-540-41354-5). En una realización, la porción de unión al anticuerpo es un fragmento Fab.

[0074] El anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humanizado" se entenderá que hace referencia a una proteína que comprende una región variable de tipo humano, que incluye CDRs de un anticuerpo de una especie no humana (por ejemplo, ratón o rata o primate no humano) injertada o insertada en los FRs de un anticuerpo humano (este tipo de anticuerpo también se refiere a un "anticuerpo injertado con CDR"). Los anticuerpos humanizados también incluyen proteínas en las que uno o más residuos de la proteína humana se modifican mediante una o más sustituciones de aminoácidos y/o uno o más residuos FR de la proteína humana se sustituyen por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo

humano o en el anticuerpo no humano. Cualquier región adicional de la proteína (por ejemplo, región Fc) es generalmente humana. La humanización puede realizarse usando un método conocido en la técnica, por ejemplo, US5,225,539, US6,054,297, US7,566,771
5 o US5,585,089. El término "anticuerpo humanizado" también abarca un anticuerpo súper humanizado, por ejemplo, como se describe en US7.732.578.

[0075] El anticuerpo descrito en la presente puede ser humano. El término "anticuerpo humano" tal como se utiliza en
10 la presente memoria se refiere a proteínas que tienen regiones de anticuerpo variables y, opcionalmente, constantes encontradas en seres humanos, por ejemplo, en la línea germinal humana o células somáticas o de bibliotecas producidas usando dichas regiones. Los anticuerpos "humanos" pueden incluir
15 residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas, por ejemplo, mutaciones introducidas por mutaciones aleatorias o dirigidas al sitio in vitro (en particular mutaciones que implican sustituciones conservadoras o mutaciones en un número pequeño de residuos de la proteína, por ejemplo, en 1, 2, 3,
20 4 o 5 de los residuos de la proteína). Estos "anticuerpos humanos" no necesariamente deben generarse como resultado de una respuesta inmune de un ser humano, sino que pueden generarse usando medios recombinantes (por ejemplo, cribando una biblioteca de presentación de fagos) y/o un animal

transgénico (por ejemplo, un ratón) que comprende ácido nucleico que codifica regiones constantes y/o variables de anticuerpo humano y/o usando selección guiada (por ejemplo, como se describe en US5,565,332). Este término también abarca
5 formas maduras por afinidad de tales anticuerpos. Para los propósitos de la presente descripción, también se considerará que una proteína humana incluye una proteína que comprende FRs de un anticuerpo humano o FRs que comprenden secuencias de una secuencia de consenso de FRs humanas y en la que una o más de
10 las CDR son aleatorias o semi-aleatorias, por ejemplo, como se describe en los documentos US6.300.064 y/o US6.248.516.

[0076] Las porciones de anticuerpo de polipéptidos de la presente invención pueden ser anticuerpos de longitud completa de cualquier clase, preferiblemente IgG1, IgG2 o IgG4. Los
15 dominios constantes de tales anticuerpos son preferiblemente humanos. Las regiones variables de tales anticuerpos pueden ser de origen no humano o, preferentemente, ser de origen humano o ser humanizadas. También pueden usarse fragmentos de anticuerpo en lugar de los anticuerpos de longitud completa.

20 [0077] El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos manipulados. Como se apreciará, existen muchas variaciones de anticuerpos manipulados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón, quiméricos, humanizados y humanos, fragmentos de anticuerpo variables de cadena sencilla (scFv), minicuerpos,

aptámeros, así como anticuerpos biespecíficos y diacuerpos como se ha descrito anteriormente).

[0078] Los dominios de región variable únicos (denominados dAb) se describen, por ejemplo, en (Ward *et al.*, 1989, Nature 341: 544-546, Hamers-Casterman *et. al.*, 1993, Nature 363: 446-448, Davies & Riechmann, 1994, FEBS Lett., 339: 285 - 290).

[0079] Los minicuerpos son versiones pequeñas de anticuerpos enteros, que codifican en una sola cadena los elementos esenciales de un anticuerpo completo. Convenientemente, el minicuerpo se compone de los dominios VH y VL de un anticuerpo nativo fusionado a la región bisagra y dominio CH3 de la molécula de inmunoglobulina como, por ejemplo, se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.837.821.

[0080] En una realización alternativa, el anticuerpo manipulado puede comprender marcos de proteínas derivados de no inmunoglobulina. Por ejemplo, puede hacerse referencia a (Ku & Schutz, 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 6552-6556) que describe una proteína citocromo b562 de cuatro hélices que tiene dos bucles asignados al azar para crear CDRs, que había sido seleccionado para la unión al antígeno.

[0081] Existe una plétora de estructuras de dominio de proteína o dominio de proteína que no son de anticuerpos que pueden utilizarse como los dominios de unión a antígenos en

las construcciones de esta invención. Estos incluyen andamiajes basados en el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxico (CTLA-4) (Evibody; US7, 166.697); Transferrina humana (Trans-cuerpo); Un haz de tres hélices del dominio Z de la Proteína A (Affibody); Un dominio monomérico o trimérico de lectina humana de tipo C (Tetranectina); El décimo dominio de fibronectina humana de tipo III (AdNectin); el dominio de tipo Kunitz del inhibidor de tripsina humano o bovino; Defensina A de insecto (IICA29), APPI (dominios Kunitz); Lipocalinas, FABP, proteína de unión a Bilina, Apolipoproteína D (Anticalinas); α -cristalina humana o molécula de ubiquitina (Afilina); Inhibidor de la tripsina II (Microcuerpo); A2p8 o repetición de anquirina (proteínas de motivo repetido), Caribdotoxina (toxinas Escorpión), Min-23, dominio de unión a celulosa (Knottins); Neocarzinostatina, CBM4-2 y Tendamistat.

[0082] Además, aparte de andamiajes proporcionados por dominios derivados de anticuerpos o pliegues de no-anticuerpo como se ha descrito anteriormente, existen proteínas o dominios de proteínas de unión a ligandos de origen natural que pueden utilizarse como los dominios de unión al ligando en esta invención. Por ejemplo, los dominios de proteínas que poseen propiedades de unión al ligando incluyen dominios extracelulares de receptores, módulos PDZ de proteínas de

señalización, tales como la proteína AF-6 de unión a Ras, moléculas de adhesión y enzimas.

[0083] Usando métodos bien conocidos en la técnica para aumentar la unión, por ejemplo, maduración por afinidad, o para disminuir la inmunogenicidad mediante la eliminación de los motivos de unión al MHC de clase II predichos. La utilidad terapéutica de los anticuerpos descritos en la presente invención puede potenciarse adicionalmente modulando sus características funcionales, tales como citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), semivida en suero, biodistribución y unión a receptores Fc o la combinación de cualquiera de estos. Esta modulación puede lograrse mediante ingeniería de proteínas, glico-ingeniería o métodos químicos. Dependiendo de la aplicación terapéutica requerida, podría ser ventajoso aumentar o disminuir cualquiera de estas actividades.

[0084] Un ejemplo de glico-ingeniería empleó el método Potelligent® como se describe en Shinkawa T. *et al.*, 2003 (J Biol Chem 278: 3466-73).

[0085] Numerosos métodos para la maduración por afinidad de anticuerpos son conocidos en la técnica. Muchos de estos se basan en la estrategia general de generar paneles o bibliotecas de proteínas variantes mediante mutagénesis seguida de

selección y/o cribado para afinidad mejorada. La mutagénesis se realiza a menudo a nivel de ADN, por ejemplo, mediante PCR propensa a errores (Thie, Voedisch *et al.*, 2009, *Methods Mol Biol* 525: 309-322), mediante shuffling o “barajado” genético (Kolkman y Stemmer 2001, *Nat Biotechnol.* 5): 423-8), mediante el uso de sustancias químicas mutagénicas o la irradiación, mediante el uso de cepas “mutadoras” con maquinaria de replicación propensa a errores (Greener 1996, *In Vitro Mutagenesis Protocols*, Humana Press, NJ) o mediante enfoques de hipermutación somática que aprovechan los recursos naturales. Maquinaria de maduración por afinidad (Peled, Kuang *et al.*, 2008, *Annu Rev Immunol.*, 26: 481-511). La mutagénesis también puede realizarse a nivel de ARN, por ejemplo, mediante el uso de Q β replicasa (Kopsidas, Roberts *et al.*, 2006, *Immunol Lett.*, 2006, 15 de noviembre, 107 (2): 163-8). Los métodos basados en bibliotecas que permiten la detección de proteínas variantes mejoradas pueden basarse en diversas tecnologías de desplegamiento tales como fagos, levaduras, ribosomas, células de bacterias o mamíferos, y son bien conocidos en la técnica (Benhar 2007, *Expert Opin Biol Ther.* Mayo. 7(5): 763 - 79). La maduración de afinidad puede conseguirse por métodos más dirigidos/predictivos, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida o síntesis génica guiada por los hallazgos del modelado de proteínas 3D (véase por ejemplo Queen, Schneider

et al., 1989, PNAS, 86 (24): 10029-33 O patente US 6.180.370 o patente US 5.225.539).

[0086] Métodos de aumento de ADCC han sido descritos por Ferrara, Brunker *et al.* 2006, Biotechnol Bioeng; 93: 851 - 61; Li, Sethuraman *et al.* 2006, Nat Biotechnol; 24: 210 - 5; Stavenhagen, Gorlatov *et al.* 2007, Cancer Res; 67: 8882 - 90; Shields, Namenuk *et al.* 2001, J Biol Chem; 276: 6591 - 604; Shinkawa, Nakamura y col. 2003, J Biol Chem; 278: 3466 - 73; Y WO 2008/006554.

10 [0087] Métodos de aumento de CDC han sido descritos por Idusogie, Wong *et al.* 2001, J Immunol; 176: 346 - 56; Dall'Acqua, Cook *et al.* 2006, J Biol Chem; 281: 23514 - 24; Michaelsen, Aase *et al.* 1990, Scand J Immunol; 32: 517 - 28; Brekke, Bremnes *et al.* 1993, Mol Immunol; 30: 1419 - 25; Tan, 15 Shopes *et al.* 1990, PNAS; 87: 162 - 6; Y Norderhaug, Brekke *et al.* 1991, Eur J Immunol; 21: 2379 - 84.

[0088] Las referencias que describen métodos para aumentar ADCC y CDC incluyen Natsume, In *et al.* 2008, Cancer Res; 68: 3863 - 72. La descripción de cada una de estas referencias se 20 incluye aquí mediante referencia cruzada. En ciertas realizaciones puede ser ventajoso reducir o eliminar las actividades de ADCC y CDC del componente de anticuerpo del polipéptido de la invención, de manera que la actividad de

IFN α 2b es la actividad principal del polipéptido que modula la supervivencia de células diana.

