

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038179**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.20

(21) Номер заявки
201891166

(22) Дата подачи заявки
2016.11.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) СТЛА4-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

(31) **62/257,001**

(32) **2015.11.18**

(33) **US**

(43) **2018.11.30**

(86) **PCT/US2016/062393**

(87) **WO 2017/087588 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП. (US)

(72) Изобретатель:
Пуннонен Юха, Бьюмонт Марибел (US), Бюиз Мари-Анж, Буттон Карло, Домбрехт Бруно, Виктор Бьерн (BE), Кастелейн Роберт А. (US)

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

(56) **WO-A2-2008071447**

WO-A2-2010/007376

C. VINCKE ET AL.: "General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 5, 14 November 2008 (2008-11-14), pages 3273-3284, XP055107615, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M806889200, abstract, figure 1

WO-A1-2015044386

WO-A2-2013024059

J.C. CORDY ET AL.: "Specificity of human anti-variable heavy (V H) chain autoantibodies and impact on the design and clinical testing of a V H domain antibody antagonist of tumour necrosis factor-[alpha] receptor 1", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 182, no. 2, 11 September 2015 (2015-09-11), pages 139-148, XP055342270, GB ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/cei.12680, abstract, figure 2, table B-4

WO-A2-2014043509

WO-A2-2015173325

(57) Изобретение относится к молекулам, таким как ISVD и нанотела, которые связываются с СТЛА4 или сывороточным альбумином человека. Эти молекулы были сконструированы таким образом, чтобы снижать частоту связывания естественными антителами в организме субъектов, которым вводили такую молекулу. Приведены способы повышения иммунного ответа, лечения злокачественной опухоли и/или лечения инфекционного заболевания посредством таких молекул.

B1

038179

038179

B1

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США, серийный номер 62/257001, поданной 18 ноября 2015 г.; которая включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Считываемый компьютером формат перечня нуклеотидных/аминокислотных последовательностей включен в качестве ссылки полностью. Файл, содержащий перечень последовательностей, представляет собой текстовый файл ASCII размером 100 кбайт, созданный 15 ноября 2016 г. под названием "24237WOPCTSEQ".

Область изобретения

Настоящее изобретение относится, в частности, к аминокислотным последовательностям и полипептидам, связывающимся с цитотоксическим Т-лимфоцит-ассоциированным белком 4 ("CTLA4"), например CTLA4 человека. В частности, настоящее изобретение относится, отчасти, к усовершенствованным одинарным варибельным доменам тяжелой цепи иммуноглобулина (также обозначаемым в настоящем документе как "ISV" или "ISVD"), связывающимся с CTLA4, а также к белкам, полипептидам и другим конструкциям, соединениям, молекулам или химическим структурным единицам, которые содержат такие ISVD. Другие аспекты, варианты осуществления, признаки, применения и преимущества изобретения будут понятны специалисту посредством настоящего описания.

Уровень техники

Подавление иммунорегуляторных молекул, таких как антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4), представляет собой новую и перспективную стратегию, направленную на индуцирование регресса опухоли, стабилизацию заболевания и продление выживаемости путем воздействия с иммунной системой. Антитело против CTLA4, ипилимумаб, в настоящее время продается по показаниям, включая меланому. У пациентов с меланомой, которые получали антитела против CTLA4, наблюдали характерные признаки регресса опухолей с длительным временем прогрессирования, а у пациентов с меланомой, злокачественной опухолью яичников, злокачественной опухолью предстательной железы и злокачественной опухолью почек, принимавших ипилимумаб, наблюдали продолжительный терапевтический эффект.

Для полной активации Т-клеток необходимы два сигнала. Первый инициируется связыванием Т-клеточного рецептора с опухоль-ассоциированными антигенами, представленными антиген-презентирующими клетками (АРС) с помощью главных комплексов гистосовместимости I и II. Второй сигнал генерируется в случае, когда основной костимуляторный рецептор на Т-клетке, CD28, связывается с подтипами лигандов B7, CD80 и CD86, на поверхности АРС. Полученная двойная передача сигнала индуцирует изменения, включая пролиферацию Т-клеток и высвобождение цитокинов, запуск и затем усиление иммунного ответа. В ответ на активацию Т-клеток CTLA-4 активируется и конкурирует с CD28 за связывание молекул CD80 и CD86 на АРС, но со значительно более высокой аффинностью, и, соответственно, ослабляя или прекращая активацию Т-клетки (фиг. 1). CTLA-4, таким образом, подавляет сигналы Т-клеток и функцию АРС, что приводит к снижению иммунного ответа на опухоль-ассоциированные антигены и к иммунной толерантности.

Механизмы, посредством которых CTLA4 и PD1 оказывают ингибирующее действие на активацию Т-клеток, являются комплексными. CTLA4 функционирует в основном для ограничения активации Т-клеток и размножения клона, тогда как PD1 функционирует прежде всего для ограничения эффекторной функции Т-клеток в периферических тканях. Их различные молекулярные структуры, регуляция, сигнальные пути, распределение лигандов и функция на Treg и других иммунных клетках предполагают, что комбинированное терапевтическое блокирование CTLA4 и PD1 может действовать синергически для опосредования противоопухолевого иммунитета. Intlekofer & Thompson, *J. Leuko. Biol.* 94(1):25-39 (2013); Hurwitz et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:10067-10071 (1998); Parry et al. *Mol. Cell. Biol.* 25(21):9543-9553 (2005); Callahan et al. *Front. Oncol. Vol. 4, Art. 385* (2015).

Один из способов ингибирования понижающей регуляции, опосредуемой CTLA4, заключается в нарушении его взаимодействия со своими лигандами, путем его связывания с нанотелом. Существует вероятность того, что нанотела, присутствующие у лам, могут вызвать нежелательный иммунный ответ, вызывающий нейтрализацию действия препарата, например, путем связывания нанотел естественными антителами в сыворотке пациента. Таким образом, новые методы, позволяющие гуманизировать нанотела с тем, чтобы уменьшить или устранить такой ответ, являются особенно ценными, как и нанотела, которые создаются с помощью таких методов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к одинарному варибельному домену мультиспецифичного иммуноглобулина (ISVD), такому как нанотело, которое связывается с CTLA4 человека путем контактирования CTLA4 человека на одном или нескольких из следующих остатков: VRVTVL (аминокислоты 33-38 в SEQ ID NO: 110), ADSQVTEVC (аминокислоты 41-49 в SEQ ID NO: 110) и CKVELMYPPPYLGLG (аминокислоты 93-106 в SEQ ID NO: 110), например, во всех трех областях. Например, связывающее вещество защищает остатки от водородно-дейтериевого обмена в присутствии источника дейтерия, такого как D₂O. В одном из вариантов осуществления изобретения ISVD связывается с CTLA4 человека и генерирует тепловую карту связывания (например, полученную в анализе водородно-дейтериевого обмена), по

существо, как показано на фиг. 13.

Настоящее изобретение также относится к CTLA4-связывающему веществу, содержащему один или несколько (например, два) одинарных переменных доменов иммуноглобулина (ISVD), которые связываются с CTLA4 человека, содержащему CDR1, который содержит аминокислотную последовательность FYGMG (аминокислоты 6-10 в SEQ ID NO: 2) или GGTF SFYGMG (SEQ ID NO: 2); CDR2, который содержит аминокислотную последовательность DIRTSAGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 3) или DIRTSAGRTY (аминокислоты 1-10 в SEQ ID NO: 3); CDR3, который содержит аминокислотную последовательность EXSGISGWDY (SEQ ID NO: 4); необязательно, причем ISVD содержит мутацию на остатках 11 и 89 (например, L11V и/или V89L, например (E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L), где указанные номера остатков соответствуют номерам остатков в соответствии с системой нумерации Kabat.

Настоящее изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, ISVD, например, нанотело), содержащему CDR1, CDR2 и CDR3 иммуноглобулина, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, где указанное CTLA4-связывающее вещество содержит по крайней мере одну мутацию относительно аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где указанная по меньшей мере одна мутация находится в положении, выбранном из группы, состоящей из 11, 89, 110 и 112, где указанные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat; и необязательно дополнительно включая любое количество дополнительных мутаций, которые указаны в настоящем документе или каким-либо иным образом, например до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) дополнительных мутаций (например, точечные мутации, замена, деления, вставки). Например, в одном из вариантов осуществления изобретения CDR1 содержит аминокислотную последовательность FYGMG (SEQ ID NO: 2) или GGTF SFYGMG (SEQ ID NO: 5); CDR2 содержит аминокислотную последовательность DIRTSAGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 3) или DIRTSAGRTY (SEQ ID NO: 6); и CDR3 содержит аминокислотную последовательность EMSGISGWDY (SEQ ID NO: 4). Например, в одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество имеет мутацию относительно SEQ ID NO: 1, где аминокислотный остаток в положении 11 выбран из L или V; аминокислотный остаток в положении 89 соответственно выбран из T, V или L; аминокислотный остаток в положении 110 соответственно выбран из T, K или Q и/или аминокислотный остаток в положении 112 соответственно выбран из S, K или Q; например, где мутация соответствует 89T; 89L в комбинации с 11V; 89L в комбинации с 110K или 110Q; 89L в комбинации с 112K или 112Q; 89L в комбинации с 11V и 110K или 110Q; 89L в комбинации с 11V и 112K или 112Q; 11V в комбинации с 110K или 110Q; и/или 11V в комбинации с 112K или 112Q. В одном из вариантов осуществления изобретения мутация в положениях 11, 89, 110 и/или 112 является такой, как указано в табл. В. В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество дополнительно содержит одну или несколько мутаций, относительно SEQ ID NO: 1, в положениях 1, 14, 45, 74, 83 и/или 108. В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество имеет С-концевое удлинение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения С-концевое удлинение имеет формулу $-X(n)$, где X и n являются следующими: (a) $n=1$ и $X=Ala$; (b) $n=2$ и каждый $X=Ala$; (c) $n=3$ и каждый $X=Ala$; (d) $n=2$ и по крайней мере один $X=Ala$ (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, независимо выбранным из любой природной аминокислоты); (e) $n=3$ и по крайней мере один $X=Ala$ (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, независимо выбранным из любой природной аминокислоты); (f) $n=3$ и по крайней мере два $X=Ala$ (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, независимо выбранным из любой природной аминокислоты); (g) $n=1$ и $X=Gly$; (h) $n=2$ и каждый $X=Gly$; (i) $n=3$ и каждый $X=Gly$; (j) $n=2$ и по крайней мере один $X=Gly$ (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, независимо выбранным из любой природной аминокислоты); (k) $n=3$ и по крайней мере один $X=Gly$ (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, независимо выбранным из любой природной аминокислоты); (l) $n=3$ и по крайней мере два $X=Gly$ (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, независимо выбранным из любой природной аминокислоты); (m) $n=2$ и каждый $X=Ala$ или Gly ; (n) $n=3$ и каждый $X=Ala$ или Gly ; (o) $n=3$ и по крайней мере один $X=Ala$ или Gly (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, независимо выбранным из любой природной аминокислоты); или (p) $n=3$ и по крайней мере два $X=Ala$ или Gly (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, независимо выбранным из любой природной аминокислоты). Например, в одном из вариантов осуществления изобретения, С-концевое удлинение представляет собой A, AA, AAA, G, GG, GGG, AG, GA, AAG, AGG, AGA, GGA, GAA или GAG. Настоящее изобретение включает CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такое как нанотело), которое содержит аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере 85%-ную (например, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 или 100%) идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в элементе, выбранном из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-43, где CTLA4-связывающее вещество или ISVD содержит CDR1, CDR2 и CDR3 иммуноглобулина, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, где указанное CTLA4-связывающее вещество или ISVD содержит по крайней мере одну мутацию относительно аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, причем указанная по крайней мере одна мутация находится в положении, выбранном из группы, состоящей из

11, 89, 110 и 112, где указанные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. Настоящее изобретение также относится к CTLA4-связывающему веществу, ISVD, нанотелу или полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-40. Настоящее изобретение также относится к мультиспецифичному связывающему веществу, содержащему CTLA4-связывающий фрагмент (например, ISVD, такой как нанотело), который связывается с CTLA4, который связан с одной или несколькими молекулами, которые связываются с эпитопом, который не является эпитопом, с которым связывается CTLA4-связывающим фрагментом (например, PD1, CTLA4, LAG3, BTLA и/или CD27).

Настоящее изобретение также относится к любому такому CTLA4-связывающему веществу, полипептиду, одинарному вариабельному домену иммуноглобулина (ISVD) или мультиспецифичному связывающему веществу, которое сочетается с дополнительным терапевтическим средством.

Настоящее изобретение также относится к устройству для инъекций (например, игла для подкожных инъекций и шприц) или сосуду, который содержит CTLA4-связывающее вещество, одинарный вариабельный домен иммуноглобулина (ISVD), нанотело, полипептид или мультиспецифическое связывающее вещество, необязательно в сочетании с другим терапевтическим средством.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему CTLA4-связывающее вещество, одинарный вариабельный домен иммуноглобулина (ISVD), нанотело, полипептид или мультиспецифическое связывающее вещество, например, которое находится в векторе. Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину (например, клетке CHO или клетке Pichia), содержащему полинуклеотид или вектор.

Настоящее изобретение также относится к способу получения CTLA4-связывающего вещества, одинарного вариабельного домена иммуноглобулина (ISVD), нанотела, полипептида или мультиспецифического связывающего вещества, включающему введение полинуклеотида, кодирующего CTLA4-связывающее вещество, одинарный вариабельный домен иммуноглобулина (ISVD), нанотело, полипептид или мультиспецифическое связывающее вещество, в клетку-хозяина (например, клетку CHO или клетку Pichia) и культивирование клетки-хозяина в среде в условиях, благоприятных для экспрессии указанного иммуноглобулина из указанного полинуклеотида, и, необязательно, очистку иммуноглобулина от указанной клетки-хозяина и/или указанной среды. Любой одинарный вариабельный домен иммуноглобулина (ISVD), нанотело, полипептид, мультиспецифическое связывающее вещество или CTLA4-связывающее вещество получают таким способом.

Настоящее изобретение также относится к способу предотвращения связывания CTLA4 на T-клетке с CD80 и/или CD86 на антигенпрезентирующей клетке, включающему контактирование указанного CTLA4 с одинарным вариабельным доменом иммуноглобулина (ISVD), нанотелом, полипептидом, мультиспецифичным связывающим веществом или CTLA4-связывающим веществом необязательно совместно с дополнительным терапевтическим средством. Настоящее изобретение также относится к способу усиления иммунного ответа в организме субъекта, включающему введение эффективного количества одинарного вариабельного домена иммуноглобулина (ISVD), нанотела, полипептида, мультиспецифичного связывающего вещества или CTLA4-связывающего вещества субъекту (например, млекопитающему, такому как человек) необязательно совместно с дополнительным терапевтическим средством. Настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики злокачественной опухоли или инфекционного заболевания в организме субъекта, включающему введение эффективного количества одинарного вариабельного домена иммуноглобулина (ISVD), нанотела, полипептида, мультиспецифичного связывающего вещества или CTLA4-связывающего вещества необязательно совместно с дополнительным терапевтическим средством субъекту. В одном из вариантов осуществления изобретения злокачественная опухоль представляет собой метастатическую злокачественную опухоль, твердую опухоль, гематологическую злокачественную опухоль, лейкемию, лимфому, остеосаркому, рабдомиосаркому, нейробластому, злокачественную опухоль почек, лейкемию, переходно-клеточную злокачественную опухоль почек, злокачественную опухоль мочевого пузыря, опухоль Вильма, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль простаты, злокачественную опухоль костей, злокачественную опухоль легких, немелкоклеточную злокачественную опухоль легкого, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки, злокачественную опухоль шейки матки, синовиальную саркому, злокачественную опухоль головы и шеи, плоскоклеточную карциному, множественную миелому, почечно-клеточную злокачественную опухоль, ретинобластому, гепатобластому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рабдоидную опухоль почки, саркому Юинга, хондросаркому, злокачественную опухоль мозга, глиобластому, менингиому, аденому гипофиза, вестибулярную шванному, примитивную нейроэктодермальную опухоль, медуллобластому, астроцитому, анапластическую астроцитому, олигодендроглиому, эпендимому, папиллому хориоидного сплетения, полицитемию, тромбоцитемию, идиопатический миелофиброз, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль эндометрия, карциноидную злокачественную опухоль или злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль молочной железы или злокачественную опухоль желудка. В одном из вариантов осуществления изобретения инфекционное заболевание представляет собой бактериальную

Настоящее изобретение также относится к устройству для инъекций или сосуду, который содержит любое CTLA4-связывающее вещество, представленное в настоящем документе (например, содержащее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62 или 64), необязательно совместно с дополнительным терапевтическим средством.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду (например, ДНК), кодирующему любое CTLA4-связывающее вещество, представленное в настоящем документе (например, содержащее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62 или 64); например, содержащее нуклеотидную последовательность в SEQ ID NO: 61 или 63; или вектор, содержащий такой полинуклеотид; или клетку-хозяина, содержащую такой полинуклеотид или вектор.

Настоящее изобретение также относится к способу получения CTLA4-связывающего вещества, представленного в настоящем документе (например, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62 или 64), включающему введение полинуклеотида, кодирующего CTLA4-связывающее вещество в клетку-хозяина (например, клетку CHO или клетку Pichia) и культивирование клетки-хозяина в среде в условиях, благоприятных для экспрессии указанного CTLA4-связывающего вещества из указанного полинуклеотида и, необязательно, очистку CTLA4-связывающего вещества от указанной клетки-хозяина и/или среды, а также любому CTLA4-связывающему веществу, полученному таким способом.

Настоящее изобретение также относится к способу предотвращения связывания CTLA4 с CD80 или CD86 (например, в организме субъекта), включающему контактирование указанного CTLA4 с CTLA4-связывающим веществом (например, содержащее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62 или 64) необязательно совместно с дополнительным терапевтическим средством; а также к способу усиления иммунного ответа в организме субъекта (например, человека), включающему введение эффективного количества CTLA4-связывающего вещества (например, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62 или 64) субъекту необязательно совместно с дополнительным терапевтическим средством (например, пембролизумаб). Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики злокачественной опухоли или инфекционного заболевания в организме субъекта, включающему введение эффективного количества CTLA4-связывающего вещества (например, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62 или 64) необязательно совместно с дополнительным терапевтическим средством (например, пембролизумаб) субъекту. В одном из вариантов осуществления изобретения злокачественная опухоль представляет собой метастатическую злокачественную опухоль, твердую опухоль, гематологическую злокачественную опухоль, лейкемию, лимфому, остеосаркому, рабдомиосаркому, нейробластому, злокачественную опухоль почек, лейкемию, переходно-клеточную злокачественную опухоль почек, злокачественную опухоль мочевого пузыря, опухоль Вильмса, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль простаты, злокачественную опухоль костей, злокачественную опухоль легких, немелкоклеточную злокачественную опухоль легкого, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки, злокачественную опухоль шейки матки, синовиальную саркому, злокачественную опухоль головы и шеи, плоскоклеточную карциному, множественную миелому, почечно-клеточную злокачественную опухоль, ретинобластому, гепатобластому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рабдоидную опухоль почки, саркому Юинга, хондросаркому, злокачественную опухоль мозга, глиобластому, менингиому, аденому гипофиза, вестибулярную шванному, примитивную нейроэктодермальную опухоль, медуллобластому, астроцитому, анапластическую астроцитому, олигодендроглиому, эпендимому, папиллому хориоидного сплетения, полицитемию, тромбоцитемию, идиопатический миелофиброз, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль эндометрия, карциноидную злокачественную опухоль или злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль молочной железы или злокачественную опухоль желудка; или где инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию или грибковую инфекцию. В одном из вариантов осуществления изобретения, субъекту вводят дополнительное терапевтическое средство (например, пембролизумаб) или в отношении субъекта осуществляют терапевтическую процедуру, совместно с CTLA4-связывающее вещество.

Описание чертежей

Фиг. 1. Таблица, в которой перечислены некоторые из положений аминокислот, которые будут конкретно указаны в настоящем документе, и их нумерация в соответствии с некоторыми альтернативными системами нумерации (такими как Aho и IMGT).

Фиг. 2. Последовательности CTLA4-связывающего вещества.

Фиг. 3А, В. Выравнивание последовательности 11F1 с последовательностью SEQ ID NO: 8-43.

Фиг. 4. Преобладающие N-связанные гликаны для моноклональных антител, продуцируемых клетками яичника китайского хомячка (CHO N-связанные гликаны) и в генетически сконструированных дрожжевых клетках (генетически сконструированные дрожжевые N-связанные гликаны): квадраты: N-ацетилглюкозамин (GlcNac); круги: манноза (Man); ромбы: галактоза (Gal); треугольники: фукоза

(Fuc).

Фиг. 5А, В. bFACS-анализ нанотела F023700912, F023700925 или контрольного нанотела (IRR00051, анти-HER2/ERBB2 (двухвалентный анти-HER2 с 35GS, связанный с альбумин-связывающим веществом)), связывание с (А) клетками Jurkat и (В) клетками CHO-K1, экспрессирующими CTLA4 человека.

Фиг. 6А, В. Конкуренция между нанотелом F023700912 или ипилимумабом и (А) CD80 или (В) CD86 за связывание с CTLA4 человека, экспрессируемого на клетках CHO-K1.

Фиг. 7А-Н. Оценка специфичности нанотела F023700912, F023700925 или контрольного нанотела (IRR00051) за связывание с BTLA, CD8, PD1, CTLA4, LAG3, CD28 или контрольными клетками. Связывание нанотел определяли с помощью (А) L-клеток отрицательного контроля, (В) клеток CHO-K1 отрицательного контроля, (С) клеток huCD28+ L, (D) клеток huCD8альфа+ L, (Е) клеток huLag-3+ CHO-K1 (F) клеток huBTLA+ CHO-K1, (G) клеток huCTLA-4+ CHO-K и (H) клеток huPD-1+ CHO-K1.

Фиг. 8А, В. Конкуренция между нанотелом F023700906, F023701051, F02371054 или F023701061 и (А) CD80 человека или (В) CD86 человека за связывание с CTLA-4 человека, экспрессированным на клетках CHO-K1.

Фиг. 9А-Ж. Эффект нанотела в отношении опухолевых клеток раис 08.13 у гуманизированных мышей. (А) средние объемы опухолей+стандартная погрешность и (В) индивидуальные объемы опухолей на 37 день у мышей, получавших изотипический контроль, ипилимумаб (N297А), ипилимумаб, пембролизумаб, ипилимумаб+пембролизумаб, F023700912 при дозе 5 мг/кг (CTLA4 Nab-5), F023700912 при дозе 15 мг/кг (CTLA4 Nab-15) или пембролизумаб+CTLA4 Nab-15 и объемы опухолей у отдельных мышей в ходе эксперимента на мышах, получавших (С) антитело изотипического контроля, (D) ипилимумаб (N297А), (Е) ипилимумаб, (F) пембролизумаб, (G) ипилимумаб+пембролизумаб, (H) CTLA4 Nab-5, (I) CTLA4 Nab-15 или (J) CTLA4 Nab-15+пембролизумаб.