[0089] Un número de métodos para modular la vida media del suero del anticuerpo y la biodistribución se basan en la modificación de la interacción entre el anticuerpo y el receptor Fc neonatal (FcRn), un receptor con un papel clave en la protección de la IgG del catabolismo y el mantenimiento de alta concentración de anticuerpo sérico. Dall'Acqua *et al.* describen sustituciones en la región Fc de IgG1 que aumentan la afinidad de unión a FcRn, aumentando con ello la semivida en suero (Dall'Acqua, Woods *et al.*, 2002, *J Immunol*, 169: 5171-80) Biodisponibilidad y modulación de la actividad ADCC con sustitución triple de M252Y/S254T/T256E (con numeración de residuos de acuerdo con el índice EU) o M265Y/S267T/T269 (con numeración de residuos según el sistema de numeración Kabat) (Dall'Acqua, Kiener *et al.*, 2006, *J Biol Chem.*, 279: 6213 - 6). Véase también Pat. Nos. 6.277.375; 6.821.505; Y 7.083.784. Hinton *et al.* han descrito sustituciones de aminoácidos de dominio constante en las posiciones 250 y 428 que confieren una vida media aumentada en el tiempo de vida (Hinton, Johlfs *et al.*, 2004, *J Biol Chem*, 279: 6213-6, Hinton, Xiong *et al.*, 2006, *J Immunol*, 176: 346 - 56). Véase también Pat. N° 7.217.797. Petkova *et al.* han descrito sustituciones de aminoácidos de dominio constante en las posiciones 307, 380 y

434 que confieren una vida media aumentada *in vivo* (Petkova, Akilesh *et al.*, 2006, *Int Immunol*; 18: 1759-69). Véase también Shields *et. al.* 2001, *J Biol Chem*; 276: 6591 - 604 y WO 2000/42072. Otros ejemplos de sustituciones de aminoácidos de dominio constante que modulan la unión a los receptores Fc y la función subsiguiente mediada por estos receptores, incluyendo la unión a FcRn y la semivida del suero, se describen en las Patentes de EE.UU. Solicitudes No. 20090142340; 20090068175 y 20090092599. La sustitución denominada en la presente memoria "S228P" que está numerada de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat también se ha denominado "S241P" según Kabat *et al.* (1987 *Secuencias de proteínas de interés inmunológico*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Washington DC). Esta sustitución estabiliza la región bisagra de las moléculas de IgG4, teniendo el efecto de hacer que la secuencia del núcleo de la región bisagra sea la misma que la de un anticuerpo de isotipo IgG1 o IgG2. Esto da como resultado una reducción en la disociación espontánea y la reasociación de las cadenas pesadas que a menudo conduce a la producción de anticuerpos heterodiméricos de IgG4.

[0090] Se sabe que los glicanos ligados a las moléculas de anticuerpo influyen en las interacciones del anticuerpo con los receptores Fc y los receptores de glicano y por lo tanto

influyen en la actividad del anticuerpo, incluyendo la semivida del suero (Kaneko, Nimmerjahn *et al.*, 2006, Science 313: 670-3; Jones, Papac *et al.*, 2007, Glycobiology, 17: 529-40, y Kanda, Yamada y *et. al.*, 2007, Glycobiology, 17: 104-18). Por lo tanto, ciertas glicoformas que modulan las actividades de anticuerpo deseadas pueden conferir ventaja terapéutica. Los métodos para generar glicoformas manipuladas son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las Patentes de EE.UU. Nos US6,602,684; US 7,326,681; US7.388.081 y en el documento WO 2008/006554.

[0091] La extensión de semivida por adición de polietilenglicol (PEG) ha sido ampliamente utilizada para prolongar la semivida en suero de proteínas, tal como se ha revisado, por ejemplo, por Fishburn 2008, J Pharm Sci; 97: 4167 - 83.

[0092] Como se reconocerá, es posible realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de las secuencias de la presente invención. Por "sustitución conservativa" se entiende los aminoácidos que tienen propiedades similares. Tal como se utiliza en la presente, los siguientes grupos de aminoácidos deben considerarse sustituciones conservadoras: H, R y K; D, E, N y Q; V, I y L; C y M; S, T, P, A y G; Y F, Y y W. No se pretende; sin embargo,

que se hagan sustituciones distintas de las específicamente recitadas en los sitios de atenuación y/o glicosilación.

[0093] El término antígeno asociado a la superficie celular, tal como se utiliza en la presente, se refiere
5 ampliamente a cualquier antígeno expresado en superficies de células, incluyendo, sin limitación, células malignas o células infecciosas o extrañas.

[0094] En ciertos aspectos de la presente invención, las construcciones o composiciones polipeptídicas de fusión de la
10 presente invención se pueden usar para tratar pacientes con cáncer. Los cánceres contemplados en la presente incluyen: un grupo de enfermedades y trastornos que se caracterizan por crecimiento celular no controlado (por ejemplo, formación de tumor) sin ninguna diferenciación de esas células en células
15 especializadas y diferentes. Tales enfermedades y trastornos incluyen protooncogen ABL1, cánceres relacionados con SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnogénica, alopecia, sarcoma de partes
20 blandas alveolares, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma , Ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer de intestino, glioma de tronco encefálico, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores carcinoides,

cáncer cervical, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejidos blandos en niños, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, el
5 linfoma cutáneo de células T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor de células redondeadas desmoplásicas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, ojo: melanoma, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia
10 de Fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, los cánceres gastrointestinales, tumores carcinoides gastrointestinales, cánceres genitourinarios, los tumores de células germinales, enfermedad gestacional-trofoblástica, glioma, cánceres ginecológicos, los tumores malignos
15 hematológicos, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, cáncer de pulmón, cáncer de laringe, leiomiosarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón,
20 linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoideo maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes

mielodisplásicos, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de Nijmegen, no melanoma Cáncer de piel, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cánceres oculares, 5 cáncer de esófago, cáncer de cavidad bucal, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovario de ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, tumores 10 neuroectodérmicos periféricos, cáncer de pituitaria, policitemia vera, cáncer de próstata, trastornos de cánceres raros y asociados, carcinoma de células renales, Síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de glándula salival, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de 15 pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (Piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de 20 células de transición (uréter renal-pelvis), cáncer trofoblástico, cáncer uretral, El cáncer del sistema urinario, las uroplaquias, el sarcoma uterino, el cáncer de útero, el cáncer vaginal, el cáncer de vulva, la macroglobulinemia de Waldenstrom y el tumor de Wilms. En una realización, el tumor

se selecciona de un grupo de mieloma múltiple o linfoma de no Hodgkin.

[0095] Tal como se contempla para el tratamiento del cáncer, las porciones de anticuerpo de las construcciones de fusión de la presente invención pueden unirse a antígenos asociados a tumores, es decir, a antígenos de superficie celular que son expresados selectivamente por células cancerosas o sobreexpresados en células cancerosas a la mayoría de las células normales. Hay muchos antígenos asociados a tumores (TAA) conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de TAAs incluyen la enzima tirosinasa; Antígeno de melanoma GM2; Alfafetoproteína (AFP); Antígeno carcinoembrionario (CEA); Mucina 1 (MUC1); Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2/Neu); Oncoproteína de leucemia/linfoma 1 de células T (TCL1). Los TAA ejemplares asociados con un número de diferentes tipos de cáncer son la telomerasa (hTERT); Antígeno de membrana específico de próstata (PSMA); Uroquinasa activadora del plasminógeno y su receptor (uPA/uPAR); Factor de crecimiento endotelial vascular y su receptor (VEGF/VEGFR); Inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular (EMMPRIN/CD147); Factor de crecimiento epidérmico (EGFR); Factor de crecimiento derivado de plaquetas y su receptor (PDGF/PDGFR) y c-kit (CD117).

[0096] Una lista de otros TAAs se proporciona en el documento US 2010/0297076, cuya descripción se incluye aquí como referencia. De particular interés son los antígenos de superficie celular asociados con leucemia de mieloma múltiple o células de linfoma, incluyendo, pero sin limitarse a CD38, CD138, CD79, CS1 y HM1.24. En una realización, un antígeno para construcciones de IFN atenuadas con ligando, por ejemplo, una construcción de interferón atenuada con anticuerpo, es CD38.

10 [0097] CD38 es una glicoproteína transmembrana de tipo II de 46 kDa. Tiene una cola citoplasmática N-terminal corta de 20 aminoácidos, una única hélice transmembrana y un dominio extracelular largo de 256 aminoácidos (Bergsagel, P., Blood, 85: 436, 1995 y Liu, Q., Structure, 13: 1331, 2005). Se expresa
15 en la superficie de muchas células inmunes incluyendo células T CD4 y CD8 positivas, células B, células NK, monocitos, células plasmáticas y sobre una proporción significativa de células precursoras de médula ósea normales (Malavasi, F., Hum. Immunol. 9:9, 1984). Sin embargo, en los linfocitos, la
20 expresión parece depender del estado de diferenciación y activación de la célula. Los linfocitos T y B en reposo son negativos mientras que los linfocitos inmaduros y activados son predominantemente positivos para la expresión de CD38 (Funaro, A., J. Immunol., 145: 2390, 1990). Estudios

adicionales indican la expresión de ARNm en órganos no hemopoyéticos tales como páncreas, cerebro, bazo e hígado (Koguma, T. Biochem., Acta 1223: 160, 1994).

[0098] CD38 es una ectoenzima multifuncional que está
5 implicada en la señalización transmembrana y en la adhesión celular. También se conoce como ADP ribosa hidrolasa cíclica porque puede transformar NAD + y NADP + en cADPR, ADPR y NAADP, dependiendo del pH extracelular. Estos productos inducen la movilización de Ca²⁺ dentro de la célula que puede conducir
10 a la fosforilación de la tirosina y la activación de la célula. CD38 es también un receptor que puede interactuar con un ligando, CD31. La activación del receptor a través de CD31 conduce a eventos intracelulares que incluyen movilización de Ca²⁺, activación celular, proliferación, diferenciación y
15 migración (revisado en Deaglio, S., Trends in Mol. Med. 14: 210, 2008).

[0099] El CD38 se expresa a niveles elevados en células de mieloma múltiple, en la mayoría de las leucemias linfoblásticas agudas de linaje T y B, algunas leucemias mielocíticas agudas,
20 linfomas de células centrales foliculares y linfomas linfoblásticos T. (Malavasi, F., J. Clin Lab Res. 22:73, 1992). Más recientemente, la expresión de CD38 se ha convertido en un marcador pronóstico fiable en la leucemia linfoblástica crónica de Linaje B (B-CLL) (Ibrahim, S., Blood 98: 181, 2001

y Durig, J., Leuk. Res. 25: 927, 2002). Los grupos independientes han demostrado que los pacientes con B-CLL que presentan un clon CD38⁺ se caracterizan por un curso clínico desfavorable con una etapa más avanzada de la enfermedad, una mala respuesta a la quimioterapia y un tiempo de supervivencia más corto (Morabito, F., Haematologica 87: 217, 2002). La expresión consistente y potenciada de CD38 en tumores linfoides hace que sea un objetivo atractivo para tecnologías de anticuerpos terapéuticos.

[0100] Los antígenos preferidos para el desarrollo de construcciones de proteínas de fusión IFN α 2b aglicosiladas de anticuerpo atenuadas que se dirigen al cáncer son antígenos que muestran una expresión selectiva o mayor en las células cancerosas que en la mayoría de las otras células no transformadas dentro del cuerpo. Ejemplos no proteicos de tales antígenos incluyen esfingolípidos, gangliósido GD2 (Saleh et al., 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara et al., 1993, Cancer Immunol. 373 - 380), gangliósido GM2 (Livingston et al., 1994, J. Clin. Oncol. 12: 1036 - 1044), gangliósido GM3 (Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53: 5244-5250) y antígenos de carbohidrato Lewis^x, Lewis^y y lewis^{xy} que se pueden mostrar en proteínas o glicolípidos. Ejemplos de antígenos proteínicos son HER-2/neu, virus del papiloma humano-E6 o -E7, MUC-1; KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, J.