Фиг. 10А, В. Реактивность сывороточного естественного антитела к F023700912 и F023700925 и трехвалентному контрольному нанотелу T013700112 (не содержит мутации для ослабления связывания с естественными антителами) с использованием (А) сыворотки здорового человека и сыворотки пациентов со злокачественной опухолью.

Фиг. 11. Конструкции CTLA4-связывающего вещества.

Фиг. 12. Последовательности CTLA4-связывающего вещества.

Фиг. 13. Полученная посредством мечения дейтерием тепловая карта различий связывания CTLA4 человека с CTLA4-связывающим веществом F023700912.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к ISVD, которые содержат мутации, которые блокируют реактивность естественных антител (предсуществующих антител) в отношении неоэпитопов в ISVD. Неоэпитопы являются эпитопами в белке, который обнаруживается при мутировании белка (например, процессинге) или при нарушении его фолдинга. Естественные антитела являются антителами, существующими в организме пациента до поступления ISVD. ISVD по настоящему изобретению основаны отчасти на антителах ламы, С-терминальные константные домены, которых были удалены; таким образом подвергая неоэпитопы на С-конце полученного VHH связыванию с естественным антителом. Было обнаружено, что сочетание мутаций остатков 11 и 89 (например, L11V и I89L или V89L) привело к неожиданному дефициту связывания с естественным антителом. Было также показано, что мутации в остатке 112 значительно ослабляют связывание с естественным антителом. Buysе & Boutton (WO2015/173325) включили данные, показывающие, что комбинация мутации L11V и V89L обеспечивает значительное усиление в ослаблении связывания естественных антител по сравнению только с одной мутацией L11V или только одной мутацией V89L. Например, в табл. Н, приведенной Buysе & Boutton на с. 97, представлены сравнительные данные для ISVD только с одной мутацией V89L (с или без С-концевого удлинения) и аналогичный ISVD с мутацией V89L в комбинации с мутацией L11V (также с или без С-концевого удлинения). Кроме того, хотя они были получены в двух отдельных экспериментах, данные, приведенные в табл. Н для комбинации L11V/V89L, по сравнению с данными, приведенными в табл. В для только одной мутации L11V (в том же самом ISVD), показали, что ослабление связывания естественных антител, которое получено посредством комбинации L11V/V89L, было больше, чем только для одной мутации L11V. Поскольку известно, что структура каркаса антител ламы является крайне высококонсервативной, эффект мутаций в положениях 11 и 89, вероятно, будет сохраняться для любого ISVD. Действительно, эффект был продемонстрирован на фиг. 10 с существующими связывающими веществами, F023700912, F023700925, которые, как было показано, демонстрируют очень низкие уровни связывания с естественными антителами.

В настоящем описании аминокислотные остатки/положения в варибельном домене тяжелой цепи иммуноглобулина будут нумероваться в соответствии с системой нумерации Kabat. Для удобства, на фиг. 1 представлена таблица, в которой перечислены некоторые из аминокислотных положений, которые будут конкретно указаны в настоящем документе, и их нумерация в соответствии с некоторыми альтернативными системами нумерации (такими как Aho и IMGT. Примечание: если в явной форме не указано иное, для настоящего описания и пунктов формулы изобретения нумерация по Kabat является опреде-

ляющей; другие системы нумерации приведены только в качестве справочной информации).

В отношении CDR, как хорошо известно в данной области техники, существует множество обозначений для определения и описания CDR фрагмента VH или VHH, например, определение по Kabat (которое основано на изменчивости последовательностей и является наиболее часто используемым) и определение по Chothia (которое основано на положении областей структурных петель). Делается ссылка, например, на веб-сайт www.bioinf.org.uk/abs/. Для целей настоящего описания и пунктов формулы изобретения, даже если могут быть также указаны CDR в соответствии с системой нумерации Kabat, CDR наиболее предпочтительно определяются исходя из определения Abm (которое основано на программном моделировании антител AbM Oxford Molecular), поскольку это считается оптимальным компромиссом между определениями по Kabat и Chothia. Повторно делается ссылка на веб-сайт www.bioinf.org.uk/abs/. См. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978), Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, et al., (1977), J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, et al., (1987), J. Mol. Biol. 196:901-917 или Chothia, et al., (1989), Nature, 342:878-883; Chothia & Lesk (1987). J. Mol. Biol. 196: 901-917; Elvin A. Kabat, Tai Te Wu, Carl Foeller, Harold M. Perry, Kay S. Gottesman (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest; Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В одном из вариантов осуществления изобретения, определение CDR соответствует системе Kabat, например, где FR1 в VHH содержит аминокислотные остатки в положениях 1-30, CDR1 в VHH содержит аминокислотные остатки в положениях 31-35, FR2 в VHH содержит аминокислоты в положениях 36-49, CDR2 в VHH содержит аминокислотные остатки в положениях 50-65, FR3 в VHH содержит аминокислотные остатки в положениях 66-94, CDR3 в VHH содержит аминокислотные остатки в положениях 95-102 и FR4 в VHH содержит аминокислотные остатки в положениях 103-113.

В одном из вариантов осуществления изобретения CDR определяются в соответствии с Kontermann and Dübel (Eds., Antibody Engineering, vol. 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, p. 33-51, 2010).

Термин "одинарный варибельный домен иммуноглобулина" (также называемый "ISV" или ISVD") обычно используется для обозначения варибельных доменов иммуноглобулина (которые могут быть доменами тяжелой цепи или легкой цепи, включая VH, VHH или VL-домены), которые могут образовывать функциональный антигенсвязывающий участок без взаимодействия с другим варибельным доменом (например, без VH/VL взаимодействия, которое необходимо между доменами VH и VL стандартного четырех-цепочечного моноклонального антитела). Примеры ISVD будут очевидны для специалиста в данной области и, например, включают нанотела (включая VHH, гуманизированные VHH и/или верблюжьих VH, такие как VH человека верблюжьего типа), IgNAR, домены, (однодоменные) антитела (такие как dAbsTM), которые являются доменами VH или которые получены из домена VH, и (однодоменные) антитела (такие как dAbsTM), которые являются VL доменами или которые получены из домена VL. Обычно предпочтительны ISVD, которые основаны на и/или получены из варибельных доменов тяжелой цепи (например, домены VH или VHH). Наиболее предпочтительно ISVD будет представлять собой нанотело. Например, F023700906 представляет собой ISVD.

Термин "нанотело", в целом, определен в WO 2008/020079 или WO 2009/138519 и, таким образом, в конкретном аспекте обычно обозначается как VHH, гуманизированное VHH или VH верблюжьего типа (например, VH человека верблюжьего типа) или обычно оптимизированное по последовательности VHH (такое как, например, оптимизированное для химической стабильности и/или растворимости, максимального перекрытия с известными каркасными областями человека и максимальной экспрессии). Следует отметить, что термины "нанотело" или "нанотела" являются зарегистрированными товарными знаками Ablynx N.V. и поэтому могут также указываться как Nanobody® и/или Nanobodies®).

Мультиспецифичное связывающее вещество представляет собой молекулу, которая содержит первый CTLA4-связывающий фрагмент (например, ISVD или нанотело) и один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5) дополнительных связывающих фрагментов (например, ISVD или нанотела), которые связываются с эпитопом, отличным от эпитопа первого CTLA4-связывающего фрагмента (например, другой эпитоп CTLA4 или CD27, LAG3, PD1 или BTLA).

Связывающий фрагмент или связывающий домен или связывающая единица представляет собой молекулу, такую как ISVD или нанотело, (например, любую из SEQ ID NO: 8-43 или 60), которая связывается с антигеном, таким как CTLA4. Связывающий фрагмент или связывающий домен или связывающая единица может быть частью более крупной молекулы, такой как поливалентное или мультиспецифическое связывающее вещество, которое включает более одного фрагмента, домена или единицы, которая может содержать другой функциональный элемент, такой как, например, экстендер периода полувыведения (HLE), нацеливающий элемент и/или небольшую молекулу, такую как полиэтиленгликоль (PEG).

Моновалентное CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) представляет собой молекулу, которая содержит один антигенсвязывающий домен. Двухвалентное CTLA4-

связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) содержит два антигенсвязывающих домена. Поливалентное CTLA4-связывающее вещество содержит более одного антигенсвязывающего домена (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7).

Моноспецифическое CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) связывается с одним антигеном (CTLA4); биспецифичное CTLA4-связывающее вещество связывается с двумя различными антигенами, и мультиспецифическое CTLA4-связывающее вещество связывается с более чем одним антигеном.

Бипаратопное CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такое как нанотело) является моноспецифичным, но связывается с двумя различными эпитопами одного и того же антигена. Мультипаратопное CTLA4-связывающее вещество связывается с одним и тем же антигеном, но более чем с одним эпитопом в антигене.

Используемый в настоящем документе термин "период полувыведения", относящийся к CTLA4-связывающему веществу (например, ISVD, такой как нанотело) или другой молекуле, который обычно можно определить согласно описанию в пункте о) на с. 57 в WO 2008/020079 и, как указано выше, относится ко времени, затрачиваемому на снижение сывороточной концентрации аминокислотной последовательности, CTLA4-связывающего вещества, соединения или полипептида на 50%, *in vivo*, например, в результате деградации последовательности или соединения, и/или выведения или секвестрации последовательности или соединения с помощью природных механизмов. Период полувыведения *in vivo* аминокислотной последовательности, CTLA4-связывающего вещества, соединения или полипептида по изобретению может быть определен любым способом, известным *per se*, например, с помощью фармакокинетического анализа. Подходящие способы понятны специалисту в данной области техники и могут, например, обычно, представлять собой способы, описанные в пункте о) на с. 57 WO 2008/020079. Как также указано в пункте о) на с. 57 WO 2008/020079, период полувыведения может быть выражен с использованием таких параметров, как $t_{1/2}$ -альфа, $t_{1/2}$ -бета и площадь под кривой (AUC). При этом следует отметить, что термин "период полувыведения", в том виде, в котором он используется в настоящем документе, относится, в частности, к $t_{1/2}$ -бета или терминальному периоду полувыведения (в котором $t_{1/2}$ -альфа и/или AUC или оба эти параметра могут не подвергаться оценке). Ссылка, например, сделана на экспериментальную часть ниже, а также на стандартные справочники, такие как Kenneth, A et al: *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and Peters et al., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). Ссылка также сделана на "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982). Аналогично, термины "увеличение периода полувыведения" или "увеличенный период полувыведения" также определены в пункте о) на с. 57 в WO 2008/020079 и, в частности, относятся к увеличению $t_{1/2}$ -бета, либо с или без увеличения $t_{1/2}$ -альфа, и/или AUC или обоих этих показателей.

В случае, когда в настоящем документе термин конкретно не определен, он имеет обычное принятое в данной области техники значение, которое будет понятно специалисту в данной области техники. Ссылка сделана, например, на стандартные справочники, такие как Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6th Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., *Roitt's Essential Immunology*, 10th Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); и Janeway et al., "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005), а также на общий уровень техники, описанный в настоящем документе.

Для общего описания поливалентных и мультиспецифичных полипептидов, содержащих одно или несколько нанотел, и их получения, также делается ссылка на Conrath et al., *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyldermans, *Reviews in Molecular Biotechnology* 74 (2001), 277-302; а также, например, WO 1996/34103, WO 1999/23221, WO 2004/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627.

"Выделенные" CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело), полипептиды, полинуклеотиды и векторы по крайней мере частично не содержат другие биологические молекулы клеток или клеточной культуры, из которых их получают. Такие биологические молекулы включают нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другой материал, такой как клеточный дебрис и среда для роста. "Выделенное" PD1/CTLA4-связывающее вещество может также, по крайней мере отчасти, не содержать компоненты системы экспрессии, такие как биологические молекулы из клетки-хозяина или его среды роста. Обычно термин "выделенный" не предназначен для обозначения полного отсутствия таких биологических молекул или отсутствия воды, буферов или солей или компонентов фармацевтической композиции, которая включает антитела или фрагменты.

Фраза "контрольные последовательности" относится к полинуклеотидам, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в определенном организме-хозяине. Контрольные последовательности, подходящие для прокариотов, например, включают промотор, необя-

зательно операторную последовательность и участок связывания рибосомы. Эукариотические клетки, как известно, используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота или полинуклеотид "функционально связаны", если они находятся в функциональной взаимосвязи с другим полинуклеотидом. Например, ДНК для препоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде белка-предшественника, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосомом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы способствовать трансляции. Как правило, но не всегда, "функционально связанный" означает, что ДНК последовательности, подлежащие связыванию, являются смежными, и, в случае секреторной лидерной последовательности, являются смежными и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными. Связывание осуществляются лигированием на соответствующих участках рестрикции. Если такие участки не существуют, используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры в соответствии с общепринятой практикой.

"Связывающие сывороточный альбумин человека вещества" или "HSA-связывающие вещества" по настоящему изобретению представляют собой любую из описанных в настоящем документе молекул, которые связываются с HSA (например, ISVD, такой как нанотело), а также любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с HSA, и включает любой из HSA-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Отдельное HSA-связывающее вещество может обозначаться как HSA-связывающий фрагмент, если он является частью большей молекулы, например, поливалентной молекулы, такой как F023700912 или F023700914.

В общем случае структурная единица базового антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая область каждой цепи включает переменный участок, содержащий около от 100 до 110 или больше аминокислот, ответственный в основном за распознавание антигена. Карбоксиконцевая область тяжелой цепи может определять константную область, в основном ответственную за эффекторную функцию. Как правило, легкие цепи человека классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Кроме того, тяжелые цепи человека обычно классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. В легкой и тяжелой цепях переменные и константные области соединяются областью "J", содержащей около 12 или больше аминокислот, причем тяжелая цепь также включает "D" область, содержащую примерно 10 аминокислот. См. в общем случае *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Примеры антигенсвязывающих доменов включают, но ими не ограничиваются, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv и одноцепочечные Fv-молекулы.

Следующие свойства связаны с указанными мутациями в CTLA4-связывающем веществе 11F01:

E1D: Предотвращение образования пироглутаминовой кислоты в первой аминокислоте конструкции E1.

L11V: Ослабление связывания с естественным антителом.

A14P: Гуманизация.

Q45R: Мутированный для повышения стабильности.

A74S: Гуманизация..

I89L: Ослабление связывания с естественным антителом.

M96P, Q или R: Предотвращение окисления M96.

Q108L: Гуманизация.

В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4 представляет собой CTLA4 человека. В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4 человека содержит аминокислотную последовательность:

```
MACLGFRHK AQLNLATRTW PCTLLFFLLF IPVFCKAMHV AQPAVVLASS
RGIASFVCEY ASPGKATEVR VTVLRQADSQ VTEVCAATYM MGNELTFLDD
SICTGTSSGN QVNLTIQGLR AMDTGLYICK VELMYPPPPY LGIGNGTQIY
VIDPEPCPDS DFLWILAAV SSGLFFYSFL LTAVSLSKML KKRSPLETTGV
YVKMPRTEPE CEKQFQPYFI PIN
```

(SEQ ID NO: 111)

CTLA4-связывающие вещества.

Настоящее изобретение направлено на получение усовершенствованных CTLA4-связывающих веществ, в частности, усовершенствованных ISVD CTLA4 и, в частности, усовершенствованных CTLA4 нанотел. CTLA4-связывающие вещества по настоящему изобретению включают полипептиды, которые являются вариантами полипептидов, включающих аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 1,

которая мутируется в положении, например, 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112.

CTLA4-связывающее вещество или CTLA4 ISVD или CTLA4 нанотело относится к связывающему веществу, ISVD или нанотелу соответственно, которое связывается с CTLA4.

Усовершенствованные CTLA4-связывающие вещества, предусмотренные настоящим изобретением, также обозначены в настоящем документе как "CTLA4-связывающие вещества по изобретению" или "CTLA4-связывающие вещества". Эти термины охватывают любую молекулу, содержащую молекулу, представленную в настоящем документе, которая связывается с CTLA4. Например, термины включают ISVD, который содержит аминокислотную последовательность, указанную в элементе, выбранном из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-43 и 60, а также любой полипептид, нанотело, ISVD, слитый белок, стандартное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который включает аминокислотную последовательность, указанную в элементе, выбранном из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-43 и 60; или любую биспецифическую молекулу (например, ISVD), которая содержит аминокислотную последовательность, указанную в элементе, выбранном из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-43 и 60, связывается с CTLA4, а также связывается с другим антигеном или другим эпитопом, таким как CD27, LAG3, PD1 или BTLA. CTLA4-связывающее вещество по настоящему изобретению представляет собой F023700912 или F023700914.

Объем настоящего изобретения включает любое CTLA4-связывающее вещество с расположением связывающих фрагментов, приведенных на фиг. 11, необязательно не содержащее метку FLAG3 и/или HIS6; а также любую из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 12.

В WO 2008/071447 описаны нанотела, которые могут связываться с CTLA4 и их применение. SEQ ID NO: 1306 в WO 2008/071447 представляет CTLA4 специфичное нанотело, называемое 11F01, последовательность которого приведена в настоящем документе в виде SEQ ID NO: 1. Эта последовательность (также называемая в настоящем документе как "эталон А") и ее CDR также приведены в табл. А-1 ниже.

Как подробно описано в настоящем документе, CTLA4-связывающие вещества по изобретению, которые в варианте осуществления изобретения в поливалентных и/или мультиспецифичных CTLA4-связывающих веществах по настоящему изобретению (например, F023700914) предпочтительно имеют аналогичную комбинацию CDR (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3), которые присутствуют в 11F01 или в связывающем веществе, содержащем последовательность 11F01 (SEQ ID NO: 1). См. табл. А-1.

Настоящее изобретение также включает CTLA4-связывающие вещества, являющиеся вариантами 11F01, которые содержат аминокислотную последовательность, как указано в табл. А-2 ниже. Объем настоящего изобретения включает CTLA4-связывающие вещества, которые включают CDR1, CDR2 и CDR3 указанных вариантов, приведенных в табл. А-2.

Кроме того, настоящее изобретение включает мультиспецифичные и/или поливалентные связывающие вещества (например, F023700914), содержащие CTLA4-связывающий фрагмент, который включает CDR1, CDR2 и CDR3 или аминокислотную последовательность 11F01 или один из его вариантов, приведенные в табл. А-2.

Таблица А-1

CTLA4 нанотело 11F1 (11F01)

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|---|--|
| 1 | Эталон А WO 2008/071447 SEQ ID NO: 1306 (11F01 или 4CTLA011F01) | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYCGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLG MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSS |

Таблица А-2

Вариант CTLA4 нанотела 11F1

| | | |
|--|---|---|
| 60 | 11F01 (E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L) (F023700906) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMG WFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYADSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNLSLRPEDTALYYCAAEP SGISGWDY WGQGLTVTV SS |
| 2 | CDR1 (Kabat) | FYGMG (аминокислоты 6-10 SEQ ID NO: 2) |
| 3 | CDR2 (Kabat) | DIRTSAGRTYADSVKG |
| 4 | CDR3 (Kabat/Abm) | EXSGISGWDY ; где X соответствует М или Р (например, EmSGISGWDY или EpSGISGWDY) |
| 5 | CDR1 (Abm) | GGTFSFYGMG |
| 6 | CDR2 (Abm) | DIRTSAGRTY (аминокислоты 1-10 SEQ ID NO: 3) |
| 7 | CDR3 (Kabat/Abm) | EXSGISGWDY; где X соответствует М или Р (например, EmSGISGWDY или EpSGISGWDY) |
| Примечание: SEQ ID NO: 4 идентична SEQ ID NO: 7 | | |

*CDR подчеркнуты и/или выделены жирным шрифтом.

Остаток 1 в SEQ ID NO: 60 может соответствовать D или E. Если остаток 1 соответствует D, CTLA4-связывающее вещество может быть обозначено как ID, и если остаток 1 соответствует E, CTLA4-связывающее вещество может быть обозначено как IE.

В одном из вариантов осуществления изобретения, CTLA4-связывающее вещество по настоящему изобретению содержит N73X мутацию, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от N, например S, V, G, R, Q, M, H, T, D, E, W, F, K, A, Y или P (или любая аминокислота, отличная от N).

Настоящее изобретение включает CTLA4-связывающие вещества, содержащие одно, два или три CDR в CTLA4-связывающем веществе, где каждый содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, например, консервативные замены, и/или содержит 100, 99, 98, 97, 96 или 95% идентичность последовательности относительно CDR, которые находятся в последовательностях CTLA4-связывающих веществ, указанных в табл. А-1 или А-2 (например, 11F01 (E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L) или 11F01), или указаны в SEQ ID NO: 2-7, где CTLA4-связывающее вещество, имеющее такие CDR, сохраняет способность связываться с CTLA4.

Номера остатков в соответствии с системой нумерации Kabat для некоторых остатков CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, такой как нанотело), которые основаны на эталоне А, описанные в настоящем документе, представлены в следующей последовательности:

E₁VQLVESGGGL₁₁V₁₂Q₁₃A₁₄GGSLRLSCAASG₂₆G₂₇T₂₈F₂₉S₃₀FYGMGW₃₆F₃₇R₃₈Q₃₉AP

GKEQ₄₅E₄₆F₄₇V₄₈A₄₉DIRTSAGRTYADSVKGR₆₆F₆₇T₆₈I₆₉S₇₀RDN₇₃A₇₄KNTVYLQMN_{82a}S_{82b}

L_{82c}K₈₃P₈₄EDT₈₇A₈₈V₈₉Y₉₀Y₉₁CAAEM₉₆SGISGWDYW₁₀₃G₁₀₄Q₁₀₅G₁₀₆TQ₁₀₈V₁₀₉T₁₁₀V₁₁₁S₁₁₂S

113

(SEQ ID NO: 1)

Номера остатков, в соответствии с системой нумерации Kabat, для некоторых остатков связывающего вещества CTLA4 11F01 (E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L), которые описаны в настоящем документе, представлены в последовательности ниже:

D₁VQLVESGGGV₁₁VQP₁₄GGSLRLSCAASGGTFSFYGMG

WFRQAPGKER₄₅EFVADIRTSAGRTYADSVKGRFTISRDN₇₄KNTVYLQMNLSLR₈₃PED

TAL₈₉YYCAAEP₉₆SGISGWDYWGQGL₁₀₈VTVSS

(SEQ ID NO: 60)

Настоящее изобретение включает любое CTLA4-связывающее вещество, содержащее аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, содержащую 80% или более (например, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичность аминокислотной последовательности, где CTLA4-связывающее вещество сохраняет способность связываться с CTLA4.

Настоящее изобретение включает варианты осуществления, где CDR3 метионин CTLA4-связывающего вещества в положении 96 по Kabat заменен любой аминокислотой, такой как пролин (но не Cys, Asp или Asn), например любой из следующих аминокислот: Leu, Ile, Val, Ala, Gly, Tyr, Trp, Phe, Glu, Gln, Ser, Thr, His, Arg, Lys или Pro.