Immunol., 142: 3662-3667, Bumal, 1988, Hybridoma 7 (4): 407-415); Antígeno de carcinoma de ovario CA125 (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51 (2): 468 - 475); Fosfato de ácido prostático (Tailor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18 (16): 4928); Antígeno
 5 específico de próstata (Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys Res. Comm. 160 (2): 903-910, Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53: 227-230); Antígeno asociado al melanoma p97 (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81 (6): 445 - 446); Antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171
 10 (4): 1375 - 1380); Antígeno de membrana específico de próstata; Antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon et al., 1994, Proc. Am. Clin. Oncol. 13: 294), MUC16 (anticuerpos incluyen MJ-170, MJ-171, MJ-172 y MJ-173 [US 7,202,346], 3A5 [US 7,723,485]) NMB (US 8,039,593), antígeno de linfocitos humanos malignos-
 15 APO-1 (Bernhard et al., 1989, Science 245: 301-304); Antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, Cancer 59: 55 - 63, Mittelman et al., 1990, J. Clin. Invest. 86: 2136 - 2144); Antígeno de linfoma de Burkitt-38,13; CD19 (Ghetie et al., 1994, Blood 83: 1329 - 1363); Antígeno-
 20 CD20 de linfoma B humano (Reff et al., 1994, Blood 83: 435-445); GICA 19 - 9 (Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol., 2: 135), CTA - 1 y LEA; CD33 (Sgouros et al., 1993, J. Nucl. Med. 34: 422 - 430); Antígenos oncofetales tales como alfa-fetoproteína para cáncer de hígado o antígeno oncofetal de

tumor de vejiga (Hellstrom et al., 1985, Cancer Res. 45: 2210-2188); Antígenos de diferenciación tales como el antígeno de carcinoma de pulmón humano L6 o L20 (Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46: 3917-3923); Antígenos del fibrosarcoma; Antígeno de células T de leucemia humana-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. Immunol., 141: 1398-1403); Tipo de trasplante específico de tumor de antígeno de superficie celular (TSTA) tal como antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo antígeno T, virus de tumor de ADN y antígenos de envoltura de virus de tumor de ARN; neoglicoproteínas, antígenos de cáncer de mama tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens y col., 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17: 359); Antígeno de mucina epitelial polimórfico; Antígeno de glóbulos grasos de leche humana; Antígenos asociados a tumores colorrectales tales como TAG-72 (Yokata et al., 1992, Cancer Res. 52: 3402-3408), CO 17-1A (Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer 53: 751-758); (Feizi, 1985, Nature 314: 53-57) tales como I (Ma) encontrados en adenocarcinomas gástricos, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, M18 y M39 encontradas en células epiteliales de mama C15 encontrados en el adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en el cáncer de estómago, Y4 hallado en el cáncer gástrico, Y hapteno encontrado en células de carcinoma

embrionario, TL5 (sangre), D156-22 encontrado en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H) Grupo A), antígenos de la serie E1 (grupo sanguíneo B) encontrados en el cáncer de páncreas, FC10.2 encontrados en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Lea) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO -43 (grupo sanguíneo Leb), G49 encontrado en células A431, 19.9 encontrado en cáncer de colon; Mucinas del cáncer gástrico; R24 encontrado en el melanoma MH2 (grupo sanguíneo ALeb/Ley) encontrado en el adenocarcinoma de colon, 4.2, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2 y M1: 22: 25: 8 encontrado en células de carcinoma embrionario y SSEA-3 Y SSEA-4. HMW-MAA, también conocida como condroitina sulfato proteoglicano de melanoma, es una proteína unida a la membrana de 2322 residuos que se sobreexpresa en más del 90% de los nevos benignos removidos quirúrgicamente y lesiones de melanoma (Camploi, et al, Crit Rev Immunol., 24:267, 2004). Por consiguiente, puede ser un antígeno asociado potencialmente a la superficie de la célula diana.

[0101] Otros ejemplos de antígenos de cáncer para dirigirse a constructos de proteínas de fusión de la presente invención incluyen (los cánceres ejemplares se muestran entre paréntesis): CD5 (leucemia/linfoma de células T), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas) (Carcinomas), MAGE-2

(carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), CA 242 (colorrectal), fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), fosfatasa ácida prostática (próstata) (Carcinomas), receptor de transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1 (cáncer de mama), MART1 (melanoma), CD20 (linfoma no Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), gonadotropina coriónica humana (carcinoma) CD38 (linfoma de células B), CD45 (leucemia mieloblástica aguda), CDLA (linfoma de células B), CD25 (linfoma de células B), CD37 (linfoma de células B), linfoma de células B , Leucemia de células B o linfoma, linfoma de Hodgkin), varias mucinas (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma), Ep-CAM (Tumores Epiteliales), Folato-receptor alfa (Ovárico), A33 (Colorrectal), G250 (renal), Ferritina (linfoma de Hodgkin), EGFR de2-7 (glioblastoma, mama y pulmón), proteína de activación de fibroblastos Tenascina metaloproteinasas (glioblastoma). Algunos anticuerpos específicos útiles incluyen, pero no se limitan a, BR64 (Trail et al., 1997, Cancer Research 57: 100105), mAb BR96 (Trail et al., 1993, Science 261: 212-215), mAbs contra el antígeno CD40, tal como el mAb S2C6 (Francisco et al., 2000, Cancer Res. 60: 3225-3231) u otros anticuerpos anti-CD40, tales como los descritos en las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos Nos. 2003-0211100 y 2002-0142358; MAbs contra el antígeno CD30, tal como AC10 (Bowen et al., 1993, J. Immunol., 151: 5896-5906, Wahl et

al., 2002 Cancer Res. 62 (13): 3736-42) o MDX-0060 Publicación de Patente US nº 2004-0006215) y mAbs contra el antígeno CD70, tal como mAb 1F6 y mAb 2F2 (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente US Nº 2006-0083736) o anticuerpos 2H5, 10B4, 8B5, 18E7, 69A7 8,124,738). Otros anticuerpos se han revisado en otra parte (Franke et al., 2000, Cancer Biother, Radiopharm, 15: 459, 76, Murray, 2000, Semin. Oncol., 27:64, 70, Breitling, F. y Dubel, S., Recombinant Antibodies, John Wiley, y Sons, New York, 1998).

[102] En ciertas realizaciones, los anticuerpos útiles pueden unirse a un receptor o un complejo de receptores expresados en una célula diana. El complejo receptor o receptor puede comprender un miembro de superfamilia de un gen de inmunoglobulina, una proteína de histocompatibilidad principal, un receptor de citocina, un miembro de superfamilia de receptor de TNF, un receptor de quimiocina, una integrina, una lectina, una proteína de control de complemento, un receptor de factor de crecimiento, un receptor de hormona o un receptor de neurotransmisor. Ejemplos no limitativos de miembros de superfamilia de inmunoglobulina apropiados son CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1, B7-H4, B7-H3 e ICOS. Ejemplos no limitativos de miembros de superfamilia de receptores de TNF adecuados son TACI, BCMA, CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/0X40, CD137/4-1BB, TNFR1, TNFR2,

RANK, osteoprotegerina, AP03, Apo2/TRAIL R1, TRAIL R2, TRAIL R3 y TRAIL R4. Ejemplos no limitativos de integrinas adecuadas son CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 y CD104. Ejemplos no limitantes de
5 lectinas adecuadas son tipo S, tipo C y lectina de tipo I. Ejemplos de anticuerpos contra CEA se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Anticuerpos CEA			
Clones Ab	Patente	Asignado a	Comentario
COL-1	US 6,417,337	The Dow Chemical Company	Humanizado
806.077	US 6,903,203	AstraZeneca UK Ltd.	Humanizado
T84.66	US 7,776,330	City of Hope	Humanizado

[0103] Los anticuerpos que se unen al antígeno CD22 expresado en células B humanas incluyen, por ejemplo, HD6, RFB4, UV22-2, To15, 4KB128 y un anticuerpo anti-CD22 humanizado (hLL2) (véase, por ejemplo, Li et al. 1989) Cell Immunol, 111: 85 - 99, Mason y otros (1987) Blood 69: 836 - 40, Behr y otros (1999) Clin. Cancer Res. 5: 3304s - 3314, Bonardi et al. (1993) Cancer Res. 53: 3015 - 3021).

10 [0104] Los anticuerpos para CD33 incluyen, por ejemplo, HuM195 (véase, por ejemplo, Kossman y otros (1999) Clin. Cancer Res. 5: 2748-2755; US5693761) y CMA-676 (véase, por ejemplo, Sievers et al., (1999) Blood 93: 3678 - 3684).

[0105] Los anticuerpos anti-MUC-1 ilustrativos incluyen, 15 pero no se limitan a Mc5 (véase, por ejemplo, Peterson et al

(1997) Cancer Res. 57: 1103-1108, Ozzello et al. (1993) Breast Cancer Res. 25: 265-276) y hCTM01 (véase, por ejemplo, Van Hof et al. (1996) Cancer Res. 56: 5179 - 5185).

[0106] Los anticuerpos anti-TAG-72 ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, CC49 (véase, por ejemplo, Pavlinkova y otros (1999) Clin. Cancer Res. 5: 2613-2619), B72.3 Divgi et al (1994) Nucl. Med. Biol. 21: 9 - 15), y los descritos en la Patente de EE.UU. 5.976.531.

[0107] Los anticuerpos anti-HM1.24 ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-HM1.24 monoclonal de ratón y un anticuerpo IgG1kappa anti-HM1.24 humanizado (véase, por ejemplo, Ono et al (1999) Mol. Immuno 36: 387 - 395).

[0108] En ciertas realizaciones, el resto de diana comprende un anticuerpo anti-Her2. El gen erBB 2, más comúnmente conocido como (Her-2/neu), es un oncogén que codifica un receptor transmembrana. Varios anticuerpos se han desarrollado contra Her-2/neu, y algunos de ellos están en uso clínico. Estos incluyen trastuzumab (por ejemplo, HERCEPTIN®, Fornir et al (1999) Oncology (Huntingt) 13: 647-58), TAB-250 (Rosenblum et al., Clin. Cancer Res. 5: 865-874) BACH-250 (Id.), TA1 (Maier et al., Cancer Res. 51: 5361-5369), y los mAb descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.772.997; 5.770.195 (mAb 4D5; ATCC CRL 10463); y Patente N°. 5.677.171.

[0109] Otros anticuerpos anti-Her2/neu completamente humanos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos C6 tales como C6.5, DPL5, G98A, C6MH3-B1, B1D2, 5 C6VLB, C6VLD, C6VLE, C6VLF, C6MH3-D7, C6MH3-D6, C6MH3-D5, C6MH3- C6MH3 - B4, C6MH3 - C4, C6MH3 - C3, C6MH3 - B9, C6MH3 - B5, C6MH3 - B48, C6MH3 - B47, C6MH3 - B46, C6MH3 - B43, C6MH3 - B41, C6MH3 - B39, C6MH3 - B16, C6MH3 - B16, C6MH3 - B16, C6MH3 - B16, C6MH3 - B15, C6MH3 - B11, C6MH3 - B1, C6MH3 - 10 B16, C6MH3 - B33, C6MH3 - B31, C6MH3 - B27, C6MH3 - B25, C6MH3 - B21, C6MH3 - B20, A3, C6MH3-A2 y C6ML3-9. Estos y otros anticuerpos anti-HER2/neu se describen en las Patentes de EE.UU. números 6.512.097 y 5.977.322, en la publicación PCT WO 97/00271, en Schier et al. (1996) J Mol Biol 255: 28 - 43, 15 Schier et al. (1996) J Mol Biol 263: 551 - 567, y similares.

[0110] Más generalmente, los anticuerpos dirigidos a diversos miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico son bien adecuados para su uso como anticuerpos de orientación o porciones de unión a antígeno de 20 los mismos en las construcciones de la presente invención. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-EGFR como se describe en las Patentes de EE.UU. N° 5.844.093 y N° 5.558.864, y en la Patente Europea N° 706.799A. Otros anticuerpos ilustrativos de la familia anti-EGFR

incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos tales como C6.5, C6ML3-9, C6MH3-B1, C6-B1D2, F5, HER3.A5, HER3.F4, HER3.H1, HER3.H3 , HER3.E12, HER3.B12, EGFR.E12, EGFR.C10, EGFR.B11, EGFR.E8, HER4.B4, HER4.G4, HER4.F4, HER4.A8, HER4.B6, HER4.D4, 5 HER4 (Véase, por ejemplo, las publicaciones de las patentes de EE.UU. US 2006/0099205 A1 y US 2004/0071696 A1, que se describen a continuación, Incorporado aquí como referencia).

[0111] El CD38 es de particular interés como un objetivo de anticuerpo para constructos de proteínas de fusión de la 10 presente invención. Los anticuerpos para CD38 incluyen, por ejemplo, AT13/5 (véase, por ejemplo, Ellis y otros (1995) J. Immunol. 155: 925-937), HB7 y similares.