Некоторые предпочтительные, но не ограничивающие CTLA4-связывающие вещества (например,

ISVD, такие как нанотело) по изобретению представляют собой SEQ ID NO: 60 или перечислены на фиг. 2 в виде SEQ ID NO: 8-43. На фиг. 3 показано выравнивание этих последовательностей с эталоном А (SEQ ID NO: 1). Из этих CTLA4-связывающих веществ, связывающие вещества SEQ ID NO: 26-43 являются примерами CTLA4-связывающих веществ по изобретению, имеющих С-концевое аланиновое удлинение, т.е. аланинный остаток в С-концевой области ISVD-последовательности (также иногда называемый "положение 114") по сравнению с обычной С-концевой последовательностью VTVSS (SEQ ID NO: 57, представленной в эталоне А). Как описано в WO 2012/175741 (но также, например, в WO 2013/024059 и PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325)), это С-концевое аланиновое удлинение может предотвращать связывание так называемых "естественных антител" (предположительно IgG) с предполагаемым эпитопом, который находится в С-концевой области ISV. Предполагается, что этот эпитоп включает, среди прочих остатков, экспонированные на поверхности аминокислотные остатки С-концевой последовательности VTVSS (SEQ ID NO: 57), а также аминокислотный остаток в положении 14 (и аминокислотные остатки, находящиеся рядом/близко к аналогичным в аминокислотной последовательности, например, положения 11, 13 и 15) и могут также содержать аминокислотный остаток в положении 83 (и аминокислотные остатки, находящиеся рядом/близко к налогичным в аминокислотной последовательности, например, положения 82, 82а, 82b и 84) и/или аминокислотный остаток в положении 108 (и аминокислотные остатки, находящиеся рядом/близко к налогичным в аминокислотной последовательности, например, в положении 107).

Однако, хотя присутствие такого С-концевого аланина (или в более широком смысле С-концевого удлинения) может значительно снизить (и во многих случаях даже по существу полностью предотвратить) связывание "естественных антител", которые могут быть обнаружены в сыворотке ряда субъектов (как здоровых субъектов, так и больных), было обнаружено, что сыворотки от некоторых субъектов (например, сыворотки от пациентов с некоторыми иммунными заболеваниями, такими как системная красная волчанка) могут содержать естественные антитела, которые могут связываться с С-концевой областью ISV (в случае, когда такая область открыта), даже в случае, когда ISV содержит такой С-концевой аланин (или в более широком смысле, такое С-концевое удлинение). Ссылка вновь сделана на находящуюся на рассмотрении неопубликованную повторно PCT заявку PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325), заявитель Ablynx N.V., поданную 13 мая 2015 г. под названием "Improved immunoglobulin variable domains".

Соответственно, одной из конкретных целей изобретения является обеспечение CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, таких как нанотело), которые являются усовершенствованными вариантами CTLA4 нанотела, называемого в настоящем документе как "эталон А", и которые имеют ослабленное связывание с так называемыми "естественными антителами" и, в частности, теми, которые описаны в PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325) (т.е. естественные антитела, которые могут связываться с открытой С-концевой областью ISV даже в присутствии С-концевого удлинения)

Изобретение относится к CTLA4-связывающим веществам, содержащим аминокислотные последовательности, которые являются вариантами последовательности SEQ ID NO: 1, которые содержат одну или несколько из следующих мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1:

1D или 1E;
11V;
14P;
45R;
74S;
83R;
89L или 89T;
96P или
108L;

например, где CTLA4-связывающее вещество содержит одну или несколько из следующих множеств мутаций:

89L в комбинации с 11V; 14P; 45R; 74S; 83R; 86P; 108L и 1E или 1D;
89L в комбинации с 11V;
89L в комбинации с 110K или 110Q;
89L в комбинации с 112K или 112Q;
89L в комбинации с 11V; 14P; 45R; 74S; 83R; 86P; 108L, 110K или 110Q и 1E или 1D;
89L в комбинации с 11V; 14P; 45R; 74S; 83R; 86P; 108L, 112K или 112Q и 1E или 1D;
89L в комбинации с 11V и 110K или 110Q;
89L в комбинации с 11V и 112K или 112Q;
11V в комбинации с 110K или 110Q и/или
11V в комбинации с 112K или 112Q.

В частности, в одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) содержат:

аминокислота в положении 1 соответствует предпочтительно E или D;

аминокислота в положении 11 соответствует предпочтительно L или V;
 аминокислота в положении 14 соответствует предпочтительно A или P;
 аминокислота в положении 45 соответствует предпочтительно Q или R;
 аминокислота в положении 74 соответствует предпочтительно A или S;
 аминокислота в положении 83 соответствует предпочтительно K или R;
 аминокислота в положении 89 соответствует предпочтительно T, V или L;
 аминокислота в положении 96 соответствует предпочтительно M или P;
 аминокислота в положении 108 соответствует предпочтительно Q или L;
 аминокислотный остаток в положении 110 предпочтительно соответствующим образом выбран из T, K или Q и
 аминокислотный остаток в положении 112 предпочтительно соответствующим образом выбран из S, K или Q;

так, что, например, верно одно или несколько из следующих условий:

- (i) положение 89 соответствует T;
- (ii) положение 89 соответствует L;
- (iii) положение 1 соответствует D или E, положение 11 соответствует V, положение 14 соответствует P, положение 45 соответствует R, положение 74 соответствует S, положение 83 соответствует R, положение 89 соответствует L, положение 96 соответствует P, и положение 108 соответствует L;
- (iv) положение 89 соответствует L, и положение 11 соответствует V;
- (v) положение 89 соответствует L, и положение 110 соответствует K или Q;
- (vi) положение 89 соответствует L, и положение 112 соответствует K или Q;
- (vii) положение 1 соответствует D или E, положение 11 соответствует V, положение 14 соответствует P, положение 45 соответствует R, положение 74 соответствует S, положение 83 соответствует R, положение 89 соответствует L, положение 96 соответствует P, положение 108 соответствует L; и положение 110 соответствует K или Q;
- (viii) положение 1 соответствует D или E, положение 11 соответствует V, положение 14 соответствует P, положение 45 соответствует R, положение 74 соответствует S, положение 83 соответствует R, положение 89 соответствует L, положение 96 соответствует P, положение 108 соответствует L; и положение 112 соответствует K или Q;
- (ix) положение 89 соответствует L, и положение 11 соответствует V, и положение 110 соответствует K или Q;
- (x) положение 89 соответствует L, и положение 11 соответствует V, и положение 112 соответствует K или Q;
- (xi) положение 11 соответствует V, и положение 110 соответствует K или Q или
- (xii) положение 11 соответствует V, и положение 112 соответствует K или Q.

В конкретных вариантах осуществления CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такое как нанотело) по изобретению содержат аминокислотные последовательности, которые являются вариантами SEQ ID NO: 1, в которых положение 89 соответствует T, или в которых положение 1 соответствует D, положение 11 соответствует V, положение 14 соответствует P, положение 45 соответствует R, положение 74 соответствует S, положение 83 соответствует R, положение 89 соответствует L, положение 96 соответствует P, и положение 108 соответствует L, или в которых положение 11 соответствует V, и положение 89 соответствует L (необязательно в подходящей комбинации с 110K или 110Q мутацией и/или 112K или 112Q мутацией, и в частности в комбинации с 110K или 110Q мутацией) являются особенно предпочтительными. Еще более предпочтительными являются аминокислотные последовательности, в которых положение 11 соответствует V и положение 89 соответствует L, необязательно с 110K или 110Q мутацией.

Как указано выше, CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело), описанные в настоящем документе, могут связываться (и, в частности, могут специфически связываться) с CTLA4. В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающие вещества могут связываться с CTLA4 и тем самым препятствовать CD80 и CD86 на антигенпрезентирующих клетках связываться с CTLA-4 на Т-клетках. В одном из вариантов осуществления изобретения, полученное таким образом блокирование передачи сигналов CTLA4 пролонгирует активацию Т-клеток, восстанавливает пролиферацию Т-клеток и, тем самым, усиливает опосредованный Т-клетками иммунитет, что теоретически повышает способность пациента усиливать противоопухолевый иммунный ответ.

В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество по настоящему изобретению обладает одним или несколькими следующими свойствами:

- связываться с CTLA4 (например, CTLA4 человека и/или яванского макака) (например, CTLA4-FC слитный белок), например, с K_D около 1 нМ (например, около 1,2 нМ);
- связываться с CTLA4 на поверхности клетки, например, CHO клетки, экспрессирующей CTLA4;
- Блокировать связывание CD80 и/или CD86 с CTLA4 (например, CTLA4, экспрессированным на CHO клетках);

не связываться с BTLA, CD8, PD1, LAG3 и/или CD28;

связываться *in vitro* и/или *in vivo* с сывороточным альбумином человека, макака-резус и мыши (в случае, когда слит с одним или несколькими ALB11002-связывающими веществами);

ингибировать рост опухоли (например, опухолей поджелудочной железы, например, опухолей поджелудочной железы человека у мыши, экспрессирующие иммунные клетки человека)

В табл. В перечислены некоторые неограничивающие возможные комбинации аминокислотных остатков, которые могут присутствовать в положениях 11, 89, 110 и 112 (SEQ ID NO: 1) в CTLA4-связывающих веществах (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению.

Таблица В

Возможные комбинации мутаций в аминокислотных положениях 11, 89, 110 и 112 в вариантах CTLA4-связывающего вещества SEQ ID NO: 1

| | ПОЛОЖЕНИЕ | | | | | ПОЛОЖЕНИЕ | | | |
|--|-----------|----|-----|-----|--|-----------|----|-----|-----|
| | 11 | 89 | 110 | 112 | | 11 | 89 | 110 | 112 |
| К О М Б И Н А Ц И Я | L | T | T | S | К О М Б И Н А Ц И Я | V | T | T | S |
| | L | T | T | K | | V | T | T | K |
| | L | T | T | Q | | V | T | T | Q |
| | L | T | K | S | | V | T | K | S |
| | L | T | Q | S | | V | T | Q | S |
| | L | V | T | K | | V | V | T | K |
| | L | V | T | Q | | V | V | T | Q |
| | L | V | K | S | | V | V | K | S |
| | L | V | Q | S | | V | V | Q | S |
| | L | L | T | K | | V | L | T | S |
| | L | L | T | Q | | V | L | T | K |
| | L | L | K | S | | V | L | T | Q |
| | L | L | Q | S | | V | L | K | S |
| | L | L | Q | S | | V | L | Q | S |

CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело), предусмотренные настоящим изобретением, являются также такими, как описано в настоящем описании, примерах и чертежах, т.е. они имеют CDR, которые являются такими, как описано в настоящем документе, и имеют общую степень идентичности последовательности (как определено в настоящем документе) с последовательностью SEQ ID NO: 1, которая описана в настоящем документе и/или может иметь ограниченное количество "аминокислотных различий" (как описано в настоящем документе) с (одной из этих) этими эталонными последовательностями.

CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению предпочтительно содержат следующие CDR (в соответствии с системой нумерации Kabat):

CDR1 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который содержит аминокислотную последовательность FYGMG (SEQ ID NO: 2); и

CDR2 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который содержит аминокислотную последовательность DIRTSAGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 3); и

CDR3 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который содержит аминокислотную последовательность EPSGISGWDY (SEQ ID NO: 4); необязательно,

где CDR1, CDR2 и/или CDR3 содержит 1, 2, 3, 4, 5, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замены, например консервативные замены.

Альтернативно, в случае, когда CDR приведены в соответствии с системой Abm, CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению предпочтительно содержат следующие CDR:

CDR1 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность GGTFsfYGMG (SEQ ID NO: 5); и

CDR2 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность DIRTSAGRTY (SEQ ID NO: 6); и

CDR3 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность EPSGISGWDY (SEQ ID NO: 7, которая является такой же, как SEQ ID NO: 4); необязательно,

где CDR1, CDR2 и/или CDR3 содержит 1, 2, 3, 4, 5, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замены, например консервативные замены.

CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению, в одном из вариантов осуществления изобретения, имеет такие CDR и мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, как описано в настоящем документе, и необязательно:

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по

крайней мере 95% (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1;

условная композиционная оценочная матричная коррекция); и/или

не больше чем 7, например не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (в которых указанные аминокислотные различия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR; не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, и не учитывая мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом).

Следующие ссылки относятся к алгоритмам BLAST, часто используемым для анализа последовательностей: BLAST ALGORITHMS: Altschul et al. (2005), FEBS J. 272(20):5101-5109; Altschul, S.F., et al., (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., et al., (1993), Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., et al., (1996), Meth. Ezymol. 266:131-141; Altschul, S.F., et al., (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., et al., (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., et al., (1993), Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. et al., (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O., et al., "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978), vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), p. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.; Schwartz, R.M., et al., "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978), vol. 5, suppl. 3", M.O. Dayhoff (ed.), p. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991), J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., et al., (1991), Methods 3:66-70; Henikoff, S., et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., et al., (1993), J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., et al., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268; Karlin, S., et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., et al., (1994), Ann. Prob. 22:2022-2039; и Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997), p. 1-14, Plenum, New York.

В отношении различных аспектов и предпочтительных аспектов CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению, предусмотренных настоящим изобретением, в том, что касается степени идентичности последовательности относительно SEQ ID NO: 1 и/или количества и вида "аминокислотных различий", которые могут присутствовать в таком связывающем веществе по изобретению (т.е. по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1), следует отметить, когда говорят, что:

(i) аминокислотная последовательность по изобретению имеет степень идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1; условная композиционная оценочная матричная коррекция);

и/или когда сообщается, что:

(ii) аминокислотная последовательность по изобретению имеет не больше чем 7, предпочтительно не больше чем 5, например только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" с последовательностью SEQ ID NO: 1 (опять, не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, и не учитывая мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом), то также включены последовательности, которые не имеют аминокислотных различия с последовательностью SEQ ID NO: 1, иные, чем мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренные конкретным рассматриваемым аспектом) и любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать.

Таким образом, в одном конкретном аспекте по изобретению CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, но в которой по крайней мере одна аминокислотная мутация в положении 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112 заменена (например, консервативно заменена) и может иметь 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1 (включая CDR, но не учитывая мутацию(ии) или комбинацию мутаций в по-

ложениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, описанных в настоящем документе, и/или любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) и/или может не иметь аминокислотные различия с SEQ ID NO: 1 (т.е. другие, чем мутация(ии) или комбинация мутаций в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, описанных в настоящем документе, и любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать).

В случае, когда присутствуют любые аминокислотные различия (т.е. помимо любого С-концевого удлинения и мутаций в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, которые требуются в соответствии с конкретным аспектом изобретения), эти аминокислотные различия могут присутствовать в CDR и/или в каркасных областях, однако они предпочтительно присутствуют только в каркасных областях (как определено Abm, т.е. не в CDR, как определено в соответствии с Abm), т.е. таким образом, что CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению имеют аналогичные CDR (определенные в соответствии с системой Abm), которые присутствуют в SEQ ID NO: 1 или 60.

Кроме того, когда CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению в соответствии с любым аспектом по изобретению имеет одно или несколько аминокислотных различий с последовательностью SEQ ID NO: 1 (помимо мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом), то некоторые конкретные, но не ограничивающие примеры таких мутаций/аминокислотных различий, которые могут присутствовать (т.е. по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 1), представляют собой, например, E1D, P41A, P41L, P41S или P41T (и, в частности, P41A) и/или T87A (например, E1D (необязательно), L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P и Q108L). Другими примерами мутаций являются (подходящая комбинация) одна или несколько подходящих "гуманизирующих" замен, таких как Q108L; ссылка, например, сделана на WO 2009/138519 (или в известном уровне техники, указанном в WO 2009/138519) и WO 2008/020079 (или в известном уровне техники, указанном в WO 2008/020079), а также в табл. А-3 - А-8, представленных в WO 2008/020079 (которые представляют собой перечни, показывающие возможные гуманизирующие замены). Предпочтительно связывающие вещества CTLA4 по изобретению содержат, по меньшей мере, гуманизирующую замену Q108L.

Кроме того, когда CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению присутствуют в и/или образуют N-концевую часть CTLA4-связывающего вещества, в которой они присутствуют, тогда они предпочтительно содержат D в положении 1 (т.е. E1D мутация по сравнению с эталоном А). Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры таких N-концевых CTLA4-связывающих веществ представлены как SEQ ID NO: 24 и 25 и 60. Соответственно, в дополнительном аспекте изобретение относится к полипептиду по изобретению (который является таким, как подробно описано в настоящем документе), который имеет CTLA4-связывающее вещество по изобретению (которое является таким, как подробно описано в настоящем документе) в его N-концевой области, где указанное CTLA4-связывающее вещество по изобретению имеет D в положении 1, и предпочтительно выбрано из CTLA4-связывающих веществ SEQ ID NO: 24 и 25 и 60.

Аналогично, когда CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такое как нанотело) по изобретению используется в одновалентном формате, оно предпочтительно имеет как С-концевое удлинение X(n), как описано в настоящем документе, так и D в положении 1. Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры таких одновалентных CTLA4-связывающих веществ приведены как SEQ ID NO: 42 и 43. Соответственно, в дополнительном аспекте изобретение относится к моновалентному CTLA4-связывающему веществу по изобретению (которое является таким, как подробно описано в настоящем документе), которое имеет D в положении 1 и С-концевое удлинение X(n) (которое предпочтительно представляет собой отдельный остаток Ala). В одном конкретном аспекте, указанное одновалентное CTLA4-связывающее вещество выбрано из SEQ ID NO: 42 или 43.

С помощью предпочтительных, но не ограничивающих примеров SEQ ID NO: 22-25 и 40-42 и 60 являются примерами CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению, имеющих дополнительные аминокислотные различия с SEQ ID NO: 1, т.е. A14P, Q45R, A74S, K83R и/или Q108L (помимо тех, которые указаны в предыдущих параграфах, SEQ ID NO: 24, 25, 42 и 43 также имеют мутацию E1D). Таким образом, в конкретном аспекте изобретение относится к CTLA4-связывающим веществам по изобретению (т.е. имеющим мутации в положениях 11, 89, 110 и/или 112, описанных в настоящем документе, а также, как дополнительно описано в настоящем документе), которые, по меньшей мере, имеют подходящую комбинацию необязательной мутации E1D, мутации A14P, мутации Q45R, мутации A74S, мутации K83R и мутации Q108L и предпочтительно подходящую комбинацию Q108L с любой одной из других мутаций A14P, Q45R, A74S и K83R, и предпочтительно в комбинации с любыми двумя из этих других мутаций, более предпочтительно с любыми тремя из этих мутаций (например, с комбинацией A14P, A74S и K83R или E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P и Q108L), например, со всеми этими мутациями (и в этом случае также, когда CTLA4-связывающее вещество является одновалентным или присутствует в N-концевой области CTLA4-связывающего вещества по изобретению, предпочтительно также мутация E1D).

CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению, в случае, ко-

гда они используются в одновалентном формате и/или в случае, когда CТLА4-связывающий фрагмент присутствует в и/или образует С-концевую область CТLА4-связывающего вещества (или когда они, в иных случаях, имеют "открытую" С-концевую область в таком полипептиде, под которой обычно подразумевается, что С-концевая область в ISVD не ассоциируется или не связана с константным доменом (например, СН1 доменом); ссылка также сделана на WO 2012/175741 и PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325), предпочтительно также имеют С-концевое удлинение формулы (X)_n, где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например 1); и каждый X представляет собой (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, который независимо выбран из остатков встречающихся в природе аминокислот (хотя в соответствии с одним предпочтительным аспектом, он не содержит какие-либо цистеиновые остатки), и предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (А), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I).

В соответствии с некоторыми предпочтительными, но неограничивающими примерами таких С-концевых удлинений X(n), X и n могут быть следующими:

(a) n=1 и X=Ala;
 (b) n=2 и каждый X=Ala;
 (c) n=3 и каждый X=Ala;
 (d) n=2 и по крайней мере один X=Ala (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, который независимо выбран из любой природной аминокислоты, но предпочтительно независимо выбран из Val, Leu и/или Ile);

(a) n=3 и по крайней мере один X=Ala (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, который независимо выбран из любой природной аминокислоты, но предпочтительно независимо выбран из Val, Leu и/или Ile);

(b) n=3 и по крайней мере два X=Ala (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, который независимо выбран из любой природной аминокислоты, но предпочтительно независимо выбран из Val, Leu и/или Ile);

(c) n=1 и X=Gly;

(d) n=2 и каждый X=Gly;

(e) n=3 и каждый X=Gly;

(f) n=2 и по крайней мере один X=Gly (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, который независимо выбран из любой природной аминокислоты, но предпочтительно независимо выбран из Val, Leu и/или Ile);

(g) n=3 и по крайней мере один X=Gly (с оставшимся аминокислотным остатком(ами) X, который независимо выбран из любой природной аминокислоты, но предпочтительно независимо выбран из Val, Leu и/или Ile);

(h) n=3 и по крайней мере два X=Gly (с оставшимся аминокислотным остатком(остатками) X, который независимо выбран из любой природной аминокислоты, но предпочтительно независимо выбран из Val, Leu и/или Ile);

(i) n=2 и каждый X=Ala или Gly;

(j) n=3 и каждый X=Ala или Gly;

(k) n=3 и по крайней мере один X=Ala или Gly (с оставшимся аминокислотным остатком(остатками) X, который независимо выбран из любой природной аминокислоты, но предпочтительно независимо выбран из Val, Leu и/или Ile); или

(l) n=3 и по крайней мере два X=Ala или Gly (с оставшимся аминокислотным остатком(остатками) X, который независимо выбран из любой природной аминокислоты, но предпочтительно независимо выбран из Val, Leu и/или Ile);

причем аспекты (a), (b), (c), (g), (h), (i), (m) и (n) являются особенно предпочтительными, и аспекты, в которых n=1 или 2, являются предпочтительными, а аспекты, в которых n=1, являются особенно предпочтительными.

Следует также отметить, что предпочтительно любое С-концевое удлинение, присутствующее в CТLА4-связывающем веществе по изобретению (например, ISVD, такие как нанотело), не содержит (свободный) цистеиновый остаток, если указанный цистеиновый остаток используется или предназначен для дополнительной функционализации, например для пегилирования.

Некоторые конкретные, но не ограничивающие примеры используемых С-концевых удлинений представляют собой следующие аминокислотные последовательности: А, АА, ААА, G, GG, GGG, AG, GA, AAG, AGG, AGA, GGA, GAA или GAG.

В случае, когда CТLА4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат мутации в положениях 110 или 112 (необязательно в комбинации с мутациями в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96 и/или 108, как описано в настоящем документе) (относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1), С-концевые аминокислотные остатки в каркасе 4 (начиная с положения 109) могут быть в одном из вариантов осуществления изобретения такими, как указано в SEQ ID NO: 1, но где пять С-концевых остатков можно заменить следующим образом:

(i) если С-концевое удлинение отсутствует: VTVKS (SEQ ID NO: 45), VTVQS (SEQ ID NO: 46),

VKVSS (SEQ ID NO: 47) или VQVSS (SEQ ID NO: 48); или

(ii) если С-концевое удлинение присутствует: VTKSX(n) (SEQ ID NO: 49), VTVQX(n) (SEQ ID NO: 50), VKVSSX(n) (SEQ ID NO: 51) или VQVSSX(n) (SEQ ID NO: 52), например VTKSA (SEQ ID NO: 53), VTVQSA (SEQ ID NO: 54), VKVSSA (SEQ ID NO: 55) или VQVSSA (SEQ ID NO: 56).

В случае, когда CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению не содержат мутаций в положениях 110 или 112 (но только мутации в положении 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96 и/или 108, как описано в настоящем документе), С-концевые аминокислотные остатки в каркасе 4 (начиная с положения 109)), могут быть, в одном из вариантов осуществления изобретения, такими, как указано в SEQ ID NO: 1 но, где 5 С-концевых остатков можно заменить следующим образом:

(i) в случае, когда С-концевое удлинение отсутствует: VTVSS (SEQ ID NO: 57) (как в последовательности SEQ ID NO: 1); или

(ii) в случае, когда С-концевое удлинение присутствует: VTVSSX(n) (SEQ ID NO: 58), например VTVSSA (SEQ ID NO: 59).

В этих С-концевых последовательностях X и n являются такими, как определено в настоящем документе для С-концевых удлинений.

Некоторые предпочтительные, но не ограничивающие примеры CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению приведены в SEQ ID NO: 9-43 и 60, и каждая из этих последовательностей образует еще один аспект по изобретению (как и белки, связывающие вещества CTLA4, полипептиды или другие соединения или конструкции, которые содержат одну из этих последовательностей). Среди них CTLA4-связывающие вещества SEQ ID NO: 9-25 и 60 не имеют С-концевое удлинение, и CTLA4-связывающие вещества SEQ ID NO: 26-43 содержат С-концевой аланин (который является предпочтительным, но не является ограничивающим примером С-концевого удлинения, как описано в настоящем документе).

Примеры CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 40, 41, 42, 43 и 60.

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одинарный переменный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), имеющему

CDR1 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность FYGMG (SEQ ID NO: 2); и

CDR2 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность DIRTSAGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 3); и

CDR3 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность EPSGISGWDY (SEQ ID NO: 4); и имеющему

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1; условная композиционная оценочная матричная коррекция); и/или не больше чем 7, например, не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" (как определено в настоящем документе, и не учитывая любую из вышеуказанных мутаций в положении (положениях) 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (в которых указанные аминокислотные различия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR); и необязательно имеющему

С-концевое удлинение (X)_n, где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например 1); и каждый X представляет собой независимо выбранный (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, который предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I); где в аминокислотной последовательности CTLA4-связывающего вещества:

аминокислотный остаток в положении 1 предпочтительно выбран из E или D;

аминокислотный остаток в положении 11 предпочтительно выбран из L или V;

аминокислотный остаток в положении 14 предпочтительно выбран из A или R;

аминокислотный остаток в положении 45 предпочтительно выбран из Q или R;

аминокислотный остаток в положении 74 предпочтительно выбран из A или S;

аминокислотный остаток в положении 83 предпочтительно выбран из K или R;

аминокислотный остаток в положении 89 предпочтительно соответствующим образом выбран из T,

V или L;

аминокислотный остаток в положении 96 предпочтительно выбран из M или P;

аминокислотный остаток в положении 108 предпочтительно выбран из Q или L;

аминокислотный остаток в положении 110 предпочтительно соответствующим образом выбран из

T, K или Q; и/или

аминокислотный остаток в положении 112 предпочтительно соответствующим образом выбран из

S, K или Q;

так, что, например, верно одно или несколько из следующих условий:

(i) положение 1 соответствует E или D;

(ii) положение 11 соответствует V;

(iii) положение 14 соответствует P;

(iv) положение 45 соответствует R;

(v) положение 74 соответствует S;

(vi) положение 83 соответствует R;

(vii) положение 89 соответствует T или L;

(viii) положение 96 соответствует P;

(ix) положение 108 соответствует L и/или

например, где CTLA4-связывающее вещество содержит одну или несколько из следующих множеств мутаций

a) положение 11 соответствует V, и положение 110 соответствует K или Q;

b) положение 11 соответствует V, и положение 112 соответствует K или Q.

c) положение 89 соответствует L, и положение 11 соответствует V;

d) положение 89 соответствует L, и положение 110 соответствует K или Q;

e) положение 89 соответствует L, и положение 112 соответствует K или Q;

f) положение 89 соответствует L, и положение 11 соответствует V, и положение 110 соответствует

K или Q;

g) положение 89 соответствует L, и положение 11 соответствует V, и положение 112 соответствует

K или Q;

n) положение 1 соответствует E или D; положение 11 соответствует V; положение 14 соответствует P; положение 45 соответствует R; положение 74 соответствует S; положение 83 соответствует R; положение 89 соответствует L; положение 96 соответствует P; и положение 108 соответствует L;

i) положение 1 соответствует E или D; положение 11 соответствует V; положение 14 соответствует P; положение 45 соответствует R; положение 74 соответствует S; положение 83 соответствует R; положение 89 соответствует L; положение 96 соответствует P; положение 108 соответствует L; и положение 110 соответствует K или Q;

j) положение 1 соответствует E или D; положение 11 соответствует V; положение 14 соответствует P; положение 45 соответствует R; положение 74 соответствует S; положение 83 соответствует R; положение 89 соответствует L; положение 96 соответствует P; положение 108 соответствует L; и положение 112 соответствует K или Q;

k) положение 1 соответствует E или D; положение 11 соответствует V; положение 14 соответствует P; положение 45 соответствует R; положение 74 соответствует S; положение 83 соответствует R; положение 89 соответствует L; положение 96 соответствует P; и положение 108 соответствует L.

В дополнительном аспекте изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одинарный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), имеющему

CDR1 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность FYGMG (SEQ ID NO: 2); и

CDR2 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность DIRTSAGRITYYADSVKG (SEQ ID NO: 3); и

CDR3 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность EPSGISGWDY (SEQ ID NO: 4); и имеющему

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1; условная композиционная оценочная матричная коррекция); и/или

не больше чем 7, например, не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например только 3,

2 или 1, "аминокислотных различий" (как определено в настоящем документе, и не учитывая любое выше перечисленных мутаций в положении (положениях) 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (в которых указанные аминокислотные различия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR);

и необязательно имеющему

С-концевое удлинение (X)_n, где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой независимо выбранный (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, и который предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

причем CTLA4-связывающее вещество (например, одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело) содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков (т.е. мутации по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

1D или 1E;

11V;

14P;

45R;

74S;

83R;

89T или 89L;

96P или

108L;

например, где CTLA4-связывающее вещество содержит одну или несколько из следующих множеств мутаций:

1D или 1E в комбинации с 11V; 14P; 45R; 74S; 83R; 89L; 96P и 108L;

11V в комбинации с 110K или 110Q;

11V в комбинации с 112K или 112Q;

89L в комбинации с 11V;

89L в комбинации с 110K или 110Q;

89L в комбинации с 112K или 112Q;

1D или 1E в комбинации с 11V; 14P; 45R; 74S; 83R; 89L; 96P; 108L и 110K или 110Q;

1D или 1E в комбинации с 11V; 14P; 45R; 74S; 83R; 89L; 96P; 108L и 112K или 112Q;

89L в комбинации с 11V и 110K или 110Q или

89L в комбинации с 11V и 112K или 112Q;

Как указано выше, в случае, когда CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению используется в одновалентном формате и/или где CTLA4-связывающий фрагмент присутствует в С-концевой области CTLA4-связывающего вещества по изобретению (как определено в настоящем документе), CTLA4-связывающее вещество предпочтительно имеет С-концевое удлинение X(n), причем С-концевое удлинение может быть таким, как описано в настоящем документе для CTLA4-связывающих веществ по изобретению и/или как описано в WO 2012/175741 или PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325).

Некоторые предпочтительные, но не ограничивающие примеры CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению приведены в SEQ ID NO: 8-43 или 60, и каждая из этих аминокислотных последовательностей индивидуально образует дополнительный аспект по изобретению.

Как указано выше, в настоящем изобретении, аминокислотные последовательности, в которых положение 89 соответствует Т; или в которых положение 1 соответствует Е или D, положение 11 соответствует V, положение 14 соответствует Р, положение 45 соответствует R, положение 74 соответствует S, положение 83 соответствует R, положение 89 соответствует L, положение 96 соответствует Р, и положение 108 соответствует L; или в которых положение 11 соответствует V, и положение 89 соответствует L (необязательно в подходящей комбинации с 110K или 110Q мутацией и/или 112K или 112Q мутацией, и в частности в комбинации с 110K или 110Q мутацией) являются особенно предпочтительными. Еще более предпочтительными являются аминокислотные последовательности, в которых положение 11 соответствует V, и положение 89 соответствует L, необязательно с 110K или 110Q мутацией.

Таким образом, в одном предпочтительном аспекте изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), имеющему

CDR1 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность FYGMG (SEQ ID NO: 2); и

CDR2 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную

последовательность DIRTSAGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 3); и

CDR3 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность EPSGISGWDY (SEQ ID NO: 4);

и имеющему

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1; условная композиционная оценочная матричная коррекция); и/или

не больше чем 7, например, не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" (как определено в настоящем документе, и не учитывая любую из вышеуказанных мутаций в положении (положениях) 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (в которых указанные аминокислотные различия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR); и необязательно имеющему

С-концевое удлинение (X)_n, где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой независимо выбранный (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, и который предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

где в аминокислотной последовательности CTLA4-связывающего вещества:

аминокислотный остаток в положении 1 предпочтительно выбран из E или D;

аминокислотный остаток в положении 11 предпочтительно выбран из L или V;

аминокислотный остаток в положении 14 предпочтительно выбран из A или P;

аминокислотный остаток в положении 45 предпочтительно выбран из Q или R;

аминокислотный остаток в положении 74 предпочтительно выбран из A или S;

аминокислотный остаток в положении 83 предпочтительно выбран из K или R;

аминокислотный остаток в положении 89 предпочтительно выбран из T, L или V;

аминокислотный остаток в положении 96 предпочтительно выбран из M или P;

аминокислотный остаток в положении 108 предпочтительно выбран из L или Q;

аминокислотный остаток в положении 110 предпочтительно соответствующим образом выбран из T, K или Q (и предпочтительным является T); и/или

аминокислотный остаток в положении 112 предпочтительно соответствующим образом выбран из S, K или Q (и предпочтительным является S).

В другом предпочтительном аспекте, изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одинарный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), имеющему

CDR1 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность FYGMG (SEQ ID NO: 2); и

CDR2 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность DIRTSAGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 3); и

CDR3 (в соответствии с системой нумерации Kabat), который представляет собой аминокислотную последовательность EPSGISGWDY (SEQ ID NO: 4);

и имеющему

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1; условная композиционная оценочная матричная коррекция); и/или

не больше чем 7, например, не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" (как определено в настоящем документе, и не учитывая любую из

перечисленных выше мутаций в положении (положениях) 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (в которых указанные аминокислотные различия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR);

и необязательно имеющему

С-концевое удлинение (X)_n, где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например 1); и каждый X представляет собой независимо выбранный (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, и который предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

в котором, например, CTLA4-связывающее вещество содержит одну или несколько мутаций в соответствии со следующим:

аминокислотный остаток в положении 1 соответствует E или D;

аминокислотный остаток в положении 11 соответствует V;

аминокислотный остаток в положении 14 соответствует P;

аминокислотный остаток в положении 45 соответствует R;

аминокислотный остаток в положении 74 соответствует S;

аминокислотный остаток в положении 83 соответствует R;

аминокислотный остаток в положении 89 соответствует L;

аминокислотный остаток в положении 96 соответствует P;

аминокислотный остаток в положении 108 соответствует L;

аминокислотный остаток в положении 110 предпочтительно выбран из T, K или Q; или

аминокислотный остаток в положении 112 предпочтительно выбран из S, K или Q.

В одном конкретном, но не ограничивающем аспекте CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат одну или несколько из следующих множеств мутаций (т.е. мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

11V в комбинации с 89L;

11V в комбинации с 110K или 110Q;

11V в комбинации с 112K или 112Q;

11V в комбинации с 89L и 110K или 110Q;

11V в комбинации с 89L и 112K или 112Q;

11V в комбинации с 1D или 1E, 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P, 108L и 110K или 110Q;

11V в комбинации с 1D или 1E, 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P, 108L и 112K или 112Q; или

11V в комбинации с 1D или 1E, 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P и 108L.

и имеют CDR, которые присутствуют в CTLA4-связывающем веществе, представленном в табл. А, например, в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с системой нумерации Kabat) и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые описаны в настоящем документе.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат одну или несколько из следующих множеств мутаций (т.е. мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

89L в комбинации с 11V;

89L в комбинации с 110K или 110Q;

89L в комбинации с 112K или 112Q;

89L в комбинации с 11V и 110K или 110Q;

89L в комбинации с 11V и 112K или 112Q;

89L в комбинации с 1D или 1E, 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 96P и 108L;

89L в комбинации с 1D или 1E, 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 96P, 108L и 110R или 110Q или

89L в комбинации с 1D или 1E, 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 96P, 108L и 112K или 112Q,

и имеют CDR, которые находятся в CTLA4-связывающем веществе, представленном в табл. А, например, в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с системой нумерации Kabat) и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте, CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат одну или несколько из следующего аминокислотного множества мутаций (т.е. мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

110K или 110Q в комбинации с 11V;

110K или 110Q в комбинации с 89L;

110K или 110Q в комбинации с 11V и 89L;

110R или 110Q в комбинации с 1D или 1E, 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P и 108L, и имеют CDR, которые находятся в CTLA4-связывающем веществе, представленном в табл. А, например, в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с системой нумерации Kabat), и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат одну или несколько из следующих множеств мутаций (т.е. мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

112K или 112Q в комбинации с 11V;

112K или 112Q в комбинации с 89L; или

112K или 112Q в комбинации с 11V и 89L; или

112K или 112Q в комбинации с 1D или 1E, 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P и 108L,

и имеют CDR, которые находятся в CTLA4-связывающем веществе, представленным в табл. А, например, в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с системой нумерации Kabat), и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат T в положении 89 и имеют CDR, например, которые описаны в SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с системой нумерации Kabat), и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат V в положении 11 и L в положении 89, и имеют CDR, например, которые описаны в SEQ ID NO: 1 или 60 (например, в соответствии с системой нумерации Kabat), и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

Как указано выше, CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению, в соответствии с вышеуказанными аспектами, предпочтительно дополнительно содержат подходящую комбинацию мутации E1D, мутации L11V, мутации A14P, мутации Q45R, мутации A74S, мутации K83R, мутации V89L, мутации M96P и мутации Q108L, и в одном из вариантов осуществления изобретения подходящую комбинацию Q108L с любой другой мутацией A14P, Q45R, A74S и K83R, и в одном из вариантов осуществления изобретения в комбинации с любыми двумя из этих других мутаций, более предпочтительно с любыми тремя из этих мутаций (например, с комбинацией A14P, A7S и K83R), например со всеми четырьмя этими мутациями (и в этом случае, когда CTLA4-связывающее вещество является одновалентным или присутствует в N-концевой области CTLA4-связывающего вещества по изобретению, предпочтительно также E1D мутация).

В другом аспекте изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одинарный переменный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), имеющему

CDR1 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность GGTF SFYGMG (SEQ ID NO: 5); и

CDR2 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность DIRTSAGRTY (SEQ ID NO: 6); и

CDR3 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность EPSGISGWDY (SEQ ID NO: 4);

и имеющему

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое C-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1; условная композиционная оценочная матричная коррекция); и/или

не больше чем 7, например, не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" (как определено в настоящем документе, и не учитывая любую из вышеуказанных мутаций в положениях (положениях) 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое C-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (в которых указанные аминокислотные различия,

если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR);

и необязательно имеющему

C-концевое удлинение (X)_n, где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой независимо выбранный (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, и который предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

содержащему аминокислотную последовательность, где

аминокислотный остаток в положении 1 соответствует E или D;

аминокислотный остаток в положении 11 соответствует L или V;

аминокислотный остаток в положении 14 соответствует P;

аминокислотный остаток в положении 45 соответствует R;

аминокислотный остаток в положении 74 соответствует S;

аминокислотный остаток в положении 83 соответствует R;

аминокислотный остаток в положении 89 предпочтительно выбран из T, V или L;

аминокислотный остаток в положении 96 соответствует P;

аминокислотный остаток в положении 108 соответствует L;

аминокислотный остаток в положении 110 предпочтительно выбран из T, K или Q и

аминокислотный остаток в положении 112 предпочтительно выбран из S, K или Q;

например, таким образом, что верно одно или несколько из следующих условий:

(i) положение 1 соответствует D или E;

(ii) положение 11 соответствует V;

(iii) положение 14 соответствует P;

(iv) положение 45 соответствует R;

(v) положение 74 соответствует S;

(vi) положение 83 соответствует R;

(vii) положение 89 соответствует L или T;

(viii) положение 96 соответствует P или

(ix) положение 108 соответствует L,

например, где CTLA4-связывающее вещество содержит одну или несколько из следующих множеств мутаций:

a) положение 11 соответствует V, и положение 110 соответствует K или Q;

b) положение 11 соответствует V, и положение 112 соответствует K или Q;

c) положение 89 соответствует L, и положение 11 соответствует V;

d) положение 89 соответствует L, и положение 110 соответствует K или Q;

e) положение 89 соответствует L, и положение 112 соответствует K или Q;

f) положение 89 соответствует L, и положение 11 соответствует V, и положение 110 соответствует K или Q или

g) положение 89 соответствует L, и положение 11 соответствует V, и положение 112 соответствует K или Q.

В дополнительном аспекте изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одинарный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), имеющему

CDR1 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность GGTFSFYGMG (SEQ ID NO: 5); и

CDR2 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность DIRTSAGRTY (SEQ ID NO: 6); и

CDR3 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность EPSGISGWDY (SEQ ID NO: 4);

и имеющему

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое C-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1; условная композиционная оценочная матричная коррекция); и/или

не больше чем 7, например, не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" (как определено в настоящем документе, и не учитывая любую из

вышеуказанных мутаций в положении (положениях) 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (в которых указанные аминокислотные различия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR);

и необязательно имеющему

С-концевое удлинение $(X)_n$, где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой независимо выбранный (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, и который предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

причем CTLA4-связывающее вещество (например, одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело) содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков (т.е. мутации по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

1D или 1E;

11V;

14P;

45R;

74S;

83R;

89L или 89T;

96P или

108L;

например, где CTLA4-связывающее вещество содержит одну или несколько из следующих множеств мутаций:

11V в комбинации с 110K или 110Q;

11V в комбинации с 112K или 112Q;

89L в комбинации с 11V;

89L в комбинации с 110K или 110Q;

89L в комбинации с 112K или 112Q;

89L в комбинации с 11V и 110K или 110Q или

89L в комбинации с 11V и 112K или 112Q.

Как указано выше, в случае, когда CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению используется в одновалентном формате и/или, где CTLA4-связывающий фрагмент присутствует в С-концовой области CTLA4-связывающего вещества по изобретению (как определено в настоящем документе), CTLA4-связывающее вещество предпочтительно имеет С-концевое удлинение $X(n)$, причем С-концевое удлинение может быть таким, как описано в настоящем документе для CTLA4-связывающих веществ по изобретению и/или как описано в WO 2012/175741 или PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325).

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению, приведены в SEQ ID NO: 8-43 и 60, и каждая из этих аминокислотных последовательностей индивидуально образует дополнительный аспект изобретения.

Как указано выше, в настоящем изобретении, аминокислотные последовательности, в которых положение 89 соответствует Т; или в которых положение 1 соответствует Е или D, положение 11 соответствует V, положение 14 соответствует Р, положение 45 соответствует R, положение 74 соответствует S, положение 83 соответствует R, положение 89 соответствует L, положение 96 соответствует Р или положение 108 соответствует L; или в которых положение 11 соответствует V, и положение 89 соответствует L (необязательно в подходящей комбинации с 110K или 110Q мутацией и/или 112K или 112Q мутацией, и, в частности, в комбинации с 110K или 110Q мутацией), являются особенно предпочтительными. Еще более предпочтительными являются аминокислотные последовательности, в которых положение 11 соответствует V, и положение 89 соответствует L, необязательно с 110K или 110Q мутацией.

Таким образом, в одном предпочтительном аспекте, изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), имеющему

CDR1 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность GGTFSFYGMG (SEQ ID NO: 5); и

CDR2 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность DIRTSAGRTY (SEQ ID NO: 6); и

CDR3 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность EPSGISWDY (SEQ ID NO: 4);

и имеющему

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1,

составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1; условная композиционная оценочная матричная коррекция); и/или

не больше чем 7, например, не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" (как определено в настоящем документе, и не учитывая любую из вышеуказанных мутаций в положении (положениях) 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (в которых указанные аминокислотные различия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR);

и необязательно имеющему

С-концевое удлинение (X)_n, где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой независимо выбранный (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, и который предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

содержащему аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько мутаций (относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1) в соответствии со следующим:

аминокислотный остаток в положении 1 предпочтительно выбран из E и D;

аминокислотный остаток в положении 11 предпочтительно выбран из L и V;

аминокислотный остаток в положении 14 предпочтительно выбран из A и R;

аминокислотный остаток в положении 45 предпочтительно выбран из Q и R;

аминокислотный остаток в положении 74 предпочтительно выбран из A и S;

аминокислотный остаток в положении 83 предпочтительно выбран из K и R;

аминокислотный остаток в положении 89 предпочтительно выбран из T, L и V;

аминокислотный остаток в положении 96 предпочтительно выбран из M или P;

аминокислотный остаток в положении 108 предпочтительно выбран из L или Q;

аминокислотный остаток в положении 110 предпочтительно выбран из T, K или Q (и предпочтительным является T); и

аминокислотный остаток в положении 112 предпочтительно выбран из S, K или Q (и в предпочтительно S).