[0112] La presente invención también proporciona composiciones que comprenden los polipéptidos de fusión de la 15 presente invención. Estas composiciones pueden comprender además al menos uno de cualquier auxiliar adecuado, tal como, pero no limitado a, diluyente, aglutinante, estabilizador, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante o similares. Se prefieren los auxiliares farmacéuticamente 20 aceptables. Ejemplos no limitantes y métodos de preparación de tales soluciones estériles son bien conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edición, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Pueden seleccionarse de forma rutinaria

portadores farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para el modo de administración, solubilidad y/o estabilidad de la composición de anticuerpo como es bien conocido en la técnica o como se describe en la presente.

5 [0113] Los excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la presente composición incluyen pero no se limitan a proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, di-, tri-, tetra- y oligosacáridos, derivados azúcares tales como alditoles, 10 ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares, y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes solos o en combinación, comprendiendo solos o en combinación 1-99,99% en peso o volumen. Ejemplos de excipientes de proteínas incluyen albúmina sérica, tal como albúmina de 15 suero humano (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Los aminoácidos representativos que también pueden funcionar en una capacidad tampón incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, 20 isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares. Un aminoácido preferido es la histidina. Un segundo aminoácido preferido es arginina.

[0114] Los excipientes de carbohidratos adecuados para uso en la invención incluyen, por ejemplo, monosacáridos, tales

como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; Disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; Polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), mioinositol y similares. Los excipientes de carbohidratos preferidos para uso en la presente invención son manitol, trehalosa y rafinosa.

[0115] Las composiciones de anticuerpos también pueden incluir un tampón o un agente de ajuste del pH; Típicamente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánicos. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos, tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina, tampones de fosfato o tampones de aminoácidos. Los tampones preferidos para uso en las presentes composiciones son sales de ácidos orgánicos, tales como citrato o aminoácidos.

[0116] Adicionalmente, las composiciones de la invención pueden incluir excipientes/aditivos poliméricos, tales como polivinilpirrolidonas, ficales (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes

aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como TWEEN® 20 y TWEEN® 80), lípidos (por ejemplo fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides
5 (por ejemplo, colesterol) y quelantes (Por ejemplo, EDTA).

[0117] Estos y otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos conocidos adecuados para uso en las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la invención son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se enumeran en "Remington: The
10 Science & Practice of Pharmacy", 19^a ed., Williams y Williams, (1995), y en la "Physician's Desk Reference", 52^a edición, Medical Economics, Montvale, NJ (1998), cuyas descripciones se incorporan completamente aquí como referencia. Los materiales portadores o excipientes preferidos son carbohidratos (por
15 ejemplo, sacáridos y alditoles) y tampones (por ejemplo, citrato) o agentes poliméricos.

[0118] Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en este documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas
20 específicamente. Debe entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones que caen dentro del espíritu y alcance. La invención también incluye todos los pasos, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta memoria descriptiva, individual o

colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de cualquiera de dos o más de dichas etapas o características.

[0119] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria
5 tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica al que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos aquí para practicar o probar la presente invención, los materiales y métodos preferidos se
10 describen ahora.

EJEMPLOS

Métodos generales

Producción de constructos de anticuerpos de fusión en células

15 *HEK-293E*

[120] Las secuencias de ADN de una serie de dominios en los polipéptidos de fusión de la presente se proporcionan en la lista de secuencias adjunta incorporada en la presente. Se prepararon plásmidos de ADN que codificaban construcciones de
20 proteínas (construcciones de fusión de IFN α 2b atenuadas con anticuerpo) utilizando HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA) y transfectadas a continuación en células HEK293E (CNRC, Montreal, Canadá) cultivadas en medio sintético F17 suplementado con 0,45% Glucosa (w/v) D-(+)- (Sigma, Castle

Hill, NSW), 25 µg/ml de Geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1 x GlutaMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un reactivo de transfección comercialmente disponible y medio OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de permitir la expresión
5 durante 6 días en una incubadora con 5% de CO₂ y agitación de 120 rpm, se aisló el medio de cultivo y se sometió a purificación por afinidad utilizando perlas Protease A Mab Select SuRe™ agarose (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Las construcciones de proteínas purificadas se intercambiaron en
10 tampón en arginina HCl 0,2 M, ácido cítrico 25 mM, hidróxido sódico 71,5 mM a pH 6,0 utilizando una columna PD Midi-Trap G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) o una columna HiPrep 26/10 Desalting (HiTrap Desalting HiPrep 26/10 Desalinización). Las construcciones de proteínas purificadas se concentraron a
15 continuación utilizando dispositivos de filtro centrifugado Amicon Ultra de 50 kDa (Millipore, Billerica, MA), seguido por la determinación de la concentración de proteínas mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm.

Producción de constructos de anticuerpos de fusión en células
20 *EXPI293.*

[0121] Se prepararon plásmidos de ADN que codificaban construcciones de proteínas (construcciones relacionadas con anticuerpo-IFN α 2b) usando HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA) y luego transfectadas en células EXPI293 (Life

Technologies, Carlsbad, CA), crecidas en medio Expression EXPI Life Technologies, Carlsbad, CA) utilizando el reactivo de transfección proporcionado en el kit de transfección EXPI293 y el medio OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de
5 permitir la expresión durante 3 días en una incubadora suministrada con 5% de CO₂ y 125 rpm de agitación, el medio de cultivo se aisló y se sometió a purificación por afinidad usando perlas Protease A Mab Select SuRe™ agarose (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Las construcciones de proteínas
10 purificadas se intercambiaron en tampón en HCl de arginina 0,2 M, a pH 6,0 usando una columna de PD Midi-Trap G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) o una columna de desalinización HiPrep 26/10 (HiTrap Desalting HiPrep 26/10 Desalting). Las construcciones de proteínas purificadas se concentraron a
15 continuación utilizando dispositivos de filtro centrifugado Amicon Ultra de 50 kDa (Millipore, Billerica, MA), seguido por la determinación de la concentración de proteínas mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm.

Producción de constructos de anticuerpos de fusión en células
20 *CHO.*

[0122] Se prepararon plásmidos de ADN que codificaban construcciones de proteínas (construcciones relacionadas con anticuerpo-IFN α 2b) usando HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA) y luego transfectadas en células CHO (Lonza)

cultivadas en Freestyle™ CHO Expression Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un reactivo de transfección comercialmente disponible y medio OptiPro SFM™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de permitir la expresión durante 6 días
5 en una incubadora suministrada con agitación al 10% de CO₂ y 120 rpm, se aisló el medio de cultivo y se sometió a purificación por afinidad usando perlas de agarosa Protein A Mab Select SuRe™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Las construcciones de proteínas purificadas se intercambiaron en
10 tampón en arginina, HCl 0,2 M, ácido cítrico 25 mM, hidróxido de sodio 71,5 mM a pH 6,0 utilizando una columna G-25 de PD Midi-Trap (GE Healthcare, Piscataway, NJ) o una solución HiPrep 26/10 Desalting (HiTrap Desalting HiPrep 26/10 Desalinización). Las construcciones de proteínas purificadas
15 se concentraron a continuación utilizando dispositivos de filtro centrifugado Amicon Ultra de 50 kDa (Millipore, Billerica, MA), seguido por la determinación de la concentración de proteínas mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm.

20 *Método para medir la actividad dirigida al antígeno de las construcciones de proteína de fusión de anticuerpo-IFN α 2b*

[0123] Este ensayo se usó para cuantificar la actividad antiproliferativa de los constructos de proteínas de fusión IFN α 2b y del anticuerpo-IFN α 2b en células que exhiben tanto el

receptor de IFN como el antígeno dirigido por el anticuerpo al cual el IFN α 2b Está fundido. Las células Daudi expresan CD20 y CD38 como antígenos asociados a la superficie celular, así como receptores IFN de la superficie celular. La viabilidad de las células Daudi se midió usando el reactivo CellTiter-Glo®, Cat # G7570, de Promega (Madison, Wisconsin). Este es un ensayo basado en la luminiscencia que determina la viabilidad de las células en cultivo basado en la cuantificación de ATP. La intensidad de la señal es proporcional al número de células viables en un pocillo de placa de microtitulación. Los detalles del ensayo son los siguientes:

[0124] Se cultivaron células Daudi (obtenidas de ATCC, Manassas, VA) en un matraz T75 (TPP, Trasadingen, Suiza, cat # 90076) a una densidad preferida entre $0,5 \times 10^5$ y $0,8 \times 10^5$ células viables/ml en RPMI 1640 (Mediatech, Inc., Manassas, VA, cat # 10-040 - CV) con suero bovino fetal al 10% (FBS, Hyclone, Logan, UT cat # SH30070.03). Las células se cosecharon centrifugando a 400 g durante cinco minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento celular en RPMI 1640 + 10% de FBS. Después se contaron las células y se ajustó la densidad a $3,0 \times 10^5$ células/ml en RPMI 1640 + 10% de FBS. A continuación, se colocaron alícuotas de 50 μ l de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos (en lo sucesivo, "placa

experimental") (TPP, cat # 92067). En una placa separada y estéril de 96 pocillos (de aquí en adelante, "placa de dilución", Costar, Corning, NY cat # 3879), los artículos de ensayo se diluyeron en serie por duplicado en RPMI 1640 + 10% de FBS. A continuación, se transfirieron 50 µl/pocillo de la placa de dilución a la placa experimental. La placa experimental se incubó luego durante cuatro días a 37 ° C con 5% de CO₂.

[0125] Se añadió a la placa experimental a 100 µl/pocillo una mezcla del tampón de ensayo suministrado por el fabricante y el sustrato del ensayo (en lo sucesivo, "reactivo CellTiterGlo", mezclado de acuerdo con las instrucciones del fabricante). La placa se agitó durante dos minutos. Después, se transfirieron 100 µl/pocillo de la placa experimental a una placa opaca blanca de fondo plano de 96 pocillos (en lo sucesivo, "placa de ensayo", BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ cat # 35 3296). El contenido de la placa de ensayo se dejó entonces estabilizar en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa se leyó en un contador Victor 3V Multilabel (Perkin Elmer, Waltham, MA, modelo # 1420-041) en el canal de luminometría y se midió la luminiscencia. Los resultados se presentan como "unidades de luminiscencia relativa (RLU)".

[0126] Los datos se analizaron usando Prism 5 (Graphpad, San Diego, CA) utilizando regresión no lineal y ajuste de curva de tres parámetros para determinar el punto medio de la curva (EC50). Para cada artículo de ensayo, se calculó la potencia
5 relativa a IFN α 2b libre (o alguna otra forma de IFN con una potencia conocida relativa a IFN α 2b) como una relación de EC50s.

[0127] Un experto en la técnica apreciará que hay muchos otros ensayos comúnmente usados para medir la viabilidad
10 celular que también podrían usarse.

[0128] “Ensayo específico (ARP)” (también a veces referido aquí como un “ensayo dirigido”): La línea de células de mieloma múltiple ARP-1 fue un regalo de Bart Barlogie MD, PhD, Director del Instituto de Mieloma en el Instituto de Mieloma Centro
15 Médico de la Universidad de Arkansas (Little Rock, AK). Se describe en Hardin J. et al. (Interleukin-6 previene la muerte celular de mieloma inducida por dexametasona, Blood, 84: 3063, 1994). Se usaron células ARP-1 (CD38 +) para ensayar construcciones de proteína de fusión de anticuerpo-IFN
20 dirigido a CD38. El cultivo y las condiciones de ensayo fueron las mismas que para el ensayo basado en Daudi descrito anteriormente, con las siguientes excepciones: Se cultivó ARP-1 hasta una densidad de $4,0 \times 10^5$ a $6,0 \times 10^5$ células/ml. La

concentración de ARP-1 se ajustó a $1,0 \times 10^4$ células/ml antes del ensayo.

EJEMPLO 1

PUNTOS ISOELÉCTRICOS DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE IFN α 2b ATENUADAS

5 DE ANTICUERPOS ANTI-CD38

[0129] Varias células transfectadas transitoriamente que expresan una construcción de fusión IFN α 2b atenuada con anticuerpo anti-CD38 (Tabla 2) se recogieron y purificaron usando una columna de Proteína A Sure Select de Mab. Las
10 muestras se desalaron en arginina 200 mM, Histidina 25 mM pH 6,5 usando una columna HiLoad Superdex 200.

Tabla 2: Tabla de constructos

Constructos de Anticuerpos	SEQ ID No.			
	Cadena Pesada	Cadena Ligera	IFN	VH + IFN
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	48	81	25	87, 31

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, ΔT106)	48	81	110	61
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T)	50	81	107	
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106A)	50	81	25	68
A10.21 IgG1 IFN (A145D, ΔT106)	50	81		83
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	55	81	107	
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	55	81	25	74
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106A)	48	81	24	63
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69

A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106T)	53	81	107	
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106A)	53	81	25	72
A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106T)		81	107	
A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106A)		81	25	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	58	84	107	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	58	84	25	77
Anti-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	59	85	107	
Anti-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	59	85	25	
Anti-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	60	86	107	
Anti-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	60	86	25	

[0130] Se usaron geles de enfoque isoelectrico para determinar el punto isoelectrico (pI) del polipéptido de fusión y para detectar cambios menores en la proteína debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación y glicosilación.

[0131] Se preparó gel de IEF pre-moldeado en depósitos de gel que asegura un sellado hermético entre gel y tampón. A continuación, se vertieron 200 ml de tampón Cátodo 1x en la cámara interior asegurando que ningún tampón entrara en la
5 cámara exterior. Después se vierte 500 ml de tampón Ánodo 1x en la cámara exterior y se llena $\frac{3}{4}$ del tanque. Después de cargar las muestras y la escalera sobre el gel, se hizo funcionar durante 1 hora a 100 voltios, 1 hora a 200 voltios y $\frac{1}{2}$ hora a 500 voltios. Tan pronto como se terminó el
10 tratamiento con gel, el gel se retiró y se fijó en solución de TCA en un recipiente de vidrio durante 30 minutos. El gel se lavó inmediatamente con agua desionizada 3 veces. El gel se tiñó en SimplyBlue SafeStain (Invitrogen Life Technologies) durante una hora completa, y se dejó durante la noche en agua
15 para desteñirlo. La imagen final es escaneada con un escáner.

[0132] El sitio de glicosilación O-ligado de la porción IFN α 2b de las construcciones de fusión de interferón atenuado con anticuerpo se eliminó sustituyendo la treonina 106 (T106) del interferón por alanina (mostrada como T106A), serina
20 (T106S), valina (T106V), glicina (T106G) o ácido glutámico (T106E) o eliminando T106 (mostrado como Δ T106). El efecto de estos cambios en pI y la heterogeneidad de las construcciones de fusión se investigó comparando constructos con y sin glicosilación O-ligado por separación en geles de IEF.

[0133] En cada caso, suprimir T106 o sustituir T106 por alanina, serina, valina, glicina o ácido glutámico disminuyó el número de especies cargadas observadas en un gel IEF, como se evidencia por un número reducido de bandas cuando se compara
5 directamente con T106 no modificado, Y por lo tanto la heterogeneidad de la construcción de fusión se redujo (Figura 9). El número reducido de especies cargadas en el gel IEF y por lo tanto la heterogeneidad reducida de la molécula que incorpora T106S es consistente con la eliminación de la
10 glicosilación O-ligado en el resto 106 de IFN α 2b.

[0134] La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción atenuada de IFN de las construcciones de fusión de anticuerpo dio como resultado un aumento de pI en relación con las proteínas glicosiladas O-ligada. Utilizando el mismo
15 extremo frontal de anticuerpo de A10.21, esta tendencia era consistente independientemente de si el isotipo del anticuerpo era IgG4, IgG1, IgG1 AA (IgG1 L235A, G237A, una función efectora reducida de IgG1), IgG2 o IgG2 SS (IgG2 (A330S, P331S)) en las construcciones (Figura 10).

20 [0135] Se ha demostrado que las sustituciones de YTE (M252Y, S254T, T256E) confieren una mayor afinidad a FcRn, presumiblemente aumentando la semivida de anticuerpos. Otros experimentos examinaron si las sustituciones en otras partes de las construcciones fusionadas de anticuerpo IFN afectarán

a la heterogeneidad reducida que resultó de una delección o sustitución de T106. Se evaluó la heterogeneidad de la construcción de fusión IFN α 2b atenuada A10.21 anti-CD38 glicosilada (YTE, T106T) y la construcción de fusión de IFN no glicosilada con las sustituciones YTE (T106A) en geles de IEF. La eliminación de la glicosilación del componente IFN α 2b de las construcciones de fusión que llevan las mutaciones de YTE disminuyó la heterogeneidad (Figura 11).

[0136] La atenuación de IFN α 2b se consigue mediante sustituciones de residuos de aminoácidos clave que son responsables de la unión a receptores de IFN. Se evaluó el número de construcciones cargadas de construcciones de IFN A10.21 IgG4 (S228P) con diversas sustituciones de aminoácidos atenuantes en el IFN α 2b, junto con (T106T) o sin glicosilación O-ligado (T106A) del componente IFN α 2b. Los restos de aminoácidos individuales Arginina-33, Arginina-144 y Alanina-145 de IFN α 2b se sustituyeron uno a la vez con Alanina para el residuo 33 (R33A), Isoleucina para el residuo 144 (R144I) o Lisina, Glicina o Glutamina para el residuo 145 (A145K , A145G, A145Q). Cuando se compararon directamente, las construcciones de fusión de IFN aglicosiladas eran consistentemente menos heterogéneas que sus contrapartes glicosiladas (Figura 12).

[0137] La reducción en la heterogeneidad mostrada fue independiente de la porción de anticuerpo de la construcción.

La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción de IFN α 2b atenuada de las construcciones de fusión de IFN atenuadas con anticuerpo (IgG4 (S228P)) con especificidad frente a HLA, CD138 y CD38 (un epítipo diferente en CD38 al anticuerpo A10.21 - anticuerpo A02. 12) también dio lugar a una disminución de la heterogeneidad (Figura 13], según lo detectado por IEF.

EJEMPLO 2

ACTIVIDAD ANTI-PROLIFERATIVA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE ANTICUERPO DE INTERFERON α 2b ATENUADO

[0138] Los efectos antiproliferativos de IFN α 2b consisten en actividades directas e indirectas. La actividad directa ocurre a través de la inhibición del crecimiento de células cancerosas mediante la detención del ciclo celular (Matsui et al., 2003), la apoptosis por las vías dependientes del receptor de muerte (Crowder et al., 2005) y dependientes (Otsuki et al. Al., 2003). La citotoxicidad directa específica para el objetivo de proteínas de fusión de interferón atenuado anticuerpo se midió frente a líneas de células diana positivas usando un ensayo de viabilidad celular luminiscente.

Muestras de Secuencia de Plomo Anti CD38-IFN

Las construcciones (Tabla 3) se clonaron establemente o se transfectaron transitoriamente y se cosecharon y purificaron usando una columna de Proteína A Sure Select de Mab. Las

muestras se desalaron en arginina 200 mM, Histidina 25 mM pH 6,5 usando una columna HiLoad Superdex 200.

Tabla 3: Tabla de Constructos

Constructos de Anticuerpos	Seq Id No.			
	Cadena Pesada	Cadena Ligera	IFN	VH + IFN
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	48	81	25	87, 31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, Δ T106)	48	81	110	61
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	

A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106A)	48	81	24	63
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T)	50	81	107	
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106A)	50	81	25	68
A10.21 IgG1 IFN (A145D, Δ T106)	50	81	110	83
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69

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

A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	55	81	25	74
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	75	82	107	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106R)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106N)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106D)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106C)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Q)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106H)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106I)	75	82	25	

R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106L)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106K)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106M)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106F)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106P)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106W)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Y)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	75	82	25	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	58	84	107	
A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	58	84	25	77
OPG-Fc (IgG2) IFN (A145D, T106T)	57		107	

OPG-Fc (IgG2) IFN (A145D, T106A)	57		25	78
Anti-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	59	85	107	
Anti-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	59	85	25	
Anti-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	60	86	107	
Anti-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	60	86	25	

IFN α 2b comercial

[0140] Se usó INTRON® A, un IFN α 2b producido comercialmente en bacterias de Schering-Plough, como control positivo.

5 Medición de la actividad anti-proliferativa

[0141] La actividad antiproliferativa se midió usando los métodos descritos anteriormente "Ensayo de proliferación celular Daudi" y "Ensayo de proliferación celular ARP-1". El método de ensayo de proliferación de células ARP-1 se usó con
10 una línea celular adicional NCI-H929 para la medición de la actividad antiproliferativa de la proteína de fusión IFN α 2b atenuada con anticuerpo. En algunos experimentos las placas se leyeron en un Luminómetro de 96 microplacas GloMax® 96 dedicado y se usaron reactivos CellTiter-Glo® 2.0 en lugar del

CellTiter-Glo original, ninguno de los cuales impactó en los resultados. El ensayo de proliferación de células ARP-1/NCI-H929 o Daudi se usó para cuantificar la actividad anti-proliferativa de IFNs y construcciones de proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas por anticuerpos en células que muestran CD38. Las células Daudi, ARP1 y NCI-H929 expresan CD38 como antígeno asociado a la superficie celular. Los detalles de los ensayos son los siguientes.

[0142] En la proliferación de células ARP-1/NCI-H929 se midió la viabilidad de las células usando el reactivo CellTiter-Glo® 2.0, Cat # G9242, de Promega (Madison, Wisconsin). Este es un ensayo basado en la luminiscencia que determina la viabilidad de las células en cultivo basado en la cuantificación de ATP. La intensidad de la señal es proporcional al número de células viables en un pocillo de placa de microtitulación. Se cultivaron células (NCI-H929 de ATCC, Manassas, VA y ARP-1, una cortesía de Bart Barlogie MD, PhD, Director del Instituto de Mieloma en el Centro Médico de la Universidad de Arkansas, Little Rock, AK) en un matraz T75 TPP, Trasadingen, Suiza, cat # 90076) hasta una densidad preferida de entre $0,5 \times 10^5$ y $0,8 \times 10^5$ células viables/ml en RPMI 1640 (Mediatech, Inc., Manassas, VA, cat # 10-040- CV) con 10 % De Suero Bovino Fetal (FBS, Hyclone, Logan, UT cat # SH30070.03). Las células se cosecharon centrifugando a 400 g

durante cinco minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento celular en RPMI 1640 + 10% de FBS. Después se contaron las células y se ajustó la densidad a $3,0 \times 10^5$ células/ml en RPMI 1640 + FBS al 10%. Se sembraron 50 μ l de suspensión celular en cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos (en lo sucesivo, "placa experimental") (TPP, cat # 92067). Las células se incubaron a 4°C durante 1 hora antes de la adición de los compuestos de ensayo. En una placa separada y estéril de 96 pocillos (de aquí en adelante, "placa de dilución", Costar, Corning, NY cat # 3879), los artículos de ensayo se diluyeron en serie por duplicado en RPMI 1640 + 10% de FBS. Se transfirieron 50 μ l/pocillo de la placa de dilución a la placa experimental. La placa experimental se incubó luego durante cuatro días a 37 ° C con 5% de CO₂. Se añadió un "reactivo CellTiter-Glo® 2,0" a la placa experimental a 100 μ l/pocillo. La placa se agitó durante dos minutos. Se transfirieron 100 μ l/pocillo desde la placa experimental a una placa opaca blanca de fondo plano de 96 pocillos (en lo sucesivo, "placa de ensayo", BD Biosciences, Franklin 5 Lakes, NJ cat # 35 3296). El contenido de la placa de ensayo se dejó entonces estabilizar en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa se leyó sobre el Luminómetro de 96 microplacas GloMax®.

Los resultados se presentan como “unidades de luminiscencia relativa” (RLU).

[0143] Los datos se analizaron usando Prism 5 (Graphpad, San Diego, CA) utilizando regresión no lineal y ajuste de curva de cuatro parámetros para determinar la IC50.