В другом предпочтительном аспекте, изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одинарный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), имеющему

CDR1 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность GGTF SFYGMG (SEQ ID NO: 5); и

CDR2 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность DIRTSAGRTY (SEQ ID NO: 6); и

CDR3 (в соответствии с Abm), который представляет собой аминокислотную последовательность EPSGISGWDY (SEQ ID NO: 4);

и имеющему

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, составляющую по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, прогнозируемый предел: 10; длина сегмента: 3; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; матрица BLOSUM 62; цена делеции: открытие 11, продолжение 1; условная композиционная оценочная матричная коррекция); и/или

не больше чем 7, например, не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например, только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" (как определено в настоящем документе, и не учитывая любую из вышеуказанных мутаций в положениях (положениях) 1, 11, 14, 45, 74, 83, 89, 96, 108, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (в которых указанные аминокислотные различия,

если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR);

и необязательно имеющему

S-концевое удлинение (X)_n, где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой независимо выбранный (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, и который предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

в котором CTLA4-связывающее вещество содержит одну или несколько из следующих мутаций:

аминокислотный остаток в положении 1 соответствует D или E;

аминокислотный остаток в положении 11 соответствует V;

аминокислотный остаток в положении 14 соответствует P;

аминокислотный остаток в положении 45 соответствует R;

аминокислотный остаток в положении 74 соответствует S;

аминокислотный остаток в положении 83 соответствует R;

аминокислотный остаток в положении 89 соответствует L;

аминокислотный остаток в положении 96 соответствует P;

аминокислотный остаток в положении 108 соответствует L;

аминокислотный остаток в положении 110 предпочтительно соответствующим образом выбран из T, K или Q или

аминокислотный остаток в положении 112 предпочтительно соответствующим образом выбран из S, K или Q.

В одном конкретном, но не ограничивающем аспекте CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат одну или несколько из следующих множеств мутаций (т.е. мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

11V в комбинации с 89L;

11V в комбинации с 1D, 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P, 108L;

11V в комбинации с 1E, 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P, 108L;

11V в комбинации с 110K или 110Q;

11V в комбинации с 110K или 110Q и 1D или 1E и 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P и 108L;

11V в комбинации с 112K или 112Q;

11V в комбинации с 112K или 112Q и 1D или 1E и 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P и 108L;

11V в комбинации с 89L и 110K или 110Q или

11V в комбинации с 89L и 112K или 112Q,

и имеют CDR, которые находятся в CTLA4-связывающем веществе, представленным в табл. А, например, в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с Abm) и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте, CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат следующие множества мутаций (т.е. мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

89L в комбинации с 11V;

89L в комбинации с 1D или 1E, 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 96P и 108L;

89L в комбинации с 110K или 110Q;

89L в комбинации с 110K или 110Q и 1D или 1E и 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 96P и 108L;

89L в комбинации с 112K или 112Q;

89L в комбинации с 112K или 112Q и 1D или 1E и 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 96P и 108L;

89L в комбинации с 11V и 110K или 110Q; или

89L в комбинации с 11V и 112K или 112Q;

и имеют CDR, которые находятся в CTLA4-связывающем веществе, представленном в табл. А, например, в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с Abm) и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте, CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат следующие множества мутаций (т.е. мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

110K или 110Q в комбинации с 11V;

110K или 110Q в комбинации с 89L;

110K или 110Q в комбинации с 11V и 89L или

110K или 110Q в комбинации с 1D или 1E и 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P и 108L,

и имеют CDR, которые находятся в CTLA4-связывающем веществе, представленном в табл. А, например, в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с Abm), и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат следующие множества мутаций (т.е. мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1) в указанных положениях (нумерация в соответствии с системой нумерации Kabat):

112K или 112Q в комбинации с 11V;

112K или 112Q в комбинации с 89L;

112K или 112Q в комбинации с 11V и 89L или

112K или 112Q в комбинации с 1D или 1E и 11V, 14P, 45R, 74S, 83R, 89L, 96P и 108L,

и имеют CDR, которые находятся в CTLA4-связывающем веществе, представленным в табл. А, например, в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с Abm), и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат T в положении 89 и имеют CDR, например, которые описаны в SEQ ID NO: 1 или 60 (например, в соответствии с Abm), и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению содержат V в положении 11 и L в положении 89, и имеют CDR, например, которые описаны в SEQ ID NO: 60 (например, в соответствии с Abm), и имеют общую степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, которые являются такими, как описано в настоящем документе.

Как указано выше, CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению в соответствии с вышеприведенными аспектами предпочтительно являются такими, что они содержат подходящую комбинацию необязательной мутации E1D, мутации L11V, мутации A14P, мутации Q45R, мутации A74S, мутации K83R, мутации V89L, мутации M96P и мутации Q108L, и предпочтительно подходящую комбинацию Q108L с любой одной из других мутаций A14P, Q45R, A74S и K83R, и предпочтительно в комбинации с любыми двумя из этих других мутаций, более предпочтительно с любыми тремя из этих мутаций (например, с комбинацией A14P, A74S и K83R), например со всеми этими мутациями (и в этом случае, когда CTLA4-связывающее вещество является моновалентным или присутствует в N-концевой области CTLA4-связывающего вещества по изобретению, предпочтительно также E1D мутация). В одном из вариантов осуществления изобретения, CTLA4-связывающие по настоящему изобретению содержат мутации E1D (или не имеют такую мутацию, где остаток 1 представляет собой E), L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте, изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одинарный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), которое в основном состоит из или представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из одной из следующих аминокислотных последовательностей: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 60.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте, изобретение относится к CTLA4-связывающему веществу (например, одинарный вариабельный домен иммуноглобулина, такой как нанотело), которое в основном состоит из или представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из одной из следующих аминокислотных последовательностей: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 60.

Также, как уже указано в настоящем документе, аминокислотные остатки CTLA связывающего вещества нумеруются в соответствии с общей нумерацией для VH, приведенной Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91), применительно к VHH доменам семейства верблюдовых, в статье Riechmann и Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2):185-195; или указанной в настоящем документе. Следует отметить, что, как хорошо известно в области, относящейся к доменам VH и доменам VHH, общее количество аминокислотных остатков в каждом из CDR может изменяться и может не соответствовать общему количеству аминокислотных остатков, обозначенных в соответствии с нумерацией по Kabat (т.е. одна или несколько

позиций в соответствии с нумерацией по Kabat могут не быть заняты в действительной последовательности или действительная последовательность может содержать больше аминокислотных остатков, чем количество, допустимое по Kabat). Это означает, что обычно нумерация по Kabat может соответствовать или не соответствовать фактической нумерации аминокислотных остатков в действительной последовательности.

Альтернативные способы нумерации аминокислотных остатков доменов V_H, которые также могут применяться аналогичным образом к V_HH-доменам верблюдовых и к нанотелам, представляют собой способы, описываемые Chothia et al. (Nature 342, 877-883 (1989)), так называемое "AbM определение" и так называемое "контактное определение". Однако в настоящем описании, аспектах и фигурах, нумерация в соответствии с системой Kabat, применительно к доменам V_HH, описанным Riechmann и Muyldermans, будет соблюдаться, если не указано иное.

Изобретение также относится к CТLА4-связывающим веществам (например, ISVD, такие как нанотело); к способам экспрессии/продуцирования CТLА4-связывающих веществ по изобретению; к композициям и продуктам (например, фармацевтическим композициям и продуктам), которые содержат CТLА4-связывающие вещества по изобретению; к полинуклеотидам, которые кодируют CТLА4-связывающие вещества по изобретению; и к применениям (и, в частности, к терапевтическим, профилактическим и диагностическим применениям) CТLА4-связывающих веществ по изобретению.

Эти и другие аспекты, варианты осуществления, преимущества, применения и использования по изобретению станут понятны из дальнейшего описания настоящего документа.

Соответственно, в дополнительном аспекте изобретение относится к полипептидам или другим химическим структурным единицам, которые содержат или по существу состоят по крайней мере из одного (например, одного, двух или трех) CТLА4-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Сами эти молекулы могут называться как "CТLА4-связывающие вещества" или "соединения по изобретению" или "полипептиды по изобретению".

CТLА4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению могут содержать одну или несколько других аминокислотных последовательностей, химических структурных единиц или фрагментов. Эти другие аминокислотные последовательности, химические структурные единицы или фрагменты могут придавать одно или несколько желаемых свойств получаемым CТLА4-связывающим веществам по изобретению и/или могут изменить свойства получаемых CТLА4-связывающих веществ по изобретению желаемым образом, например, для получения готовых CТLА4-связывающих веществ по изобретению с желаемой биологической и/или терапевтической активностью (например, для получения готовых CТLА4-связывающих веществ по изобретению с аффинностью и предпочтительно активностью в отношении другой терапевтически релевантной мишени с тем, чтобы получаемый полипептид стал "биспецифичным" в отношении CТLА4 и другой терапевтически релевантной мишени, такой как, например, PD1, LAG-3, BTLA и/или CD27), чтобы обеспечить желаемый период полувыведения и/или чтобы иным образом модифицировать или улучшить фармакокинетические и/или фармакодинамические свойства для нацеливания CТLА4-связывающего вещества на определенные клетки, ткани или органы (включая клетки злокачественной опухоли и ткани злокачественной опухоли), чтобы обеспечить цитотоксический эффект и/или служить в качестве обнаруживаемой метки или маркера. Некоторые неограничивающие примеры других таких аминокислотных последовательностей, химических структурных единиц или фрагментов представляют собой:

один или несколько подходящих линкеров (например, линкер 9GS, 15GS или 35GS (любая комбинация из 9, 15 или 35 G и S аминокислот, таких как, например, GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG)) (SEQ ID NO: 65). В одном из вариантов осуществления изобретения, линкер представляет собой (GGGG)_n (SEQ ID NO: 118), где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и/или

один или несколько связывающих фрагментов, связывающих доменов или связывающих единиц, которые направлены против терапевтически релевантной мишени, другой, чем CТLА4 (т.е., чтобы получить CТLА4-связывающее вещество по изобретению, которое является биспецифичным как для CТLА4, так и для другой терапевтически релевантной мишени, такой как другой эпитоп CТLА4, PD1, CD27, LAG3, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2, CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17, TSLP); и/или

один или несколько связывающих доменов или связывающих единиц, которые обеспечивают увеличение периода полувыведения (например, связывающий домен или связывающая единица, которая может связываться с сывороточным белком, таким как сывороточный альбумин); и/или

один или несколько связывающих фрагментов, связывающих доменов или связывающих единиц, которые нацеливают CТLА4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) на желаемую клетку, ткань или орган (например, клетку злокачественной опухоли); и/или

один или несколько связывающих фрагментов, связывающих доменов или связывающих единиц, которые обеспечивают повышенную специфичность в отношении CТLА4 (обычно они смогут связы-

ваться с CTLA4, но, как правило, сами по себе по существу не будут функциональными в отношении CTLA4); и/или

связывающий фрагмент, связывающий домен, связывающую единицу или другую химическую структурную единицу, которая позволяет CTLA4-связывающему веществу интернализироваться в (желаемую) клетку (например, интернализирующее анти-EGFR нанотело, описанное в WO 2005/044858); и/или

фрагмент, который повышает период полувыведения, такой как подходящая полиэтиленгликолевая группа (т.е. пегилирование) или аминокислотная последовательность, которая обеспечивает повышенный период полувыведения, например, сывороточный альбумин человека или его подходящий фрагмент (например, альбуминовое слияние) или, например, пептид, связывающий сывороточный альбумин, как описано в WO 2008/068280; и/или

нагрузку, например цитотоксическую нагрузку; и/или

детектируемый маркер или метку, например радиоактивную или флуоресцентный маркер; и/или

метку, которая может содействовать иммобилизации, детекции и/или очистке PD1/CTLA4-связывающего вещества, например гистидиновая метка или FLAG3-Маркер; и/или

метку, которая может быть функционализирована, например С-концевая GGC или GGGC метка; и/или

С-концевое удлинение X(n), которое может быть таким, как подробно в настоящем документе для CTLA4-связывающих веществ по изобретению, и/или как описано в WO 2012/175741 или в PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело), которые также содержат одну или несколько частей или фрагментов (предпочтительно человека) стандартного антитела (например, его Fc-часть или функциональный фрагмент или один или несколько константных доменов) и/или антитела семейства верблюдовых только с тяжелыми цепями (например, один или несколько константных доменов), являются частью настоящего изобретения.

Мультиспецифичные связывающие вещества.

Настоящее изобретение включает CTLA4-связывающие вещества, которые могут быть слиты в одну многовалентную (например, мультиспецифичную) молекулу, которая также связывается с CTLA4 или с другим полипептидом, и, в одном из вариантов осуществления изобретения, такие связывающие вещества связываются с одним или несколькими экстендерами периода полувыведения, что увеличивает период полувыведения связывающих веществ в организме субъекта (например, содержащих аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62 или 64. В одном из вариантов осуществления изобретения экстендер периода полувыведения представляет собой ISVD (например, нанотело), который специфически связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA), например ALB11002. В варианте осуществления изобретения мультиспецифическое связывающее вещество представляет собой F023700912 или F023700914, как описано в настоящем документе.

Полипептид может "сливаться с" другой молекулой либо непосредственно, без линкера, либо через линкер, такой как пептидный линкер, например, 35GS.

Мультиспецифичные связывающие вещества могут включать CTLA4-связывающее вещество, а также один или несколько связывающих веществ, которые связываются с дополнительным антигеном, таким как CD27, PD1, LAG3, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2, CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17 или TSLP.

Для некоторых конкретных, но не ограничивающих примеров таких биологических препаратов на основе ISVD или на основе нанотела сделана ссылка на различные заявки Ablynx NV, такие как, например, и без ограничений, WO 2004/062551, WO 2006/122825, WO 2008/020079 и WO 2009/068627, а также, например, и без ограничений, на заявки, такие как WO 2006/038027, WO 2006/059108, WO 2007/063308, WO 2007/063311, WO 2007/066016 и WO 2007/085814. Кроме того, как подробно описано в настоящем документе, дополнительный фрагмент, который может быть частью молекулы, описанной в вышеуказанных заявках, может представлять собой ISVD или нанотело, как описано в настоящем документе, направленное против (человеческого) сывороточного белка, такого как (человеческий) сывороточный альбумин, и такой ISVD или нанотело (например, ALB11002) также может найти терапевтическое применение, в частности, в и/или для увеличения периода полувыведения CTLA4-связывающих веществ (и содержащих их полипептидов), которые описаны в настоящем документе. Ссылка, например, сделана на WO 2004/041865, WO 2006/122787 и WO 2012/175400, которые в целом описывают применение нанотел, связывающихся с сывороточным альбумином, для увеличения периода полувыведения. WO 2009/138519 (или в известном уровне техники, указанном в WO 2009/138519) или WO 2008/020079 (или в известном уровне техники, указанном в WO 2008/020079) включены в качестве ссылки. Кроме того, если методика или способ конкретно не описан в настоящем документе, методика или способ может в одном из вариантов осуществления изобретения быть выполнен так, как описано в WO 2009/138519 (или в известном уровне техники, указанном в WO 2009/138519) или WO 2008/020079 (или в известном уровне техники,

указанном в WO 2008/020079).

В случае, когда CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) содержат один или несколько дополнительных связывающих фрагментов, связывающих доменов или связывающих единиц (например, дополнительный по существу нефункциональный связывающий домен или связывающая единица против CTLA4, которая обеспечивает повышенную специфичность против CTLA4, связывающий фрагмент, связывающий домен или связывающая единица против терапевтической цели, отличной от CTLA4, связывающий фрагмент, связывающий домен или связывающая единица против цели, такой как человеческий сывороточный альбумин, который обеспечивает увеличенный период полувыведения, и/или связывающий фрагмент, связывающий домен или связывающая единица, которая нацеливает CTLA4-связывающее вещество на специфическую клетку, ткань или орган, и/или которая позволяет CTLA4-связывающему веществу интернализироваться в клетку), эти другие связывающие фрагменты, связывающие домены или связывающие единицы предпочтительно содержат один или несколько ISVD и, более предпочтительно, все ISVD. Например, и без ограничений, этот один или несколько дополнительных связывающих доменов или связывающих единиц могут представлять одно или несколько нанотел (включая VHH, гуманизированный VHH и/или VH верблюжьего типа, например, человеческие VH верблюжьего типа), (однодоменное) антитело, которое является VH доменом или является производным VH домена, dAb, которое является VH доменом или в основном состоит из VH домена, или которое является производным VH домена, или даже (одно-) доменное антитело или dAb, которое является VL доменом или в основном состоит из VL домена. В частности, это одно или несколько связывающих доменов или связывающих единиц в случае, когда присутствует, могут содержать один или несколько нанотел, в частности все нанотела.

В случае, когда CTLA4-связывающее вещество по изобретению имеет ISVD в своей С-концевой области (С-концевой ISVD, который может быть CTLA4-связывающим фрагментом, описанным в настоящем документе, или может быть, например, если присутствует в CTLA4-связывающем веществе, дополнительным по существу нефункциональным ISVD против CTLA4, который обеспечивает повышенную специфичность против CTLA4, ISVD против терапевтической цели, отличной от CTLA4, ISVD против цели, такой как сывороточный альбумин человека, который обеспечивает увеличение периода полувыведения, или ISVD, который нацеливает CTLA4-связывающее вещество на специфическую клетку, ткань или орган и/или который позволяет CTLA4-связывающему веществу интернализироваться в клетку), то CTLA4-связывающий фрагмент (т.е. С-концевой ISVD) предпочтительно имеет С-концевое удлинение X(n), причем С-концевое удлинение может быть таким, как описано в настоящем документе для CTLA4-связывающего вещества по изобретению и/или как описано в WO 2012/175741 или PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325).

В случае, когда CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) содержит, помимо одного или нескольких CTLA4-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, любые дополнительные ISVD (причем один или несколько дополнительных ISVD могут, как указано выше, быть также по существу нефункциональными ISVD против CTLA4, которые обеспечивают повышенную специфичность против CTLA4, ISVD против терапевтической цели, отличной от CTLA4, ISVD против цели, такой как сывороточный альбумин человека, который обеспечивает повышенный период полувыведения, и/или ISVD, который нацеливает CTLA4-связывающее вещество на специфическую клетку, ткань или орган и/или, который позволяет CTLA4-связывающему веществу интернализироваться в клетку), и где такие дополнительные ISVD представляют собой нанотела или ISVD, которые по существу состоят из и/или которые получены из последовательностей VH, то в соответствии с предпочтительным аспектом по изобретению один или несколько (и предпочтительно все) дополнительные ISVD, присутствующие в CTLA4-связывающем веществе, будут содержать в своей последовательности одну или несколько каркасных мутаций, которые ослабляют связывание естественными антителами. В частности, в соответствии с этим аспектом по изобретению, такие дополнительные ISVD могут содержать (подходящую комбинацию) аминокислотные остатки/мутации в положениях 11, 89, 110 и/или 112, которые являются такими, как описано в PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325), и/или которые по существу являются такими, как описано в настоящем документе для CTLA4-связывающих веществ по изобретению. В одном конкретном аспекте в случае, когда CTLA4-связывающее вещество имеет такой ISVD в своей С-концевой области (т.е. не содержит CTLA4-связывающий фрагмент по изобретению в своей С-концевой области), то по крайней мере указанный ISVD, который присутствует в С-концевой области и/или образует С-концевую область, имеет такие каркасные мутации, которые уменьшают связывание естественными антителами (и указанный С-концевой ISVD будет предпочтительно также иметь С-концевое удлинение X(n), как описано в настоящем документе).

Как указано выше, в случае, когда CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) должно иметь увеличенный период полувыведения (т.е. по сравнению с моновалентным CTLA4-связывающим веществом по изобретению), CTLA4-связывающее вещество предпочтительно содержит по крайней мере один (например, один) ISVD (и, в частности, нанотело), который обеспечивает такой увеличенный период полувыведения. Такой ISVD обычно будет направлен против соответствующего сывороточного белка, такого как трансферрин и, в частности, против (человеческого) сывороточного

альбумина. В частности, такой ISVD или нанотело может представлять собой (одно-) доменное антитело или dAb против сывороточного альбумина человека, как описано, например, в EP 2139918, WO 2011/006915, WO 2012/175400, WO 2014/111550, и может, в частности, представлять собой нанотело, связывающееся с сывороточным альбумином, как описано в WO 2004/041865, WO 2006/122787, WO 2012/175400 или PCT/EP2015/060643 (WO 02015/173325). Особенно предпочтительный ISVD, связывающийся с сывороточным альбумином, представляют собой нанотело Alb-1 (См. WO 2006/122787) или его гуманизированные варианты, такие как Alb-8 (WO 2006/122787, SEQ ID NO: 62), Alb-23 (WO 2012/175400, SEQ ID NO: 1), и другие гуманизированные (и предпочтительно также оптимизированные по последовательности) варианты Alb-1 и/или варианты Alb-8 или Alb-23 (или в более широком смысле ISVD, которые имеют по существу такие же CDR, как Alb-1, Alb-8 и Alb-23).

В одном из вариантов развития, ISVD (например, нанотело) представляет собой ALB11002, который связывается с сывороточным альбумином человека. ALB11002 приведен в табл. С.

Настоящее изобретение включает CTLA4-связывающие вещества, содержащие HSA-связывающее вещество по изобретению, например, имеющее аналогичную комбинацию CDR (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3), которые присутствуют в ALB11002 или в связывающем веществе, содержащем последовательность SEQ ID NO: 66. См. табл. С.

Таблица С
Вещество, связывающееся с сывороточным альбумином человека (HSA)
ALB11002

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|----------|---|
| 66 | ALB11002 | EVQLVESGGG XVQPGNSLRL SCAASGFTFS <u>SFGMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSGSDTLY</u> <u>ADSVKGRFTI SRDNAKTTLY LQMNSLRPED</u> TAXYYCTIGG <u>SLSRSSQGT</u> L VTVSSA; где X на остатках 11 и 93 соответствуют L или V; например, EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGF TFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS |
| 67 | CDR1 | GFTFSSFGMS или SFGMS (аминокислоты 6-10 в SEQ ID NO: 67) |
| 68 | CDR2 | SISGSGSDTLYADSVKG или SISGSGSDTL (аминокислоты 1-10 в SEQ ID NO: 68) |
| 69 | CDR3 | GGSLSR |

Необязательно, ALB11002 не содержит С-концевой аланин. В одном из вариантов осуществления изобретения HSA-связывающее вещество содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, но включающую мутацию в положении 1, 1, 89, 110 или 112, например, содержащую множество мутаций, приведенных в табл. С в настоящем документе.

Остаток 1 в SEQ ID NO: 66 может соответствовать D или E. Если остаток 1 соответствует D, HSA-связывающее вещество может быть обозначено как 1D, и, если остаток 1 соответствует E, HSA-связывающее вещество может быть обозначено как 1E.

Настоящее изобретение включает HSA-связывающие вещества, содержащие один, два или три CDR HSA-связывающего вещества, где каждый содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, например консервативных замен, и/или содержит 100, 99, 98, 97, 96 или 95%-ную идентичность относительно CDR, которые находятся в последовательностях HSA-связывающих веществ, приведенных в табл. С или указанных в SEQ ID NO: 67-69, где HSA связывающее вещество, имеющее такие CDR, сохраняет способность связываться с HSA.