[0144] El sitio de glicosilación O-ligado de constructos de fusión de interferón atenuado anticuerpo anti-CD38 se eliminó sustituyendo la treonina 106 (T106) por alanina (T106A), serina (T106S), valina (T106V), glicina (T106G) o glutámico (T106E) o delecionado T106 (mostrado como Δ T106). El efecto sobre la proliferación celular se investigó comparando el anticuerpo anti-CD38 A10.21 fusionado con IFN α 2b atenuado con y sin glicosilación O-ligado. La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción atenuada de IFN de las construcciones de fusión de anticuerpo dio como resultado una actividad antiproliferativa incrementada como se muestra por IC50 inferior (nM) con respecto a las correspondientes proteínas de fusión glicosiladas O-ligadas es decir A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T) y A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T) tanto en células ARP1 (Figura 1A) como NCI-H929 (Figura 1B). Esta tendencia era consistente independientemente de si el isotipo de anticuerpo era IgG4 e IgG1.

[0145] La sustitución de la treonina 106 (T106) por alanina (T106A), serina (T106S), valina (T106V), glicina (T106G) o

ácido glutámico (T106E) dio como resultado una actividad antiproliferativa incrementada como se muestra por IC50 inferior (nM) Con respecto a proteínas de fusión glicosiladas O-ligados. Todas las construcciones no glicosiladas mostraron mayor potencia “en el blanco” en relación con su contraparte glicosilada en células NCI-H929 (Figura 14).

[0146] El impacto sobre la actividad antiproliferativa de la eliminación del sitio de glicosilación O-ligado del componente atenuado de IFN α 2b se examinó en un intervalo de proteínas de fusión IFN α 2b atenuadas anticuerpo anti-CD38. Las variantes de la proteína de fusión IFN α 2b atenuada con anticuerpo anti-CD38 R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D) que poseen diferentes sustituciones de aminoácidos en T106 para eliminar el sitio de glicosilación unido a O en el componente IFN (T106A, T106G, T106N, T106F, T106R, T106, T106, T106, T106, T106, T106, T106 y T106, (Tabla 4) y los resultados se muestran en la Figura 2.

[0147] Mientras que el nivel de potencia variaba entre diferentes sustituciones en el sitio T106, todas las sustituciones que se predice que dan como resultado la eliminación de la glicosilación O-ligado aumentan la potencia relativa con respecto a la proteína glicosilada O-ligada correspondiente (Figura 2).

Tabla 4: Variantes de construcción de fusión de IFN atenuado con anticuerpo anti-CD38 de R10A2 con diversas sustituciones de aminoácidos en T106 para eliminación de glicosilación O-ligado.

Nombre del Constructo	Seq Id No.		
	Cadena Pesada	Cadena Ligera	IFN
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	75	82	107
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106R)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106N)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106D)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106C)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Q)	75	82	25

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

[0148] Los cambios relativos en la potencia entre dos diferentes proteínas de fusión de interferón anticuerpo anti-CD38 (A02.12 y A10.21) que se unen a epítomos diferentes en CD38, con o sin la glicosilación O-ligado (A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T), A02.12 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A), A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T) y A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A) era evaluado de una manera similar. la eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción IFN atenuada del anticuerpo (IgG4 (S228P)) constructos de fusión con diferentes especificidades contra CD38 resultó en un aumento de la actividad anti-proliferativa independientemente del objetivo de la porción anticuerpo del constructo (Figura 15).

[0149] La atenuación del IFN α 2b se consigue mediante diversas sustituciones atenuantes. La actividad anti-proliferativa de A10.21 IgG4 (S228P) IFN construye con diversas sustituciones atenuantes en el IFN α 2b con (T106T) y sin la glicosilación O-ligada (T106A) (Tabla 5) también fue evaluado. La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en el componente de IFN α 2b de constructos con diversas sustituciones atenuantes tenía una potencia mayor que su contraparte glicosilada (Figura 16).

Tabla 5: El constructo IFN A10.21 IgG4 (S228P) con diversas sustituciones atenuantes en el IFN α 2b con (T106T) y sin (T106A) glicosilación O-ligado.

Nombre de Constructo	Seq Id No.			
	Caden a Pesad a	Caden a Liger a	IFN	VH + IFN
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106A)	48	81	24	63
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106A)	48	81	24	67

[0150] Para investigar si otros anticuerpos/proteínas fusionados con IFN α 2b atenuado que tienen objetivos de unión diferentes tienen actividad antiproliferativa modulada como resultado de la eliminación de la glicosilación O-ligado, se crearon 2 construcciones (un anticuerpo anti-CD138 y un anticuerpo anti-HLA y se fusionaron con IFN (A145D) con o sin

glicosilación O-ligado (Tabla 6) y se ensayaron para determinar la actividad antiproliferativa.

[0151] La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la parte de IFN atenuada de los constructos de fusión de anticuerpo (IgG4 (S228P)) con especificidad frente a HLA y CD138 dio como resultado un aumento en la actividad antiproliferativa independientemente de la diana de la porción de anticuerpo del constructo. Esto se demostró en constructos de fusión de anticuerpos contra HLA y CD138 (Figura 17).

10

Tabla 6: Construcciones de diversas proteínas de fusión de IFN anticuerpo anti-CD138 y anticuerpo anti-HLA fusionado al IFN (A145D) con o sin glicosilación O-ligado.

Constructos de Anticuerpos	Seq Id No.			
	Cadena Pesada	Cadena Liger a	IFN	VH + IFN
Anti-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	59	85	107	59
Anti-CD138 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	59	85	25	59
Anti-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	60	86	107	

Anti-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	60	86	25	
---	----	----	----	--

Efecto sobre la actividad antiproliferativa de la eliminación de la glicosilación O-ligada de proteínas de fusión que comprende sustituciones en las regiones Fc para la extensión
5 *de la semivida o la función efectora reducida*

[0152] Se ha demostrado que las sustituciones de YTE confieren una mayor afinidad a FcRn, presumiblemente aumentando la semivida de anticuerpos. Se analizaron los anticuerpos fusionados con IFN que contenían las sustituciones
10 de YTE con respecto a la actividad antiproliferativa en presencia y ausencia de glicosilación O-ligado. Se hicieron las siguientes variantes de la proteína de fusión IFN atenuada anticuerpo anti-CD38 A10.21 (Tabla 7).

[0153] La introducción de la sustitución de YTE a A10.21
15 IgG4 (S228P) (A145D, T106A) no afectó al aumento de potencia causado por la eliminación de la glicosilación O-ligado del IFN atenuado (Figura 18).

[0154] Las sustituciones de L235A y G237A en la porción Fc de variantes de IgG1 y sustituciones de A330S y P331S en la
20 porción Fc de variantes de IgG2 dan como resultado una función efectora reducida. Se analizaron los anticuerpos IgG1 fusionados con IFN atenuado que contenían sustituciones L235A

y G237A y anticuerpos IgG2 fusionados con IFN atenuado que contenían sustituciones A330S y P331S en cuanto a actividad antiproliferativa en presencia y ausencia de glicosilación O-ligado. Estas variantes se hicieron de la proteína de fusión de IFN atenuado con anticuerpo anti-CD38 A10.21 (Tabla 7). La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción atenuada de IFN de las construcciones de fusión de anticuerpo dio como resultado un aumento de potencia independientemente de si el isotipo del anticuerpo en las construcciones de anticuerpo era IgG1 o IgG1 AA (IgG1 (L235A, G237A) IgG2 o IgG2 SS (IgG2 (A330S, P331S)) (Figura 19).

Tabla 7: Proteína de fusión A10.21 compuesta de sustituciones en la región Fc para la extensión de la vida media o función efectora reducida

Constructos de Anticuerpos	Seq Id No.			
	Caden a pesad a	Caden a Liger a	IFN	VH + IFN
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	

A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	52	81	25	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	111	81	25	70
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106T)	53	81	107	
A10.21 IgG2 IFN (A145D, T106A)	53	81	25	72
A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106T)	112	81	107	
A10.21 IgG2 (A330S, P331S) IFN (A145D, T106A)	112	81	25	

A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	54	81	107	
A10.21 IgG2 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	54	81	25	73

[0155] La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado de la porción de interferón atenuado de las proteínas de fusión de interferón anticuerpo anti-CD38 mediante la sustitución o
5 deleción de aminoácidos de T106 dio como resultado un aumento de la actividad antiproliferativa sobre CD38, CD138 o HLA positivo (1,3 - 12 veces).

EJEMPLO 3

10 ACTIVIDAD ESPECÍFICA/INESPECÍFICA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE ANTICUERPO IFN α 2b ATENUADO

[0156] La prueba del gen reportero iLiteTM se realizó para la determinación cuantitativa de la bioactividad del Interferón Alfa (IFN α 2b) humano (IU/ml) usando
15 bioluminiscencia generada por luciferasa. Las células utilizadas en este ensayo expresan CD38 y se usaron para medir la actividad "específica" de las proteínas de fusión de IFN α 2b atenuadas con anti-CD38. Estas células también se pueden usar para medir la actividad de "inespecíficas" cuando CD38 se
20 bloquea con un anticuerpo anti-CD38 que reconoce el mismo

epítopo. Estos ensayos se pueden usar para determinar el Índice de Selectividad (SI), que es una medida de la selectividad de las proteínas de fusión anti-CD38 IFN frente a las células diana CD38 + y no activas en las células donde se bloquea CD38 (imitando las células CD38). Cuanto mayor es el SI, más selectivos son los agentes contra el objetivo, mientras que un número cercano a 1 indica que no hay selectividad frente al objetivo o el objetivo no está presente. Se usó el Intrón A como control positivo, ya que es activo contra células que expresan receptores de interferón alfa, IFNAR1/2, pero no selectivas frente a otros antígenos expresados en la superficie celular (es decir, CD38) que tienen un SI de aproximadamente 1.

Construcciones IFN atenuadas con anticuerpos

Las secuencias para las construcciones utilizadas se exponen en el Listado de Secuencias y se enumeran en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8

Constructos de Anticuerpos	Seq Id No.			
	Caden a Pesad a	Caden a Liger a	IFN	VH + IFN

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	48	81	25	87, 31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, ΔT106)	48	81	110	61
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106A)	48	81	24	63

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106A)	48	81	24	67

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T)	50	81	107	
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106A)	50	81	25	68
A10.21 IgG1 IFN (A145D, Δ T106)	50	81	110	83
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	52	81	25	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	
A10.21 IgG1 (M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	111	81	25	70

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

R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Q)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106H)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106I)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106L)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106K)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106M)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106F)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106P)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106W)	75	82	25	

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

[0158] Se usó INTRON® A como control positivo.

Medición de actividad específica/inespecífica

[0159] La actividad específica/inespecífica se midió usando el mismo método descrito anteriormente como “prueba de gen reportero iLite”

[0160] Se realizó el ensayo del gen reportero iLite (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ, Cat # 51100) como se describe por el fabricante, con la adición de una etapa de bloqueo de IgG humana. La línea celular iLite es descrita por el fabricante como “una línea celular transfectada estable derivada de una línea celular humana promonocítica comercialmente disponible caracterizada por la expresión de antígenos de la clase II del MHC, en particular el antígeno de linfocitos humanos (HLADR), en la superficie celular”. La línea celular expresa CD38 y contiene un gen luciferasa transfectado establemente, cuya expresión es impulsada por un elemento de respuesta a interferón (IRE), que permite cuantificar la actividad de interferón basándose en la salida de luminiscencia.

[0161] La placa iLite suministrada por el fabricante (en lo sucesivo, placa de ensayo) y el diluyente se retiraron del congelador a -80°C y se dejó temperar a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl del diluyente por pocillo a la placa de ensayo. El vial de las células informadoras suministradas por el fabricante se retiró del congelador a -80°C y se descongeló en un baño de agua a 37°C. Se distribuyeron alícuotas de 25 µl

de células en cada pocillo de la placa de ensayo. A continuación, se añadieron 12,5 µl de IgG humano de 8 mg/ml diluido en RPMI 1640 + FBS al 10% (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, cat # I4506) por pocillo. El contenido se mezcló y se incubó a 37 ° C durante 15 minutos. En una “placa de dilución” separada, los artículos de ensayo se diluyeron en serie en duplicado en RPMI 1640 + 10% de FBS. A continuación, se transfirieron 12,5 µl de los artículos de ensayo desde la placa de dilución a la placa de ensayo. La placa de ensayo se incubó entonces a 37 ° C con 5% de CO₂ durante 17 horas. El tampón de ensayo y el sustrato suministrados por el fabricante se retiraron del congelador a -80°C y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante dos horas. El tampón de ensayo suministrado por el fabricante se añadió al vial del sustrato suministrado por el fabricante y se mezcló bien según las instrucciones del fabricante para crear la “solución de luminiscencia”. A continuación, se añadieron 100 µl de la solución de luminiscencia a cada pocillo de la placa de ensayo. La placa se agitó durante 2 minutos. La placa se incubó entonces a temperatura ambiente durante 5 minutos en la oscuridad y se leyó en un contador Victor 3V Multilabel en un canal de luminometría y la luminiscencia se midió y se presentó como RLU.

[0162] Para ensayar la actividad inespecífica de las construcciones de proteína de fusión de anticuerpo anti-CD38-IFN en el ensayo iLite, el diluyente suministrado por el fabricante se suplementó con un anticuerpo anti-CD38 de 0,25 mg/ml (un anticuerpo que reconoce el mismo epítipo en CD38 como la construcción de la proteína de fusión IFN-anticuerpo que se está probando, para bloquear cualquier unión de las construcciones de la proteína de fusión del anticuerpo anti-CD38-IFN a la CD38 expresada en las células iLite). Esta etapa de bloqueo fue seguida por tratamiento con la proteína de fusión de anticuerpo anti-CD38-IFN o IFN α 2b.

[0163] Los datos se analizaron usando Prism 5 (Graphpad, San Diego, CA) usando regresión no lineal y ajuste de curva de tres parámetros para determinar el punto medio de la curva (EC50). El Índice de Selectividad (SI) se calculó mediante $EC50 \text{ (actividad de DES - objetivo)} / EC50 \text{ (actividad de ON - objetivo)}$. El Índice de Selectividad (SI) es una medida de la forma selectiva de las construcciones de IFN anti-CD38 activas frente a células que expresan CD38 y no activas en células sin CD38. Cuanto mayor sea el número, más selectivo será contra el objetivo, mientras que un número cercano a 1 indica que no hay selectividad frente al objetivo. El intrón A se usó como control positivo, tiene una SI de aproximadamente 1.

[0164] El sitio de glicosilación O-ligado de construcciones de fusión de interferón atenuado con anticuerpo anti-CD38 se eliminó sustituyendo la treonina 106 (T106) con alanina (mostrada como T106A). La actividad se investigó comparando los anticuerpos A10.21 y A10.43 anti-CD38 fusionados con IFN α 2b con y sin glicosilación O-ligado.

[0165] La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción atenuada de IFN de las construcciones de fusión de anticuerpos (mostrada como T106A) dio como resultado un ligero incremento en la actividad específica (Figura 3 y Tabla 9) así como un ligero o ningún aumento en la actividad inespecífica en relación con las proteínas glicosiladas O-ligado. Tanto las proteínas glicosiladas O-ligado como las no glicosiladas mostraron alta selectividad hacia las células CD38 +, mientras que el intrón A no mostró selectividad.

Tabla 9: EC50 and SI de proteínas de fusión IFN α 2b atenuado anticuerpo anti-CD38 A10.21 y A10.43 con y sin glicosilación O-ligado.

	EC50 (nM)		SI
	Específico (ON Target)	Inespecífico (OFF Target)	
Artículos de Prueba			

Intrón A	0.00017	0.00016	0.9 0
A10.21 IgG4 (S228P) IFN(A145D, T106T)	0.00240	2.33	972
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	0.00182	2.23	122 3
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	0.00560	2.31	412
A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	0.00124	2.25	182 2

[0166] El impacto sobre la actividad específica/inespecífica de la eliminación del sitio de glicosilación O-ligado desde el IFN atenuado de las proteínas de fusión también se puede examinar de una manera similar.

[0167] Los ensayos de actividad específica/inespecífica del gen reportero iLite™ se llevaron a cabo para demostrar la actividad selectiva de proteínas de fusión atenuadas de IFN anti-CD38 sobre células CD38 + diana y la actividad limitada en células cuando se bloquea CD38 con un anticuerpo anti-CD38 (reconociendo el mismo epítipo) imitando la actividad anticipada en las células diana negativas.

[0168] La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción atenuada de IFN de las construcciones de fusión

de anticuerpos (mediante sustitución de T106A) dio como resultado un ligero aumento en la actividad específica, así como ligero a ningún aumento en la relación de actividad inespecífica a proteínas glicosiladas O-ligado. Tanto las
5 proteínas de fusión de interferón atenuado con anticuerpo anti-CD38 glicosilado y no glicosilado O-ligado mostraron alta selectividad hacia las células CD38 +, mientras que el Intrón A no mostró selectividad.

[0169] Para examinar adicionalmente la
10 modulación en el índice de selectividad como resultado de la eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción atenuada de IFN de las construcciones de fusión de anticuerpos, se examinó la actividad específica-inespecífica en un intervalo de constructos. Los cambios examinados se basaron en
15 la construcción A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T). Se incluyeron la supresión de la treonina 106 (Δ T106), la sustitución de T106 por la serina (T106S), la sustitución de YTE (YTE T106T y YTE T106A), la atenuación del IFN por sustitución de la alanina 145 por la glutamina (A145Q) y la
20 variación del isotipo del anticuerpo frente a IgG1 (IgG1T106T e IgG1 T106A).

[0170] La mayoría de las construcciones demostraron un índice de selectividad > 1, la magnitud de la selectividad hacia células CD38 + dirigidas varió dependiendo de la construcción

fusionada con IFN anti-CD38 (Figura 20). La mayor selectividad se observó en A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A).

EJEMPLO 4

ACTIVIDAD DESIGUAL DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE IFN α 2b ATENUADO DE ANTICUERPO ANTI-CD38

[0171] Las células HEK-Blue™ IFN- α/β permiten la detección de IFNs de tipo I humanos bioactivos mediante el control de la activación de la vía ISGF3. La estimulación de células HEK-Blue™ IFN- α/β con IFN- α humano activa la vía JAK/STAT/ISGF3 y posteriormente induce la producción de SEAP (un gen indicador bajo el control del promotor ISG54 inducible de IFN- α/β). Los niveles de SEAP en el sobrenadante se pueden determinar fácilmente con QUANTI-Blue™. Los efectos de la eliminación de la glicosilación O-ligado de la porción de interferón atenuada de las proteínas de fusión de interferón anticuerpo se evaluaron usando este ensayo de gen reportero.

Producción de la construcción de la proteína de fusión del anticuerpo/Fc

[0172] Varias células transfectadas transitoriamente que expresan proteínas de fusión de interferón se recogieron y purificaron usando una columna Mab Select Sure Protein A. Las muestras se desalaron en arginina 200 mM, Histidina 25 mM pH 6,5 usando una columna HiLoad Superdex 200.

Tabla 10

Constructos de Anticuerpo	Seq Id No.			
	Caden a Pesad a	Caden a Liger a	IFN	VH + IFN
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	48	81	25	87, 31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, ΔT106)	48	81	110	61
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	48	81	25	31
A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	49	81	107	

A10.21 IgG4 (S228P, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106A)	49	81	25	62
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144I, T106A)	48	81	24	63
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145K, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145G, T106A)	48	81	25	64
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106T)	48	81	109	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R33A, T106A)	48	81	13	65
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145Q, T106A)	48	81	25	66

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106T)	48	81	107	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145N, T106A)	48	81	25	66
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144N, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106T)	48	81	108	
A10.21 IgG4 (S228P) IFN (R144H, T106A)	48	81	24	67
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106T)	50	81	107	
A10.21 IgG1 IFN (A145D, T106A)	50	81	25	68
A10.21 IgG1 IFN (A145D, Δ T106)	50	81	110	83
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106T)	51	81	107	
A10.21 IgG1 (L235A, G237A) IFN (A145D, T106A)	51	81	25	69
A10.21 IgG1 (L235A, G237A, M252Y, S254T, T256E) IFN (A145D, T106T)	52	81	107	

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

R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106N)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106D)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106C)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Q)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106H)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106I)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106L)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106K)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106M)	75	82	25	
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106F)	75	82	25	

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

Anti-HLA IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	60	86	25	
---	----	----	----	--

[0173] Se usó INTRON® A como control positivo.

Medición de la actividad fuera del objetivo mediante el ensayo HEK-Blue

5 [0174] La actividad inespecífica de la fusión de anticuerpo-IFN se midió usando el mismo método que se describe en “Ensayo HEK-Blue Off-target” excepto los volúmenes de células sembradas, los anticuerpos diluidos y el sobrenadante usado. Los detalles del ensayo son los siguientes.

10 [0175] Se utilizó el ensayo HEK-Blue inespecífica para cuantificar la capacidad de las construcciones de fusión de IFN-anticuerpo para unirse al receptor de interferón-alfa/ β (IFNAR) usando la línea celular HEK-Blue™ IFN-alfa/ β (InvivoGen, San Diego, CA). El ensayo “inespecífico (off-
15 target)” (HB-IFN) se realizó en gran parte según lo descrito por el fabricante de la línea celular HEK-Blue IFN-alfa/ β . Las células HEK-Blue™ IFN-alfa/ β están diseñadas específicamente para supervisar la activación de la vía JAK-STAT, que es inducida por los IFN de tipo I. Las células se generaron
20 introduciendo los genes STAT2 e IRF9 humanos en células HEK293 para obtener una vía de señalización de IFN de tipo I completamente activa. Las células HEK-Blue™ IFN-alfa/ β

expresan de forma estable un gen reportero, fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP), bajo el control del promotor ISG54. ISG54 es un ISG bien conocido activado a través de un mecanismo dependiente de ISRE por IFNs de tipo I. Tras la
5 estimulación con IFN-alfa o IFN β , las células IFN- α/β HEK-Blue[™] activan la vía JAK-STAT y luego la expresión del gen reportero SEAP. SEAP se secreta en el medio y se puede cuantificar usando el reactivo colorimétrico QUANTI-Blue[™].

[0176] En resumen, se descongelaron y cultivaron células de
10 IFN-alfa/ β de HEK-Blue (InvivoGen, gato de CA de San Diego # hkb-ifnab) y se cultivaron en medio DMEM (Mediatech, Manassas VA, cat # 10-013-CV) + 10% FBS (Hyclone, Logan UT, cat # SH30070.03) que había sido inactivado por calor (HI FBS). Cuando las células alcanzaron una confluencia del 60-80%, se
15 levantaron con Cell Stripper (Mediatech, cat # 25-056-C1). Las células se lavaron dos veces en DMEM + HI FBS y se contaron. Las células se ajustaron a $2,77 \times 10^5$ células viables/ml en DMEM + HI FBS y se sembraron a 180 μ l por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano (de aquí
20 en adelante, la “placa experimental”). A continuación, se añadieron 20 μ l de IFN-alfa2b o construcción de proteína de fusión, diluida en DMEM + HI FBS, por pocillo. La placa se incubó a 37 °C 5% de CO₂ durante 16-24 horas. QUANTI-Blue (InvivoGen, cat # rep-qb1) se preparó de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. Se sembró QUANTI-Blue (180 μ l) en cada pocillo de una placa de fondo plano (de aquí en adelante, la “placa de ensayo”). A continuación, se transfirieron 20 μ L de sobrenadante por pocillo de la placa experimental a la placa de ensayo. La placa de ensayo se incubó
5 entonces a 37°C durante 1-3 horas. La absorbancia de la placa de ensayo a 620 nm se leyó en un modelo de lector de microplacas SpectraMaxPlus 384 de Molecular Devices. Los datos se analizaron utilizando Graph Pad Prism.

10 [0177] Se evaluó el impacto que la presencia o ausencia de glicosilación O-ligado en IFN α 2b tiene sobre la actividad inespecífica de los anticuerpos anti-CD38 fusionados a IFN atenuado.