В одном из вариантов осуществления изобретения экстендер периода полувыведения представляет собой анти-HSA ISVD (например, нанотело), содержащий:

CDR1, который содержит аминокислотную последовательность GFTFSSFGMS (SEQ ID NO: 67); и

CDR2, который содержит аминокислотную последовательность SISGSGSDTL (SEQ ID NO: 68); и

CDR3, который содержит аминокислотную последовательность GGSLSR (SEQ ID NO: 69);

и, необязательно, имеющий:

степень идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66 (в которой любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также CDR не учитываются

при определении степени идентичности последовательностей) составляет по крайней мере 85%, предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 95% (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в положениях 1, 11, 89, 110 и/или 112, предусмотренных конкретным рассматриваемым аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или

не больше чем 7, например, не больше чем 5, предпочтительно не больше чем 3, например, только 3, 2 или 1, "аминокислотных различий" (как определено в настоящем документе, и не учитывая любую из вышеуказанных мутаций в положении(положениях) 1, 11, 89, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66 (в которой указанные аминокислотные различия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасах и/или CDR, но предпочтительно присутствуют только в каркасах, а не в CDR);

и необязательно имеющему

С-концевое удлинение (X)_n, в котором n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно 1 или 2, например, 1); и

каждый X представляет собой независимо выбранный (предпочтительно природный) аминокислотный остаток, и который предпочтительно независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I).

Кроме того, как указано выше, такой ISVD, связывающийся с сывороточным альбумином, в случае, если присутствует, может содержать в своей последовательности одну или несколько каркасных мутаций, которые ослабляют связывание естественными антителами. В частности, в случае, когда такой ISVD, связывающийся с сывороточным альбумином, представляет собой нанотело или (одно-) доменное антитело, которое представляет собой, в основном состоит из и/или является производным домена VH, ISVD, связывающийся с сывороточным альбумином, может содержать (соответствующую комбинацию) аминокислотные остатки/мутации в положениях 11, 89, 110 и/или 112, которые являются такими, как описано в PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325), и/или которые по существу являются такими, как описано в настоящем документе для CTLA4-связывающих веществ по изобретению. Например, в PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325) описано некоторое количество вариантов Alb-1, Alb-8 и Alb-23, которые содержат аминокислотные остатки/мутации в положениях 11, 89, 110 и/или 112, которые ослабляют связывание естественными антителами, которые могут быть использованы в CTLA4-связывающих веществ по изобретению.

Кроме того, в случае, когда такой ISVD, связывающийся с сывороточным альбумином, присутствует в С-концовой области CTLA4-связывающего вещества (например, ISVD, такого как нанотело) по изобретению, ISVD, связывающийся с сывороточным альбумином (и в итоге CTLA4-связывающее вещество по изобретению), предпочтительно имеет С-концевое удлинение X(n), причем С-концевое удлинение может быть таким, как описано в настоящем документе для CTLA4-связывающего вещества по изобретению и/или как описано в WO 2012/175741 или PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325). Он также предпочтительно имеет мутации, которые ослабляют связывание естественных антител, такие как (подходящая комбинация) аминокислотные остатки/мутации в положениях 11, 89, 110 и/или 112, описанных в PCT/EP2015/060643 (WO 2015/173325).

Однако, как указано выше, другие средства увеличения периода полувыведения CTLA4-связывающего вещества по изобретению (например, пегилирование, слияние с альбумином человека или его подходящим фрагментом или использование подходящего пептида, связывающего сывороточный альбумин) также включены в объем по изобретению.

Как правило, в случае, когда CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению увеличивало период полувыведения (например, ввиду присутствия ISVD, увеличивающего период полувыведения, или путем любого другого подходящего способа увеличения периода полувыведения), полученное в результате CTLA4-связывающее вещество предпочтительно имеет период полувыведения (как определено в настоящем документе), который по крайней мере в 2 раза, предпочтительно по крайней мере в 5 раз, например по крайней мере в 10 раз или больше чем в 20 раз, больше, чем период полувыведения моновалентного CTLA4-связывающего вещества по изобретению (что определено у человека и/или на подходящей модели животного, такого как мышь или яванский макак). В частности, CTLA4-связывающее вещество по изобретению предпочтительно имеет период полувыведения (как определено в настоящем документе) у человека по крайней мере 1 день, предпочтительно по крайней мере 3 дня, более предпочтительно по крайней мере 7 дней, например по крайней мере 10 дней.

Из настоящего описания будет ясно, что CTLA4-связывающее вещество по изобретению (например, основанное на одном или нескольких ISVD, таких как нанотела) может иметь разные "форматы", т.е. по существу быть моновалентными, двухвалентными или трехвалентными, может быть моноспецифичным, биспецифичным, триспецифичным и т.д., и может быть бипаратописским (как определено в настоящем документе и, например, в WO 2009/068625). Например, CTLA4-связывающее вещество по изобретению может быть

(по существу) моновалентным, т.е. (по существу) содержащим отдельный CTLA4-связывающий

фрагмент по изобретению. Как указано выше, в случае использования в одновалентном формате CTLA4-связывающее вещество по изобретению предпочтительно имеет С-концевое удлинение X(n), как подробно описано в настоящем документе. Такое CTLA4-связывающее вещество по изобретению может также иметь увеличенный период полувыведения;

(по существу) двухвалентным или трехвалентным и моноспецифическим. Такое CTLA4-связывающее вещество по изобретению будет содержать два или больше связывающих фрагментов (например, ISVD) против CTLA4, которые могут быть одинаковыми или разными, и в случае, когда они разные, могут быть направлены против одного и того же эпитопа на CTLA4 или против разных эпитопов на CTLA4 (в последнем случае, чтобы обеспечить бипаратописческое или мультипаратописческое CTLA4-связывающее вещество по изобретению). Такое CTLA4-связывающее вещество по изобретению может также иметь увеличенный период полувыведения;

(по существу) двухвалентным, трехвалентным (или поливалентным) и биспецифичным или триспецифичным (или мультиспецифичным). Такое CTLA4-связывающее вещество по изобретению будет направлено против CTLA4 и по крайней мере другой цели. Как описано в настоящем документе, указанной другой мишенью может быть, например, другая терапевтически релевантная мишень (т.е. отличная от CTLA4), такая как, например, PD1, LAG3, BTLA и/или CD27, с возможностью получить CTLA4-связывающее вещество, которое является биспецифичным в отношении CTLA4 и другой терапевтической мишени. Указанная другая мишень может также быть мишенью, которая предусматривает увеличение периода полувыведения (например, человеческий сывороточный альбумин), с возможностью получить CTLA4-связывающее вещество по изобретению, которое имеет увеличенный период полувыведения. Как было указано в настоящем документе, такая другая мишень может также обеспечить нацеливание CTLA4-связывающего вещества по изобретению на конкретные клетки, ткани или органы или может позволить CTLA4-связывающему веществу по изобретению интернализироваться в клетку. Также можно комбинировать эти подходы/ISVD, например, для обеспечения CTLA4-связывающего вещества по изобретению, которое является биспецифичным в отношении CTLA4 и в отношении по крайней мере другой терапевтически релевантной мишени и которое имеет увеличенный период полувыведения.

Кроме того, предпочтительно в случае, когда эти CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению содержат один или несколько связывающих фрагментов (например, ISVD), отличных по крайней мере от одного CTLA4-связывающего вещества по изобретению, по крайней мере один и предпочтительно все эти другие ISVD будут содержать в своей последовательности одну или несколько каркасных мутаций, которые ослабляют связывание естественными антителами (например, в частности, комбинацию аминокислотных остатков/мутаций в положениях 11, 89, 110 и/или 112, которая является такой, как описано в настоящем документе для CTLA4-связывающих веществ по изобретению и/или как в общем описано в РСТ/ЕР2015/060643 (WO 2015/173325)). Кроме того, когда такое CTLA4-связывающее вещество по изобретению имеет CTLA4-связывающий фрагмент в своей С-концевой области, то указанный С-концевой CTLA4-связывающий фрагмент (и, в итоге, CTLA4-связывающее вещество по изобретению) предпочтительно будет иметь С-концевое удлинение X(n), как описано в настоящем документе. Аналогично, когда такое CTLA4-связывающее вещество по изобретению имеет другой ISVD в своей С-концевой области (т.е. не связывающий CTLA4 фрагмент по изобретению, а, например, ISVD, увеличивающий период полувыведения), тогда указанный С-концевой ISVD (и как результат, CTLA4-связывающее вещество по изобретению) предпочтительно будет иметь С-концевое удлинение X(n), как описано в настоящем документе, и/или будет содержать в своей последовательности одну или несколько каркасных мутаций, которые ослабляют связывание естественными антителами (как и в предыдущем случае, что подробно описано в настоящем документе и в РСТ/ЕР2015/060643 (WO 2015/173325)).

Как будет ясно квалифицированному специалисту, в случае, когда CTLA4-связывающее вещество по изобретению (например, ISVD, такой как нанотело) предназначено для местного применения (т.е. к коже или глазам) или, например, имеет (локализованное) терапевтическое действие где-либо, например в желудочно-кишечном тракте (т.е. после перорального введения или введения посредством суппозиториев) или в легких (т.е. после введения путем ингаляции или иным образом предназначено для непосредственного применения к пред полагаемому месту его действия (например, путем прямой инъекции), CTLA4-связывающее вещество по изобретению обычно не нуждается в увеличении периода полувыведения. Кроме того, для лечения определенных острых состояний или показаний может быть предпочтительным отсутствие пролонгированного периода полувыведения. В этих случаях предпочтительным является применение одновалентного CTLA4-связывающего вещества по изобретению или CTLA4-связывающего вещества по изобретению (содержащего CTLA4-связывающий фрагмент по изобретению) без увеличения периода полувыведения (например, CTLA4-связывающее вещество по изобретению, которое является бивалентным или бипаратописческим в отношении CTLA4).

Некоторые предпочтительные, но не ограничивающие примеры такого CTLA4-связывающего вещества (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению схематически представлены в табл. С-1 ниже, и каждый из них образует дополнительный аспект по изобретению. Другие примеры подходящих CTLA4-связывающих веществ по изобретению без увеличения периода полувыведения будут понятны

квалифицированному специалисту с помощью настоящего описания.

Таблица С-1

Схематическое изображение некоторых CTLA4-связывающих веществ по изобретению без ISVD, увеличивающего период полувыведения

| |
|---|
| [CTLA4-связывающий фрагмент] |
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-X(n) |
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4-связывающий фрагмент] |
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-X(n) |
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-[другой] |
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-[другой]-X(n) |
| [другой]-[CTLA4-связывающий фрагмент] |
| [другой]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-X(n) |
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-[Нацеливающая единица] |
| [Нацеливающая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент] |
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-[Нацеливающая единица]-X(n) |
| [Нацеливающая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-X(n) |
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[Нацеливающая единица] |
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[Нацеливающая единица]-X(n) |
| [Нацеливающая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4-связывающий фрагмент] |
| [Нацеливающая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-X(n) |

Условные обозначения:

"[CTLA4-связывающий фрагмент]" обозначает CTLA4-связывающий домен или единицу (например, ISVD, такое как нанотело), например 11F01 (E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L).

"-" обозначает либо прямое ковалентное соединение, либо подходящий линкер, такой как линкер 9GS, 15GS или 35GS

"X(n)" обозначает С-концевое удлинение, как определено в настоящем документе, такой как один аланиновый остаток.

"[другой]" обозначает связывающий домен или связывающую единицу (например, ISVD, такое как нанотело) против CTLA4, другую, чем CTLA4-связывающий фрагмент, или против другого антигена, такого как PD1, LAG3, CD27 и/или BTLA.

"[Нацеливающая единица]" обозначает связывающий домен или связывающую единицу (например, ISVD, такое как нанотело), который нацеливает CTLA4-связывающее вещество по изобретению на специфическую клетку, ткань или орган.

Как будет ясно квалифицированному специалисту, в случае, когда CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению предназначено для системного введения и/или для профилактики и/или лечения хронического заболевания или расстройства, обычно будет предпочтительно, чтобы указанное CTLA4-связывающее вещество по изобретению имело увеличенный период полувыведения (как определено в настоящем документе). Более предпочтительно такое CTLA4-связывающее вещество по изобретению будет содержать ISVD, увеличивающий период полувыведения, такой как предпочтительно ISVD и, в частности, нанотело, связывающееся с сывороточным альбумином человека (как описано в настоящем документе).

Некоторые предпочтительные, но не ограничивающие примеры таких CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, такие как нанотело) по изобретению схематически представлены в табл. С-2 ниже, и каждый из них образует дополнительный аспект изобретения. Другие примеры подходящего CTLA4-связывающего вещества по изобретению с удлинением периода полувыведения будут понятны квалифицированному специалисту с помощью настоящего описания. Обычно для CTLA4-связывающего вещества по изобретению с увеличенным периодом полувыведения очень предпочтительным является присутствие С-концевого удлинения.

Схематическое изображение некоторых СТЛА4-связывающих веществ
по изобретению с ISVD, увеличивающим период полувыведения

| |
|--|
| [СТЛА4-связывающий фрагмент] - [НЛЕ] |
| [НЛЕ] - [СТЛА4-связывающий фрагмент] |
| [СТЛА4-связывающий фрагмент] - [НЛЕ] - X(n) |
| [НЛЕ] - [СТЛА4-связывающий фрагмент] - X(n) |
| [СТЛА4-связывающий фрагмент] - [СТЛА4-связывающий фрагмент] - [НЛЕ] |
| [СТЛА4-связывающий фрагмент] - [НЛЕ] - [СТЛА4-связывающий фрагмент] |
| [НЛЕ] - [СТЛА4-связывающий фрагмент] - [СТЛА4-связывающий фрагмент] |
| [СТЛА4-связывающий фрагмент] - [СТЛА4-связывающий фрагмент] - [НЛЕ] - X(n) |
| [СТЛА4-связывающий фрагмент] - [НЛЕ] - [СТЛА4-связывающий фрагмент] - X(n) |

| |
|---|
| [CTLA4-связывающий фрагмент]-[HLE]-[CTLA4-связывающий фрагмент]- [Нацеливавшая единица]-X(n) |
| [HLE]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4-связывающий фрагмент]- [Нацеливавшая единица]-X(n) |
| [Нацеливавшая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4- связывающий фрагмент]-[HLE] |
| [Нацеливавшая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[HLE]-[CTLA4- связывающий фрагмент] |
| [Нацеливавшая единица]-[HLE]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4- связывающий фрагмент] |
| [HLE]-[Нацеливавшая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4- связывающий фрагмент] |
| [Нацеливавшая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4- связывающий фрагмент]-[HLE]-X(n) |
| [Нацеливавшая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[HLE]-[CTLA4- связывающий фрагмент]-X(n) |
| [Нацеливавшая единица]-[HLE]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4- связывающий фрагмент]-X(n) |
| [HLE]-[Нацеливавшая единица]-[CTLA4-связывающий фрагмент]-[CTLA4- связывающий фрагмент]-X(n) |

Условные обозначения:

"[CTLA4-связывающий фрагмент]" представляет CTLA4-связывающую единицу или домен (например, ISVD, такое как нанотело), например 11F01 (E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L).

"-" представляет либо прямое ковалентное соединение, либо подходящий линкер, такой как линкер 9GS, 15GS или 35GS

"X(n)" представляет С-концевое удлинение, как определено в настоящем документе, например, один аланиновый остаток.

"[RLE]" представляет связывающий домен или связывающую единицу, увеличивающую период полувыведения (и, в частности, ISVD, увеличивающий период полувыведения), такой как ISVD (и, в частности, нанотело), против (человеческого) сывороточного альбумина, например ALB11002.

"[Другой]" представляет связывающий домен или связывающую единицу (и, в частности, ISVD, такой как нанотело) против CTLA4, другой, чем "CTLA4-связывающий фрагмент", или против другого антигена, такого как PD1, LAG3, CD27 и/или BTLA.

"[Нацеливавшая единица]" представляет связывающий домен или связывающую единицу (и, в частности, ISVD, такой как нанотело), который нацеливает CTLA4-связывающее вещество на специфическую клетку, ткань или орган.

Настоящее изобретение также относится к CTLA4 ISVD, F023700912, содержащему аминокислотную последовательность:

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYCGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTY
 YADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLTVTVSSGGGG
 SGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYC
 MGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTALYYCA
 AEPGSGISGWDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVES
 GGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR
 RDNKNTVYVYLMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSRSGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO: 62,
 35GS, линкеры подчеркнуты пунктирной линией, CDR подчеркнуты
 и/или выделены жирным шрифтом).

Необязательно, при необходимости, первый остаток любого связывающего вещества фрагмента в молекуле замещен D или E.

Необязательно, CTLA4 ISVD содержит сигнальный пептид, такой как:

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST

NNGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLEKR (SEQ ID NO: 70)

F023700912 может кодироваться полинуклеотидом, содержащим следующие нуклеотиды:

038179

gacgtgcaat tggaggagtc tgggggagga gtgggtgcagc cggggggctc
 tctgagactc 60
 tctctgtgcag cctctgggtg caccttcagt ttctatggca tgggctggtt
 ccgccaggct 120
 ccaggaaggg agcgcgagtt tgtagcagat attagaacca gtgctggtag
 gacatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acagcaagaa
 cacggtgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg ccctgaggac acggccctgt attactgtgc
 agcagagcca 300
 agtgaataaa gtggttgga ctactggggc caggggacc cgggtcacggt
 ctctccgga 360
 ggcggtgggt caggtggcgg aggcagcggg ggaggaggta gtggcgggtg
 cggtagtggg 420
 ggtggaggca gcggaggcgg aggcagtggg ggcggtggat ccgaggtgca
 gttggtggag 480
 tctgggggag gagggtgca gccggggggc tctctgagac tctcctgtgc
 agcctctgtt 540
 ggcaccttca gtttctatgg catgggctgg ttccgccagg ctccagggaa
 ggagcgcgag 600
 tttgtagcag atattagaac cagtgtgtgt aggcatact atgcagactc
 cgtgaagggc 660
 cgattcacca tctccagaga caacagcaag aacacggtgt atctgcaaat
 gaacagcctg 720
 cgccctgagg acacggccct gtattactgt gcagcagagc caagtggaat
 aagtggttgg 780
 gactactggg gccaggggac cctgggtcacg gtctcgagcg gaggcgggtg
 gtcaggtggc 840
 ggaggcagcg gtggaggagg tagtggcggg ggcggttagtg ggggtggagg
 cagcggaggc 900
 ggaggcagtg gggcgggtg ctcagaggta caactagtgg agtctggagg
 tggcgttgtg 960
 caaccgggta acagtctgcg ccttagctgc gcagcgtctg gctttacctt
 cagctccttt 1020
 ggcatgagct gggttcgcca ggctccggga aaaggactgg aatgggtttc
 gtctattagc 1080
 ggcagtggtg gcgatacgct ctacgcggac tccgtgaagg gccgtttcac
 catctcccgc 1140
 gataacgcca aaactacact gtatctgcaa atgaatagcc tgcgtcctga
 agatacggcc 1200
 ctgtattact gtactattgg tggctcgta agccgttctt cacagggtag
 cctggtcacc 1260
 gtctcctcag cg 1272

(SEQ ID NO: 61; необязательно lacking the signal
 последовательность of nucleotides 1-255)

F023700912 содержит следующие фрагменты:

CTLA4-связывающее вещество 11F01 (E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L),
 35 GS линкер,

CTLA4-связывающее вещество 11F01 (L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L),
 35 GS линкер,

Вещество, связывающееся с сывороточным альбумином человека ALB11002;

Аланин С-концевого удлинения.

Например:

CTLA4-связывающее вещество SEQ ID NO: 60,

35GS линкер SEQ ID NO: 65,

CTLA4-связывающее вещество SEQ ID NO: 60 (D1E),

35GS линкер SEQ ID NO: 65,

Вещество, связывающееся с сывороточным альбумином человека SEQ ID NO: 66.

Аланин (настоящее изобретение включает любое связывающее вещество, включающее такое положение фрагментов).

Настоящее изобретение также относится к CTLA4 ISVD, F023700914, содержащему аминокислотную последовательность:

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GGTFSFYCMGW**FRQAPGKEREFVAD**DIRTSAGRTY**
YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAEPSGISGWDYWGOGTLTVSSGGGG
SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFG
MSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCT
IGGSLRSRSGTLTVVSSA (SEQ ID NO: 64; 35GS линкер подчеркнут
пунктирной линией; CDR подчеркнуты и/или выделены жирным
шрифтом) .

Необязательно, при необходимости, первый остаток любого связывающего вещества фрагмента в молекуле заменяется на D или E.

Необязательно, CTLA4 ISVD содержит сигнальный пептид, такой как:

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST

NNGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLEKR (SEQ ID NO: 70)

F023700914 может кодироваться полинуклеотидом, содержащим следующие нуклеотиды:

| | | | | |
|----------------|------------|------------|------------|-------------|
| gacgtgcaat | tggtggagtc | tgggggagga | gtggtgcagc | cggggggctc |
| tctgagactc 60 | | | | |
| tcctgtgcag | cctctggtgg | caccttcagt | ttctatggca | tggtcaggtt |
| ccgccaggct 120 | | | | |
| ccaggaagg | agcgcgagtt | tgtagcagat | attagaacca | gtgctggtag |
| gacatactat 180 | | | | |
| gcagactccg | tgaagggccg | atccaccatc | tccagagaca | acagcaagaa |
| cacggtgtat 240 | | | | |
| ctgcaaatga | acagcctgcg | ccctgaggac | acggccctgt | attactgtgc |
| agcagagcca 300 | | | | |
| agtggaataa | gtggttgga | ctactggggc | caggggaccc | tggtcacggt |
| ctcctccgga 360 | | | | |
| ggcgtgggt | caggtggcgg | aggcagcgg | ggaggaggt | gtggcggtgg |
| cggtagtggg 420 | | | | |
| ggtgaggca | gcggaggcgg | aggcagtggt | ggcgtggat | ccgaggtgca |
| ggtggtggag 480 | | | | |
| tctgagggtg | gcgttgca | accgggtaac | agtctgcgcc | ttagctgcgc |
| agcgtctggc 540 | | | | |
| tttaccttca | gctccttg | catgagctgg | gttcgccagg | ctccgggaaa |
| aggactggaa 600 | | | | |
| tggtttcgt | ctattagcgg | cagtggtagc | gatacgctct | acgcgactc |
| cgtgaagggc 660 | | | | |
| cgtttcacca | tctcccgcga | taacgccaaa | actacactgt | atctgcaaat |
| gaatagcctg 720 | | | | |
| cgtcctgaag | atacggccct | gtattactgt | actattggtg | gctcggttaag |
| ccgttcttca 780 | | | | |
| caggtacc | tggtcaccgt | ctcctcagcg | | 810 |

(SEQ ID NO: 63; необязательно не содержит сигнальную последовательность нуклеотидов 1-255)

F023700912 содержит следующие фрагменты:

CTLA4-связывающее вещество 11F01 (E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L);
35 GS линкер;

вещество, связывающееся с сывороточным альбумином человека ALB11002;

C-концевое удлинение аланин.