[0178] El sitio de glicosilación O-ligado de un anticuerpo
15 anti-CD38 con construcciones de fusión de interferón atenuado se eliminó sustituyendo la treonina 106 (T106) por alanina (mostrada como T106A) o eliminando T106 (mostrado como Δ T106). El efecto sobre la actividad inespecífica se investigó comparando el anticuerpo anti-CD38 X10.21 fusionado con IFN α 2b
20 atenuado con y sin glicosilación O-ligado.

[0179] La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción atenuada de IFN de las construcciones de fusión de anticuerpo dio como resultado un ligero aumento en la actividad fuera de diana en relación con proteínas glicosiladas

ligadas a 0, es decir, A10.21 IgG4 IFN (145D, T106T) y A10.21 IgG1 IFN (145D, T106T) (Figura 5). Esta tendencia fue coherente independientemente del isotipo (Figura 5). Sin embargo, el IFN α 2b (A145D) está tan atenuado que el nivel de inducción de SEAP en este ensayo está limitado incluso en las dosis más altas usadas. Por lo tanto, la EC50 es sólo una aproximación.

[0180] Se examinó la actividad fuera de diana de anticuerpos fusionados con IFN atenuado (R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D)) que poseía diferentes sustituciones de aminoácidos para la eliminación de la glicosilación O-ligado. Todas las posibles sustituciones de aminoácidos se ensayaron y la construcción se enumeran en la Tabla 11.

Tabla 11

Nombre del Constructo	Seq Id No.		
	Cadena Pesada	Cadena Ligera	IFN
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	75	82	107
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106R)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106N)	75	82	25

R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106D)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106C)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106E)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Q)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106G)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106H)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106I)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106L)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106K)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106M)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106F)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106P)	75	82	25

R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106S)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106W)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106Y)	75	82	25
R10A2 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106V)	75	82	25

[0181] Se demostró que cada una de estas sustituciones muestran una actividad inespecífica similar o ligeramente inferior (EC50 aumentada) con respecto al IFN 0-glicosilado (A145D, T106T) fusionado con anticuerpo R10A2 IgG4 (S228P). Sin embargo, el IFN α 2b (A145D) está tan atenuado que el nivel de inducción de SEAP en este ensayo está limitado incluso en las dosis más altas usadas. Por lo tanto, la EC50 es sólo una aproximación.

[0182] La actividad inespecífica de otro anticuerpo anti-CD38 atenuó la construcción de IFN α 2b y se investigó el impacto de la eliminación de la glicosilación 0-ligado por la sustitución de T106A. A10.43 tiene 7 cambios de aminoácidos en la cadena pesada en comparación con A10.21 mientras que las dos construcciones comparten la misma secuencia de cadena ligera (véase el Listado de Secuencias). Los resultados

demonstraron que la eliminación del sitio de glicosilación O-ligado por la sustitución de T106A aumentó ligeramente la actividad inespecífica de A10.43. Sin embargo, el IFN α 2b (A145D) está tan atenuado que el nivel de inducción de SEAP en este ensayo está limitado incluso en las dosis más altas usadas. Por lo tanto, la EC50 es sólo una aproximación.

[0183] La eliminación del sitio de glicosilación O-ligado en la porción atenuada de IFN de las construcciones de fusión de interferón-anticuerpo dio como resultado un ligero o ningún aumento en la actividad inespecífica, así como un ligero aumento en la actividad específica en relación con las proteínas glicosiladas O-ligado. Tanto las proteínas de fusión de interferón atenuado con anticuerpo anti-CD38 glicosilado y no glicosilado O-ligado mostraron alta selectividad hacia las células CD38 +, mientras que el Intrón A no mostró selectividad.

EJEMPLO 5

EVALUACIÓN DEL RECEPTOR NEONATAL FC (FCRN) HUMANO UNIDO A UN IFN ATTENUADO ANTI-CD38

[0184] El FcRn marcado con Poli-his fue inmovilizado sobre las células de flujo activo designadas de un chip de sensor CM5 en un instrumento mejorado Biacore T200 usando un protocolo de acoplamiento de amina, mientras que se realizó una inmovilización en blanco en las células de flujo de referencia.

Se inyectaron impulsos de FcRn marcado con poli-his sobre las superficies activas para asegurar que la solución se concentrara previamente en la célula de flujo. Después se lavaron las superficies con NaOH 50 mM. Tanto la referencia
5 como las superficies activas se activaron durante siete minutos con una mezcla de EDC/NHS 50:50. A esto siguió una serie de impulsos de FcRn marcado con poli-his a 2 µg/ml en Acetato de Sodio 10 mM pH 5,0 solamente sobre las superficies activas. Una vez alcanzado el objetivo de 150 RU, se desactivaron ambas
10 superficies con etanolamina 1 M pH 8,5 durante siete minutos. Este protocolo dio como resultado la inmovilización de aproximadamente 150 RU de FcRn marcado con poli-his sobre las superficies activas. Cada superficie activa se utilizó para una corrida.

15 [0185] Los anticuerpos de ensayo se desalaron en tampón de corrida PBS-P (DPBS, pH 7,4 y Tween-20 al 0,005% ajustado a pH 6,0 con HCl a 25°C) usando Columna de Desalinización Spray Zeba, 7K MWCO, 0,5 ml (Pierce Product # 89882). Después del desalado, la concentración de cada muestra se ajustó a 1 mg/ml.

20 [0186] El día del ensayo, las disoluciones de 1 mg/ml se diluyeron adicionalmente en tampón de corrida para preparar la concentración más alta, y después se diluyeron 1:2 para crear las series de concentración. Las muestras de ensayo se pasaron sobre la superficie usando un caudal de 50 µl/minuto. La fase

de asociación fue de 100 segundos mientras que la fase de disociación fue de 300 segundos para todas las concentraciones ensayadas. Las superficies activa y de referencia se regeneraron usando una inyección de 60 segundos de Tris 100 mM, NaCl 50 mM a pH 8,0 para eliminar el anticuerpo de ensayo. Las constantes de unión se determinaron a 25°C.

[0187] La interacción de unión de anticuerpo poli-his-FcRn se evaluó utilizando el modelo de reacción de dos estados en el que el $R_{\max}$ se fijó a local y el parámetro RI (índice de refracción) se fijó a local. Todos los datos fueron de doble referencia: en primer lugar, se restó la señal en la célula de referencia (inmovilización en blanco) resultante de la unión del anticuerpo a la matriz de dextrano, y en segundo lugar se restó la señal del anticuerpo 0 nM en la superficie activa.

[0188] Las constantes de unión se determinaron en al menos dos ejecuciones separadas para cada anticuerpo. El lote Prolia 1035726 se probó junto con las muestras anti-CD38/IFN como un control positivo para cada corrida. Valores medios de k_{a1} , k_{d1} , k_{a2} , k_{d2} y K_D .

[0189] Los valores cinéticos y de afinidad medios para la unión de FcRn para el IFN/anti-CD38 (A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A), A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T) A10. 43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A) A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)) fueron medidos. En este conjunto de muestras, el clon

A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A) mostró la afinidad más alta para FcRn.

EJEMPLO 6

EFICACIA DE ANTICUERPOS ANTI-CD38 FUNDIDOS AL INTERFERON ALFA 2B ATENUADO CON Y SIN GLICOSILACIÓN LIGADO-O EN EL MODELO DE MIELOMA MÚLTIPLE EN RATONES NCI-H929

Drogas y tratamiento:

Gr.	N	Régimen 1			
		Agente	µg/animal	Ruta	Programa
1 [#]	8	Vehículo	20	ip	biwk x 5
2	8	A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	20	ip	biwk x 5
3	8	A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	20	ip	biwk x 5
4	8	A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106T)	20	ip	biwk x 5
5	8	A10.43 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)	20	ip	biwk x 5
#	- Grupo Control				

Procedimientos:

- Prepare los ratones hembras CR CB.17 SCID con 1×10^7 células tumorales H929 en 50% de Matrigel sc en flanco.
 - El volumen de inyección celular es de 0,2 ml/ratón.
 - Edad en la Fecha de Inicio: 8 a 12 semanas.
- 5 • Realice una pareja cuando los tumores alcancen un tamaño promedio de 170 - 350 mm³, y comience el tratamiento.
- Volumen de dosificación = 0,2 ml/ratón. No ajuste el peso corporal.
 - Peso Corporal: qd x 5 luego biwk hasta el final
- 10 • Medición de la pinza: biwk hasta el final
- TGD de punto final. Los animales deben ser monitoreados individualmente. El punto final del experimento es un volumen tumoral de 2000 mm³ o 60 días, lo que ocurra primero. Los que respondan pueden seguir más tiempo. Cuando se alcanza el punto
- 15 final, los animales deben ser eutanizados según SOP # 687.
- [190] Los resultados se muestran en la Figura 8. Se observó una eficacia aproximadamente equivalente con y sin glicosilación O-ligado, con la forma aglicosilada ligeramente más potente para impedir el crecimiento del tumor.

20 **EJEMPLO 7**

[0191] En la evaluación de la unión del receptor Fc neonatal humano (FcRn) a anticuerpos anti-CD38 fusionados a IFN atenuado con y sin glicosilación O-ligado, las proteínas sin glicosilación O-ligado mostraron la mayor afinidad por FcRn.

El efecto de esto puede evaluarse en monos cynomolgus y en ratones FcRn humanizados.

Estudio en Monos Cynomolgus

5 *Estudio en Monos diseñado para comparar +/- O-glyc*

- Una sola infusión intravenosa de 3 mg/kg (1 hora) a través de un catéter permanente

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

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

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

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

- Comparar PK y PD (efecto biológico, es decir, niveles de neopterina sérica)

15 • PK: todos los monos, ≤ 1 ml, 11 puntos de tiempo (Pre-dosis, 0 minutos (inmediatamente después del final de la infusión) 2, 6, 12, 24, 48, 96, 120, 168 y 240 horas después de la infusión. (80) se analizan por ELISA.

- Modelado de TK: Ensamblaje de tablas WinNonlin (análisis no compartimental)

20 • Patología clínica: Hematología y química sanguínea - todos los monos, 3 veces (pretratamiento, 24 horas después de la dosis y día 8)

- Suero de neopterinina • todos los monos, ~ 0,5 ml 3 veces a 5 puntos de tiempo (Pre-dosis, 12, 24, 96, 168 horas después de la dosis)

Estudio farmacocinético en ratones FcRN humanizados

1. Se dosifican 32 ratones hembra B6.Cg-Fcgrtm1Dcr'Tg (CAG-FCGRT) 276Dcr/DcrJ (JAX stock # 004919) al día 1 mediante inyección IP de 1 mg/kg de;
 - A10.21 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106A) (n = 8)
 - A10.21 IgG4 (S228P) IFN (14+5D, T106T) (n = 8)
 - 10 - A10.43 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106A) (n = 8)
 - A10.43 IgG4 (S228P) IFN (145D, T106T) (n = 8)
2. El peso corporal se mide 3 días antes de la dosificación, el día de la dosificación y después semanalmente.
3. Las observaciones del lado de la jaula se hacen diariamente
- 15 y las observaciones clínicas se hacen semanalmente.
4. Recolección de sangre farmacocinética: Los ratones son sangrados (25 µl) a la pre-dosis 3 días y después de la dosis 1, 12, 24, 48 y 72 horas y 5, 7, 10 y 14 días. Los ratones son sangrados en 2 cohortes (4 Ratones/grupo/cohorte).
- 20 5. Todos los ratones se sacrifican el día 14. La cardiocentesis terminal se realiza para recoger la sangre.
6. La sangre se recolecta en tubos de heparina de litio y se centrifuga a 10.000 rpm durante 2 min a 4 ° C.

7. Las muestras de plasma se diluyen 1:10 en PBS y se congelan antes del análisis mediante ELISA de unión para A10.21 IgG4 IFN (145D) A106, A10.21 IgG4 IFN (145D) T106, A10.43 IgG4 IFN (145D) A106 O A10.43 IgG4 IFN (145D) T106.

5