Например:

CTLA4-связывающее вещество SEQ ID NO: 60,

35GS линкер SEQ ID NO: 65,

вещество, связывающееся с сывороточным альбумином человека SEQ ID NO: 66.

Аланин (настоящее изобретение включает любое связывающее вещество, включающее такое расположение фрагментов).

Настоящее изобретение включает любое мультиспецифичное CTLA4-связывающее вещество, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 или 64 или аминокислотную последовательность, имеющую 80% или больше (например, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичность аминокислотных последовательностей, где CTLA4-связывающее вещество сохраняет способность связываться с CTLA4 и, необязательно, HSA.

Связывание с эпитопом и перекрестное конкурирование.

Настоящее изобретение относится к CTLA4-связывающим веществам, представленным в настоящем документе (например, F023700912 или F023700914), а также связывающим веществам, например, содержащим CTLA4 ISVD (например, нанотела), которые связываются с тем же CTLA4 эпитопом таких связывающих веществ. Например, настоящее изобретение включает связывающие вещества, которые связываются с CTLA4 человека путем контактирования с теми же остатками, что и F023700912 или F023700914. Например, настоящее изобретение относится к связывающим веществам, которые связываются с CTLA4 человека на остатках VRVTVL (остатки 33-38 в SEQ ID NO: 110), ADSQVTEVC (остатки 41-49 в SEQ ID NO: 110) и/или CKVELMYPPYYLG (остатки 93-106 в SEQ ID NO: 190), например на всех трех участках, CTLA4 человека. В одном из вариантов осуществления изобретения связывающее вещество демонстрирует связывание с CTLA4 человека на этих остатках в исследовании водород-дейтериевого обмена, например, защищает остатки от обмена водорода на дейтерий в присутствии дейтерия, такого как D₂O, например, как показано на тепловой карте связывания, по существу, как представлено на фиг. 13.

Настоящее изобретение включает CTLA4-связывающее вещество (например, F023700912 или F023700914 или 11F01 или любой из его вариантов, представленных в настоящем документе), которое связано с полипептидом, который содержит пептидные последовательности VRVTVL (остатки 33-38 SEQ ID NO: 110), ADSQVTEVC (остатки 41-49 SEQ ID NO: 110) и/или CKVELMYPPYYLG (остатки 93-106 SEQ ID NO: 110), например, CTLA4. Необязательно, полипептид находится на поверхности клетки, например T-клетки, и полипептид связан CTLA4-связывающим веществом.

Настоящее изобретение также относится к перекрестно-конкурирующим связывающим веществам, которые способны перекрестно конкурировать за связывание с любым из описанных в настоящем документе связывающих веществ (например, F023700912 или F023700914). Такие перекрестно-конкурирующие связывающие вещества могут представлять собой любую молекулу, которая демонстрирует такое перекрестное конкурирование, например ISVD, антитело, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В общем случае связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который "перекрестно конкурирует" с эталонным связывающим веществом, относится к связывающему веществу (например, ISVD, такой как нанотело) или антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который блокирует связывание эталонного связывающего вещества с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или больше, и, наоборот, эталонное связывающее вещество блокирует связывание связывающего вещества (например, ISVD, такого как нанотело) или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или больше. Перекрестное блокирование может определяться с использованием любого анализа, известного в данной области, включая поверхностно-плазмонный резонанс (SPR), ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) и проточную цитометрию.

В одном из вариантов осуществления изобретения перекрестное блокирование определяется применением анализа Вiasoge. Для удобства ссылка делается на два связывающих вещества, тем не менее объем настоящего изобретения включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, например фрагменты Fab, которые перекрестно блокируют связывающее вещество по настоящему изобретению. Оборудование Вiasoge (например, Вiasoge 3000) работает в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Таким образом, в одном из анализов перекрестного конкурирования CTLA4 соединяют с чипом CM5 Вiasoge, используя стандартные реакции конъюгации аминов для получения поверхности с CTLA4 покрытием. Например, 200-800 резонансных единиц CTLA4 могут связываться с чипом (или любое количество, которое обеспечивает легко измеряемые уровни связывания, но которое является легко насыщенным концентрациями используемого аналитического реагента).

Два связывающих вещества (называемых А* и В*), оцениваемые по их способности перекрестно блокировать друг друга, смешивают при молярном отношении участков связывания один к одному в подходящем буфере для образования аналитической смеси.

Концентрация каждого связывающего вещества в аналитической смеси должна быть достаточно высокой для быстрого насыщения участков связывания для этого связывающего вещества на молекулах СТЛА4, захваченных на чипе Вiasoge. Связывающие вещества в смеси находятся при одной и той же молярной концентрации.

Также подготавливаются отдельные растворы, содержащие только связывающее вещество А* и только связывающее вещество В*. Связывающее вещество А* и связывающее вещество В* в этих растворах должны быть в аналогичном буфере и при аналогичной концентрации, как и в аналитической смеси.

Аналитическую смесь пропускают через чип Вiasoge с покрытием СТЛА4 и регистрируют общее количество связываний. Затем чип обрабатывают таким образом, чтобы удалить связанные связывающие вещества, не повреждая связанные с чипом СТЛА4. В одном из вариантов осуществления изобретения это выполняется путем обработки чипа 30 мМ НСl в течение 60 с.

Затем по поверхности с покрытием СТЛА4 пропускают раствор только связывающего вещества А* и регистрируют количество связываний. Чип повторно обрабатывают, чтобы полностью удалить связанное связывающее вещество, не повреждая связанные с чипом СТЛА4.

Потом по поверхности с покрытием СТЛА4 пропускают раствор только связывающего вещества В* и регистрируют количество связываний.

Затем вычисляют максимальное теоретическое связывание смеси связывающего вещества А* и связывающего вещества В* и сумму связывания каждого связывающего вещества в случае, когда пропускают только по поверхности СТЛА4. Если фактическое зарегистрированное связывание смеси меньше этого теоретического максимума, то два связывающих вещества перекрестно блокируют друг друга.

Таким образом, в общем случае перекрестно конкурирующее связывающее вещество согласно изобретению представляет собой соединение, которое будет связываться с СТЛА4 в вышеуказанном перекрестном конкурентном анализе Вiasoge, таким образом, что во время анализа и в присутствии второго связывающего вещества регистрируемое связывание происходит в диапазоне, например, от 80 до 0,1% (например, от 80 до 4%) от максимального теоретического связывания, например, от 75 до 0,1% (например, от 75 до 4%) от максимального теоретического связывания, например, от 70 до 0,1% (например, от 70 до 4%) от максимального теоретического связывания (как определено выше) двух связывающих веществ в комбинации.

В одном из вариантов осуществления изобретения анализ ELISA используется для определения того, СТЛА4-связывающее вещество перекрестно блокирует или способно перекрестно блокировать в соответствии с изобретением.

Общий принцип анализа заключается в том, что СТЛА4-связывающее вещество наносят на лунки ELISA-планшета. В раствор добавляют избыточное количество второго потенциально перекрестно-блокирующего СТЛА4-связывающего вещества (т.е. несвязанного с ELISA-планшетом). Затем в лунки добавляют ограниченное количество СТЛА4. Связывающее вещество с покрытием и связывающее вещество в растворе конкурируют за связывание с ограниченным количеством молекул СТЛА4. Для удаления СТЛА4, которые не связаны связывающим веществом с покрытием, планшет промывают, а также удаляют второе связывающее вещество в фазе раствора, а также любые комплексы, образованные между вторым связывающим веществом в фазе раствора и СТЛА4. Затем количество связанного СТЛА4 измеряют с использованием соответствующего реагента для обнаружения СТЛА4. Связывающее вещество в растворе, которое способно перекрестно блокировать связывающее вещество с покрытием, может привести к уменьшению количества молекул СТЛА4, с которыми связывающее вещество с покрытием может связываться относительно количества молекул СТЛА4, с которыми связывающее вещество с покрытием может связываться в отсутствие второго связывающего вещества в фазе раствора.

Способы экспрессии.

Настоящее изобретение включает рекомбинантные способы получения СТЛА4-связывающих веществ (например, ISVD, такой как нанотело) по настоящему изобретению (например, F023700912 или F023700914), включающие (i) введение полинуклеотида, кодирующего аминокислотную последовательность указанного СТЛА4-связывающего вещества, например, где полинуклеотид находится в векторе и/или функционально связан с промотором; (ii) культивирование клетки-хозяина (например, СНО или *Pichia* или *Pichia pastoris*) в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида; и (iii) необязательно выделение СТЛА4-связывающего вещества из клетки-хозяина и/или среды, в которой клетка-хозяин выращивается. См., например, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627.

Изобретение также относится к полинуклеотидам, которые кодируют СТЛА4-связывающие вещества (например, содержащие ISVD, например, нанотела), описанные в настоящем документе (например, F023700912 или F023700914). В одном из вариантов осуществления изобретения, полинуклеотиды могут быть функционально связаны с одной или несколькими контрольными последовательностями. Полинок-

леотид может быть в форме плазмиды или вектора. Кроме того, такие полинуклеотиды могут быть обычно такими, как описано в опубликованных патентных заявках Ablynx N.V, таких как, например, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627.

Изобретение также относится к хозяевам или клеткам-хозяевам, которые содержат такие полинуклеотиды, векторы и/или CTLA4-связывающие вещества, описанные в настоящем документе (например, F023700912 или F023700914). Кроме того, такие клетки-хозяева могут быть, как правило, такими, как описано в опубликованных патентных заявках Ablynx N.V., таких как, например, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627. Примеры конкретных клеток-хозяев рассмотрены ниже.

Эукариотические и прокариотические клетки-хозяева, включая клетки млекопитающих в качестве хозяев для экспрессии PD1/CTLA4-связывающих веществ (например, содержащих ISVD (например, нанотела), которые связываются с PD1 и CTLA4 (например, F023700910, F023700918, F023700920 или F023700925)), хорошо известны в данной области и включают многие иммортализованные линии клеток, доступные от Американской коллекции типовых культур (ATCC). К ним относятся, в числе прочих, овариальные клетки китайского хомячка (CHO), NS0, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки почек обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3, клетки НЕК-293 и ряд других клеточных линий. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяна, свиньи, козы, быка, лошади и хомяка. Особенно предпочтительные клеточные линии выбирают в зависимости от того, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых (например, *Spodoptera frugiperda* или *Trichoplusia ni*), клетки земноводных, бактериальные клетки, клетки растений и клетки грибов. Клетки грибов включают клетки дрожжевых и нитевидных грибов, включая, например, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*), *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluveromyces sp.*, *Kluveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* и *Neurospora crassa*. *Pichia sp.*, любые *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, любые *Kluveromyces sp.*, *Candida albicans*, любые *Aspergillus sp.*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, любые *Fusarium sp.*, *Yarrowia lipolytica* и *Neurospora crassa*. Настоящее изобретение включает любую клетку-хозяина (например, клетку CHO или клетку *Pichia*, например *Pichia pastoris*), содержащую CTLA4-связывающее вещество по настоящему изобретению (например, F023700912 или F023700914) или содержащую полинуклеотид, кодирующий такое связывающее вещество, или содержащую вектор, который содержит полинуклеотид.

Кроме того, экспрессия CTLA4-связывающего вещества (например, ISVD, такое как нанотело) из линий клеток-продуцентов может быть усовершенствована с использованием ряда известных методов. Например, система экспрессии гена глутаминсинтетазы (система GS) является общим способом усиления экспрессии в определенных условиях. Система GS рассматривается, в целом или частично, применительно к европейским патентам № 0216846, 0256055 и 0323997 и европейской патентной заявке № 89303964.4. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения клетки-хозяева млекопитающих (например, CHO) не содержат ген глутаминсинтетазы и выращиваются в отсутствие глутамин-на в среде, где, однако, полинуклеотид, кодирующий цепь иммуноглобулина, содержит ген глутаминсинтетазы, который восполняет дефицит гена в клетке-хозяине. Такие клетки-хозяева, содержащие связывающее вещество, или полинуклеотид, или вектор, как описано в настоящем документе, а также способы экспрессии, рассмотренные в настоящем документе, для получения связывающего вещества, использующего такую клетку-хозяина, являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к способам очистки CTLA4-связывающего вещества (например, ISVD, такой как нанотело), включающим введение образца (например, культуральной среды, клеточного лизата или фракции клеточного лизата, например растворимой фракции лизата), включающего CTLA4-связывающее вещество, в среду для очистки (например, катионообменная среда, анионообменная среда, гидрофобная обменная среда, среда для аффинной очистки (например, белок-А, белок-Г, белок-А/Г, белок-Л)), и либо сбор очищенного CTLA4-связывающего вещества из проточной фракции указанного образца, которое не связывается со средой; или удаление проточной фракции и элюирование связанного CTLA4-связывающего вещества из среды и сбор элюата. В одном из вариантов осуществления изобретения среда находится в колонке, в которую вводят образец. В одном из вариантов осуществления изобретения способ очистки осуществляют после рекомбинантной экспрессии антитела или фрагмента в клетке-хозяине, например, где клетка-хозяин сначала лизируется и, необязательно, лизат очищается от нерасстворимых веществ до очистки на среде или где CTLA4-связывающее вещество секретируется в культуральную среду клеткой-хозяином, а среду или ее фракцию наносят на среду для очистки.

В общем случае гликопротеины, продуцируемые в конкретной клеточной линии или трансгенном животном, будут иметь профиль гликозилирования, который характерен для гликопротеинов, продуци-

руемых в клеточной линии или трансгенном животном. Поэтому конкретный профиль гликозилирования CTLA4-связывающего вещества (например, ISVD, такой как нанотело) будет зависеть от конкретной клеточной линии или трансгенного животного, применяемого для продуцирования CTLA4-связывающего вещества. CTLA4-связывающие вещества, содержащие только нефукозилированные N-гликаны, являются частью настоящего изобретения и могут использоваться, поскольку, как было показано, нефукозилированные антитела проявляют большую эффективность, чем их фукозилированные аналоги как *in vitro*, так и *in vivo* (см., например, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278:3466-3473 (2003), патенты США №№ 6946292 и 7214775). Эти CTLA4-связывающие вещества с нефукозилированными N-гликанами, наиболее вероятно, не будут иммуногенными, поскольку их углеводные структуры являются нормальным компонентом популяции, которая существует в сывороточном IgG человека.

Настоящее изобретение включает CTLA4-связывающие вещества, содержащие N-связанные гликаны, которые обычно добавляют к иммуноглобулинам, продуцируемым клетками яичника китайского хомячка (CHO N-связанные гликаны) или к генетически сконструированным дрожжевым клеткам (генетически сконструированные дрожжевые N-связанные гликаны), таким как, например, Pichia pastoris. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения, CTLA4-связывающее вещество содержит один или несколько "генетически сконструированных дрожжевых N-связанных гликанов" или "CHO N-связанных гликанов", которые представлены на фиг. 4 (например, G0 и/или G0-F и/или G1 и/или G1-F и/или и/или G2-F и/или Man5). В одном из вариантов осуществления изобретения, связывающее вещество PD1/CTLA4 включает генетически сконструированные дрожжевые N-связанные гликаны, т.е. G0 и/или G1 и/или G2, необязательно, дополнительно включающие Man5. В одном из вариантов осуществления изобретения, CTLA4-связывающие вещества содержат CHO N-связанные гликаны, т.е. G0-F, G1-F и G2-F, необязательно, дополнительно включающие G0 и/или G1 и/или G2 и/или Man5. В одном из вариантов осуществления изобретения, от около 80% до около 95% (например, около 80-90%, около 85%, около 90% или около 95%) всех N-связанных гликанов на CTLA4-связывающих веществах представляют собой генетически сконструированные дрожжевые N-связанные гликаны или CHO N-связанные гликаны. См. Nett et al. Yeast. 28(3):237-252 (2011); Hamilton et al. Science. 313(5792):1441-1443 (2006); Hamilton et al. Curr Opin Biotechnol. 18(5):387-392 (2007). Например, в одном из вариантов осуществления изобретения, генетически сконструированная дрожжевая клетка представляет собой GFI5.0 или YGLY8316 или штаммы, указанные в патенте США № 7795002 или Zha et al. Methods Mol Biol. 988:31-43 (2013). См. также публикацию международной патентной заявки № WO2013/066765.

Комбинации.

В конкретных вариантах осуществления CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) по настоящему изобретению могут использоваться отдельно или совместно с другими дополнительными терапевтическими средствами и/или терапевтическими процедурами для лечения или профилактики любых заболеваний, таких как злокачественная опухоль, например, как описано в настоящем документе, у субъекта, нуждающегося в таком лечении или профилактике. Композиции или наборы, например фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель, содержащие такие связывающие вещества в сочетании с дополнительными терапевтическими средствами, также являются частью настоящего изобретения.

Термин "совместно с" означает, что компоненты, CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) по настоящему изобретению вместе с другим агентом, таким как пембролизумаб или ниволумаб, могут объединяться в составе одной композиции, например, для одновременной доставки или объединяться в составе отдельных, двух или больше, композиций (например, набор). Каждый компонент может вводиться субъекту в другой момент времени, чем когда вводится другой компонент; например каждое введение может осуществляться неодновременно (например, отдельно или последовательно) с интервалами за определенный период времени. Кроме того, отдельные компоненты могут вводиться субъекту аналогичным или другим способом (например, CTLA4-связывающее вещество по настоящему изобретению вводят парентерально, а паклитаксел вводят перорально).

В конкретных вариантах осуществления CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) могут использоваться совместно с противоопухолевым терапевтическим средством или иммуномодулирующим лекарственным средством, таким как иммуномодулирующий ингибитор рецепторов, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с рецептором.

В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такой как нанотело) находятся в ассоциации с одним или несколькими ингибиторами (например, небольшая органическая молекула или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), такими как ингибитор mTOR (мишень рапамицина в клетках млекопитающих), цитотоксический агент, препарат на основе платины, ингибитор BRAF, ингибитор CDK4/6, ингибитор EGFR, ингибитор VEGF, стабилизатор микротрубочек, таксан, ингибитор CD20, ингибитор CD52, ингибитор CD30, ингибитор RANK (активатор рецептора ядерного фактора каппа-B), ингибитор RANKL (лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа-B), ингибитор ERK, ингибитор MAP-киназы, ингибитор AKT, ингибитор MEK, ингибитор PI3K, ингибитор HER1, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор Bcl2, ингибитор

CD22, ингибитор CD79b, ингибитор EгB2 или ингибитор фарнезил-протеинтрансферазы.

В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) сочетается с одним или несколькими из следующих веществ: анти-CTLA4 антитела или их антигенсвязывающие домены (например, ипилимумаб), анти-PD1 антитело или его антигенсвязывающий домен (например, пембролизумаб, ниволюмаб, CT-011), анти-PDL1, анти-CTLA4, анти-TIM3, анти-CS1, (например, элотузумаб), анти-KIR2DL1/2/3 (например, лирилумаб), анти-CD27, анти-CD137 (например, урелумаб), анти-GITR (например, TRX518), анти-PD-L1 (например, BMS-936559, MSB0010718C или MPDL3280A), анти-PD-L2, анти-ILT1, анти-ILT2, анти-ILT3, анти-ILT4, анти-ILT5, анти-ILT6, анти-ILT7, анти-ILT8, анти-CD40, анти-OX40, анти-CD137, анти-KIR2DL1, анти-KIR2DL2/3, анти-KIR2DL4, анти-KIR2DL5A, анти-KIR2DL5B, анти-KIR3DL1, анти-KIR3DL2, анти-KIR3DL3, анти-NKG2A, анти-NKG2C, анти-NKG2E или любой органический низкомолекулярный ингибитор таких мишеней; IL-10, анти-IL10, анти-TSP (тимусный стромальный лимфопоэтин) или пегелированный IL-10.

В одном из вариантов осуществления изобретения молекулярная масса фрагмента полиэтиленгликоля (PEG) в пегелированной молекуле IL-10 составляет около 12000 дальтон или около 20000 дальтон. В одном из вариантов осуществления изобретения, пегелированный IL-10 (например, пегелированный IL-10 человека) содержит одну или несколько молекул полиэтиленгликоля, ковалентно присоединенных через линкер (например, C₂₋₁₂алкил, такой как -CH₂CH₂CH₂-) к одному аминокислотному остатку одной субъединицы IL-10, где указанный аминокислотный остаток представляет собой альфа-аминогруппу N-концевого аминокислотного остатка или эпсилон-аминогруппу лизинового остатка. В одном из вариантов осуществления изобретения, пегелированный IL-10 представляет собой (PEG)_b-L-NH-IL-10; где b равно 1-9 и L представляет собой C₂₋₁₂алкильный линкерный фрагмент, ковалентно присоединенный к азоту (N) одного аминокислотного остатка в IL-10. В одном из вариантов осуществления изобретения IL-10 пегелированного IL-10 имеет формулу [X-O(CH₂CH₂O)_n]_b-L-NH-IL-10, где X представляет собой H или C₁₋₄алкил; n равно от 20 до 2300; b равно от 1 до 9 и L представляет собой C₁₋₁₁алкильный линкерный фрагмент, который ковалентно присоединен к азоту (N) альфа-аминогруппы на аминоконце одной субъединицы IL-10; при условии, что, когда b больше 1, общее количество n не превышает 2300. См. US70552686.

В одном из вариантов осуществления изобретения анти-IL-10 антитело или его антигенсвязывающий домен (например, гуманизованное антитело) содержит CDR, приведенные ниже:

CDR-L1: KTSQNIFENLA (SEQ ID NO: 71);
 CDR-L2: NASPLQA (SEQ ID NO: 72);
 CDR-L3: HQYYSGYT (SEQ ID NO: 73);
 CDR-H1: GFTFSDYHMA (SEQ ID NO: 74);
 CDR-H2: SITLDTATYYRDSVRG (SEQ ID NO: 75);
 CDR-H3: HRGFSVWLDY (SEQ ID NO: 76);
 (см. США 7662379)

В одном из вариантов осуществления изобретения анти-TSLP антитело или его антигенсвязывающий домен (например, гуманизованное антитело) содержит CDR, приведенные ниже:

CDR-H1: GYIFTDYAMH (SEQ ID NO: 77);
 CDR-H2: TFIPLLDTSYDYNQNFK (SEQ ID NO: 78);
 CDR-H3: MGVTHSYVMDA (SEQ ID NO: 79);
 CDR-L1: RASQPISISVH (SEQ ID NO: 80);
 CDR-L2: FASQISIS (SEQ ID NO: 81);
 CDR-L3: QQTFSLPYT (SEQ ID NO: 82);
 (См. WO2008/76321)

В одном из вариантов осуществления изобретения анти-CD27 антитело или его антигенсвязывающий домен (например, гуманизованное антитело) содержит CDR, приведенные ниже:

CDR-H1: GFIIKATYMH (SEQ ID NO: 83);
 CDR-H2: RIDPANGETKYDPKFQV (SEQ ID NO: 84);
 CDR-H3: YAWYFDV (SEQ ID NO: 85);
 CDR-L1: RASENIYSFLA (SEQ ID NO: 86);
 CDR-L2: HAKTLAE (SEQ ID NO: 87);
 CDR-L3: QHYYGSPLT (SEQ ID NO: 88);
 (см. WO2012/04367).

Таким образом, настоящее изобретение включает композиции, содержащие CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такой как нанотело) совместно с пембролизумабом; а также способы лечения или профилактики злокачественной опухоли у субъекта, включающие введение эффективного количества CTLA4-связывающего вещества совместно с пембролизумабом (например, пембролизумабом, вводимым в дозе 200 мг один раз в три недели) субъекту. Необязательно, объект также вводят совместно с

другим дополнительным терапевтическим средством.

В одном из вариантов осуществления изобретения, CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) сочетается с антителом - пембролизумабом, который содержит тяжелую цепь иммуноглобулина (или ее CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTN
FNEKFKNRVTLTDTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTVTVVSAST
KGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSL
SLGK; (SEQ ID NO: 89),

и легкую цепь иммуноглобулина (или ее CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQKPKGQAPRLLIYLSAYLE
SGVPARFSGSGSDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK
ADYKHNKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90).

В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) сочетается с антителом, содержащим тяжелую цепь иммуноглобулина (или ее CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность:

QVQLVESGGGVVQPRSLRLDCKASGITFNSNGMHVWRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY
YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNKKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK
(SEQ ID NO: 91);

и легкую цепь иммуноглобулина (или ее CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPKGQAPRLLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGSDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQSSNWPRTFFGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 92).

В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество сочетается с любым одним или несколькими из следующих веществ: 13-цис-ретиноевая кислота, 3-[5-(метилсульфонилпиперадиметил)индолил]хинолон, 4-гидрокситамоксифен, 5-деооксиуридин, 5'-деоокси-5-фторуридин, 5-фторурацил, 6-мекаптопурин, 7-гидроксисауроспорин, А-443654, абиратерона ацетат, абраксан, АВТ-578, аколбифен, ADS-100380, афлиберцепт, ALT-110, альтретамин, амифостин, аминоглутетимид, амрубицин, амсакрин, анагрелид, анастрозол, ангиостатин, AP-23573, ARQ-197, арзоксифен, AS-252424, AS-605240, аспарагиназа, АТ13387, АТ-9263, атрацентан, акситиниб, AZD1152, вакцина бацилла Кальмета-Герена (BCG), батабулин, ВС-210, безодутокс, бевацизумаб, BGJ398, бикалутамид, Bio111, BIO140, ВКМ120, блеомицин, BMS-214662, BMS-247550, BMS-275291, BMS-310705, бортезимиб, бусерелин, бусульфан, кальцитриол, камптотецин, канертиниб, капецитабин, карбоплатин, кармустин, СС8490, СЕА (вакцина на основе рекомбинантного вируса осповакцины-карциноэмбрионального антигена), цедираниб, CG-1521, CG-781, хламидоцин, хлорамбуцил, хлоротоксин, циленгитид, цимитидин, цисплатин, кладрибин, клодронат, кобиметниб, COL-3, CP-724714, циклофосфамид, ципротерон, ципротеронацетат, цитарабин, цитозинарабинозид, дабрафениб, дакарбазин, дацинонат, дактиномицин, далотузумаб, данузертиб, дазатаниб, даунорубицин, декатаниб, дегуэлин, денилейкин, деоксикоформин, депсипептид, диарилпропионитрил, диэтилстилбестрол, дифтитокс, DNE03, доцетаксел, довитиниб, доксорубицин, дролоксифен, эдодекарин, эдотреотид, меченный иттрием-90, эдотреотид, ЕКВ-569, EMD121974, энкорафениб, эндостатин, энзалутамид, энзастаурин, эпирубицин, эпителин В, ERA-923, эрбитукс, эрлотиниб, эстрадиол, эстрамустин, этопозид, эверолимус, экземестан, фиклатузумаб, финастерид, флавопиридол, флукуринидин, флударабин, флуорокортизон, флуоксиместерон, флутамид, режим FOLFOX, фулвестрант, галетерон, ганетеспиб, гефитиниб, гемцитабин, гиматекан, глюкопиранозил липид А, гозерелин, гозерелина ацетат, госсипол, GSK461364, GSK690693, HMR-3339, гидроксипрогесте-

ронкапроат, гидроксимочевина, IC87114, идарубицин, идоксифен, ифосфамид, IM862, иматиниб, IMC-1C11, имиквимод, INC280, INCB24360, INO1001, интерферон, интерлейкин-2, интерлейкин-12, ипилимумаб, иринотекан, JNJ-16241199, кетоконазол, KRX-0402, лапатиниб, лазофоксифен, LEE011, летрозол, лейковорин, лейпролид, лейпролида ацетат, левамизол, включенный в липосомы паклитаксел, ломустин, лонафарниб, люкантон, LY292223, LY292696, LY293646, LY293684, LY294002, LY317615, LY3009120, маримастан, мехлорэтамин, медроксипрогестеронацетат, мегестролацетат, MEK162, мелфалан, меркаптоурин, месна, метотрексат, митрамицин, митомицин, митотан, митоксантрон, суспензия убитой нагреванием *Mycobacterium obuense*, тозасертиб, MLN8054, натитоклакс, неовастан, нератипиб, неурadiaб, нилотиниб, нилутимид, нолатрексед, NVP-BEZ235, облимерсен, октреотид, офатумумаб, ореговомаб, орнатузумаб, ортерол, оксалиплатин, паклитаксел, палбоциклиб, памидронат, панитумумаб, пазопаниб, PD0325901, PD184352, ПЭГ-интерферон, пеметрексед, пентостатин, перифозин, фенилаланиниприт, PI-103, пиктилисиб, PIK-75, пипендоксифен, PKI-166, пликамицин, поли-ICLC, порфимер, преднизон, прокарбазин, прогестины, полисахарид, связанный с белком PSK (полученный из *Basidiomycete coriolus versicolor*), PLX8394, PX-866, R-763, ралоксифен, ралитрексед, разоксин, ридафоролимус, ритуксимаб, ромидепсин, RTA744, рубитекан, скриптаид, Sdx1022, селициклиб, селуметиниб, семаксаниб, SF1126, си-ролимус, SN36093, сорафениб, спиринолактон, скваламин, SR13668, стрептозоцин, SU6668, субероиланалид-гидроксамовая кислота, сунитиниб, синтетический эстроген, талампанел, талимоген лагерпареп-век, тамоксифен, темозоломид, темсиролимус, тенипозид, тесмилифен, тестостерон, тетрандрин, TGX-221, талидомид, б-тиогуанин, тиотепа, тицилимумаб, типифарниб, тивозаниб, TKI-258, TLK286, TNF α (фактор некроза опухолей альфа), топотекан, торемифена цитрат, трабектедин, траметиниб, трастузумаб, третиноин, трихостатин А, моногидрат трицирибинфосфата, трифорелина памоат, TSE-424, урациловый иприт, вальпроевая кислота, валрубицин, вандетаниб, ваталаниб, ловушка для VEGF, вемурафениб, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, витаксин, витеспан, вориносат, VX-745, вортманнин, Xr311, Z-100 экстракт горячей водой *Bacillus tuberculosis*, занолимумаб, ZK186619, ZK-304709, ZM336372 или ZSTK474.

В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) сочетается с один или несколькими антиэметиками, включая, но ими не ограничивая: каспитант (GlaxoSmithKline), нетупитант (MGI-Helsinn) и другие антагонисты рецептора NK-1, палонсетрон (продается под названием Aloxi by MGI Pharma), апрепитант (продается под названием Emend от компании Merck and Co.; Rahway, NJ), дифенгидрамин (продается под названием Benadryl® от компании Pfizer; New York, NY), гидроксизин (продается под названием Atarax® от компании Pfizer; New York, NY), метоклопрамид (продается под названием Reglan® от компании AN Robins Co.; Richmond, VA), лоразепам (продается под названием Ativan® от компании Wyeth; Madison, NJ), ал-празолам (продается под названием Xanax® от компании Pfizer; New York, NY), галоперидол (продается под названием Haldol® от компании Ortho-McNeil; Raritan, NJ), дроперидол (Inapsine®), дронабинол (продается под названием Marinol® от компании Solvay Pharmaceuticals, Inc.; Marietta, GA), дексаметазон (продается под названием Decadron® от компании Merck and Co.; Rahway, NJ), метилпреднизолон (продается под названием Medrol® от компании Pfizer; New York, NY), прохлорперазин (продается под названием Compazine® от компании Glaxosmithkline; Research Triangle Park, NC), гранизетрон (продается под названием Kytril® от компании Hoffmann-La Roche Inc.; Nutley, NJ), ондансетрон (продается под названием Zofran® от компании Glaxosmithkline; Research Triangle Park, NC), долазетрон (продается под названием Anzemet® от компании Sanofi-Aventis; New York, NY), тропизетрон (продается под названием Navoban® от компании Novartis; East Hanover, NJ).

Другие побочные эффекты лечения злокачественной опухоли включают дефицит красных и белых кровяных телец. Соответственно, в одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) сочетается с агентом, который лечит или предотвращает такой дефицит, как, например, филграстим, ПЭГ-филграстим, эритропоэтин, эпоэтин альфа или дарбепоэтин альфа.

В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) сочетается с вакциной. В одном из вариантов осуществления изобретения вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину, пептидную вакцину или ДНК-вакцину. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения, вакцина представляет собой опухолевую клетку (например, облученную опухолевую клетку) или дендритную клетку (например, дендритную клетку, в которую введен опухолевый пептид).

В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество (например, ISVD, такой как нанотело) вводится совместно с терапевтической процедурой. Терапевтическая процедура представляет собой одну или несколько стадий, выполняемых врачом или клиницистом при лечении субъекта, предназначенной для облегчения одного или нескольких симптомов (например, злокачественной опухоли и/или инфекционного заболевания) у подвергаемого лечению субъекта, или путем вызывания регрессии или устранения таких симптомов, или путем ингибирования развития такого симптома(ов), например симптомов злокачественной опухоли, таких как рост опухоли или метастазирование,

любой клинически определяемой степени.

В одном из вариантов осуществления изобретения терапевтическая процедура представляет собой противоопухолевую лучевую терапию. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения лучевая терапия представляет собой наружную дистанционную лучевую терапию (ЕВТ): способ доставки пучка высокоэнергетических рентгеновских лучей в место локализации опухоли. Луч генерируется вне пациента (например, линейным ускорителем) и нацеливается на участок опухоли. Эти рентгеновские лучи могут разрушать клетки злокачественной опухоли, и тщательное планирование лечения позволяет сохранить окружающие здоровые ткани. Источники радиоактивного излучения не размещаются внутри организма пациента. В одном из вариантов осуществления изобретения лучевая терапия представляет собой протонную терапию: тип конформной терапии, при которой вместо рентгеновских лучей пораженную ткань бомбардируют протонами. В одном из вариантов осуществления изобретения лучевая терапия представляет собой конформную наружную дистанционную лучевую терапию: процедуру, которая использует передовые технологии для адаптации лучевой терапии к структурам организма человека.

В одном из вариантов осуществления изобретения лучевая терапия представляет собой брахитерапию: временное размещение радиоактивных веществ в организме, обычно используемое для получения дополнительной дозы или увеличения, лучевого воздействия на пораженную область.

В одном из вариантов осуществления изобретения, хирургическая процедура, применяемая совместно с CTLA4-связывающим веществом (например, ISVD, такой как нанотело), является хирургической туморэктомией.

Терапевтические применения.

Изобретение включает способ профилактики и/или лечения по крайней мере одного заболевания или расстройства, которое можно предотвратить или лечить с помощью CTLA4-связывающего вещества (например, ISVD, такой как нанотело) по настоящему изобретению, необязательно совместно с дополнительным терапевтическим средством или терапевтической процедурой, который включает введение субъекту, нуждающемуся в такой профилактике и/или лечении, фармацевтически активного количества CTLA4-связывающего вещества, и/или содержащей его фармацевтической композиции.

"Лечить" или "обрабатывать" означает введение CTLA4-связывающего вещества (например, ISVD, такой как нанотело) по настоящему изобретению субъекту (например, млекопитающему, такому как человек), имеющему один или несколько симптомов заболевания, в отношении которого CTLA4-связывающие вещества являются эффективными, например, при лечении субъекта, имеющего злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, или потенциально имеющего злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, в отношении которого агент обладает терапевтической активностью. Обычно CTLA4-связывающее вещество вводят в "эффективном количестве" или "эффективной дозе", которая облегчает один или несколько симптомов (например, злокачественной опухоли или инфекционного заболевания) у подвергаемого лечению субъекта или популяции, или путем вызывания регрессии или устранения таких симптомов, или путем ингибирования развития такого симптома(ов), например симптомов злокачественной опухоли, таких как рост опухоли или метастазирование, любой клинически определяемой степени. Эффективное количество CTLA4-связывающего вещества может изменяться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст и масса пациента, а также способность лекарственного средства вызывать желаемый ответ у субъекта.

Субъектом, подлежащим лечению, может быть любое теплокровное животное, но, в частности, им является млекопитающее, и более конкретно человек. Как будет понятно квалифицированному специалисту в данной области, субъектом, подлежащим лечению, будет, в частности, человек, страдающий или предрасположенный к возникновению заболеваний и расстройств, указанных в настоящем документе. Обычно схема лечения будет выполняться до тех пор, пока не будет достигнут желаемый терапевтический эффект, и/или до тех пор, пока необходимо сохранить желаемый терапевтический эффект. В этом случае также это может определить клиницист.

CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело), полипептиды, соединения и полинуклеотиды (например, векторы), описанные в настоящем документе, предпочтительно вводят в кровоток. Таким образом, их можно вводить любым подходящим способом, который позволяет CTLA4-связывающим веществам, полипептидам, соединениям и полинуклеотидам вводиться в кровоток, например, внутривенно, путем инъекции или инфузии или любым другим подходящим способом (включая пероральное введение, подкожное введение, внутримышечное введение, введение через кожу, интраназальное введение, введение через легкие и т.д.), что позволяет CTLA4-связывающим веществам, полипептидам, соединениям и полинуклеотидам вводиться в кровоток. Подходящие способы и пути введения будут ясны специалисту в данной области также, например, после изучения опубликованных патентных заявок Ablynx NV, таких как, например, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627.

Для получения фармацевтических или стерильных композиций CTLA4-связывающих веществ (например, ISVD, такие как нанотело) по настоящему изобретению CTLA4-связывающие вещества смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences и U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company,

Easton, PA (1984) или Remington's Pharmaceutical Sciences. Такие композиции являются частью настоящего изобретения.

В объем настоящего изобретения включены высушенные, например лиофилизированные, композиции, содержащие CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело) или их фармацевтическую композицию, которая включает фармацевтически приемлемый носитель, но по существу не содержит воду.

Композиции терапевтических и диагностических веществ могут быть получены путем смешивания с приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, суспензий, водных растворов или суспензий (см., например, Hardman, et al. (2001), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

Обычно для профилактики и/или лечения заболеваний и расстройств, описанных в настоящем документе, и в зависимости от конкретного заболевания или расстройства, подлежащего лечению, эффективности и/или периода полувыведения конкретных слитых белков или конструкций, которые будут использоваться, способа введения и конкретного применяемого фармацевтического состава или композиции наночастицы и полипептиды по изобретению обычно будут вводиться в количестве от 1 г до 0,01 мкг/кг массы тела в сутки, предпочтительно от 0,1 г до 0,1 мкг/кг массы тела в сутки, например, около 1, 10, 100 или 1000 мкг/кг массы тела в сутки либо непрерывно (например, путем инфузии) в виде однократной суточной дозы или в виде нескольких разделенных доз в течение суток. Также будет ясно, что в конкретных случаях клиницист может выбрать отклонение от этих количеств, например, с учетом приведенных выше факторов и своего экспертного мнения.

В общем случае некоторые рекомендации в отношении вводимых количеств могут быть получены исходя из обычно вводимых количеств для сопоставимых стандартных антител или фрагментов антител против аналогичной мишени, вводимых по существу тем же способом, с учетом различий аффинности/авидности, эффективности, биораспределения, периода полувыведения и аналогичных факторов, хорошо известных специалисту в данной области.

Способ введения CTLA4-связывающего вещества (например, ISVD, такой как нанотело) субъекту может изменяться. Способы введения включают пероральный, ректальный, трансмукозальный, интестинальный, парентеральный; внутримышечный, подкожный, интрадермальный, интрамедуллярный, интра-текальный, прямое внутривенное введение, внутривенный, внутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазный, ингаляционный, инсuffляционный, местный, наружный, трансдермальный или внутри-артериальный.

Определение подходящей дозы осуществляет клиницист, например используя параметры или факторы, известные или предполагаемые в данной области для воздействия на лечение. В общем случае при определении дозы доза начинается с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, и затем повышается с небольшим увеличением до тех пор, пока не будет достигнут желаемый или оптимальный эффект по сравнению с любыми отрицательными побочными эффектами. Важные диагностические меры включают оценку симптомов, например воспаление или уровень продуцируемых воспалительных цитокинов. В общем случае желательно, чтобы биологический препарат, который будет применяться, был получен из тех же видов, что и животное, на которое направлено лечение, тем самым сводя к минимуму любой иммунный ответ на реагент. В случае субъекта-человека могут быть желательными, например, химерные, гуманизированные и полностью человеческие антитела. Доступно руководство по выбору соответствующих доз (см., например, Wawrzynczak (1996), Antitelo Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003), New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom et al. (1999), New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon et al. (2001), New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000), New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh et al. (2003), New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky et al. (2000), New Engl. J. Med. 343:1594-1602).

Независимо от того, был ли ослаблен симптом заболевания, его можно оценить посредством любого клинического измерения, обычно используемого врачами или другими квалифицированными медицинскими работниками, для оценки степени тяжести или развития этого симптома. Хотя вариант осуществления настоящего изобретения (например, способ лечения или продукт производства) может не быть эффективным в ослаблении симптома(ов) конкретного заболевания у любого субъекта, он должен облегчить симптом(ы) конкретного заболевания у статистически значимого числа субъектов, что определяется любым статистическим исследованием, известным в данной области, таким как параметрический t-критерий Стьюдента, тест хи-квадрат, U-тест Манна-Уитни, критерий Крускала-Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхиера-Терпстра и критерий Уилкоксона.

Обычно схема лечения будет выполняться до тех пор, пока не будет достигнут желаемый терапевтический эффект, и/или до тех пор, пока необходимо сохранять желаемый терапевтический эффект. И в этом случае также это может определить клиницист.

Поскольку CTLA4-связывающие вещества по настоящему изобретению (например, ISVD, такие как нанотело) способны связываться с CTLA4, они могут, в частности, применяться для лечения или профилактики злокачественной опухоли, метастатической злокачественной опухоли, твердой опухоли, гематологической злокачественной опухоли, лейкемии, лимфомы, остеосаркомы, рабдомиосаркомы, нейробластомы, злокачественной опухоли почек, лейкемии, переходно-клеточной злокачественной опухоли почек, злокачественной опухоли мочевого пузыря, опухоли Вильма, злокачественной опухоли яичников, злокачественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли простаты, злокачественной опухоли костей, злокачественной опухоли легких, немелкоклеточной злокачественной опухоли легкого, злокачественной опухоли желудка, злокачественной опухоли толстой и прямой кишки, злокачественной опухоли шейки матки, синовиальной саркомы, злокачественной опухоли головы и шеи, плоскоклеточной карциномы, множественной миеломы, почечно-клеточной злокачественной опухоли, ретинобластомы, гепатобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы, рабдоидной опухоли почки, саркомы Юинга, хондросаркомы, злокачественной опухоли мозга, глиобластомы, менингиомы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, медуллобластомы, астроцитомы, анапластической астроцитомы, олигодендроглиомы, эпендимомы, папилломы хориоидного сплетения, полицитемии, тромбоцитемии, идиопатического миелофиброза, саркомы мягких тканей, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли эндометрия, карциноидной злокачественной опухоли или злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли молочной железы и злокачественной опухоли желудка.

CTLA4-связывающие вещества по настоящему изобретению (например, ISVD, такие как нанотело) могут использоваться для лечения или профилактики инфекционных заболеваний, таких как, например, вирусная инфекция, бактериальная инфекция, грибковая инфекция или паразитарная инфекция. В одном из вариантов осуществления изобретения вирусная инфекция представляет собой заражение вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса эболы, вируса гепатита (А, В или С), вируса герпеса (например, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна Барра), аденовируса, вируса гриппа, флавивирусов, эховируса, риновируса, вируса Коксаки, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса эпидемического паротита, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса осповакцины, Т-лимфотропного вируса человека, вируса лихорадки денге, папилломавируса, вируса моллюска, полиовируса, вируса бешенства, вируса Джона Каннингхэма или вируса аргивирального энцефалита. В одном из вариантов осуществления изобретения бактериальная инфекция представляет собой заражение бактериями, выбранными из группы, состоящей из *Chlamydia*, бактерии рода риккетсии, микобактерий, стафилококков, стрептококков, пневмококков, менингококков и гонококков, клебсиелла, протеус, серратия, псевдомонада, *Legionella*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella*, палочковидная бактерия, *Vibrio cholerae*, *Clostridium tetan*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis* и *Borriella*. В одном из вариантов осуществления изобретения, грибковая инфекция представляет собой заражение грибами, выбранными из группы, состоящей из *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*. В одном из вариантов осуществления изобретения, паразитарная инфекция представляет собой заражение паразитом, выбранным из группы, состоящей из *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*. Настоящее изобретение также включает способы для

предотвращения CTLA4-опосредуемого ингибирования: Т-клеточной костимулирующей сигнализации; Т-клеточной активации, Т-клеточной пролиферации;

предотвращения связывания CTLA4 с B7-1 (CD80) или B7-2 (CD86); и/или

усиления Т-клеточной активации в организме субъекта путем введения CTLA4-связывающего вещества (например, F023700912 или F023700914) субъекту; или *in vitro*, путем контактирования CTLA4 с CTLA4-связывающим веществом.

Такие активности могут быть опосредованы CTLA4-связывающим веществом. Таким образом, такие методы могут быть также выполнены с любым связывающим веществом, который включает CTLA4-связывающее вещество.

Изобретение также относится к способам лечения вышеуказанных заболеваний и расстройств, которые обычно включают введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении (т.е. страдающему одним из вышеуказанных заболеваний), терапевтически эффективного количества CTLA4-связывающего вещества (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению. Изобретение также относится к CTLA4-связывающему веществу по изобретению для использования в профилактике или лечении одного из вышеуказанных заболеваний или расстройств.

Настоящее изобретение также относится к устройству для инъекций, содержащему любые CTLA4-связывающие вещества (например, ISVD, такие как нанотело), полипептиды или полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, или их фармацевтические композиции. Устройство для инъекций представляет собой устройство, которое вводит вещество в организм пациента парентеральным способом, таким как внутримышечный, подкожный или внутривенный способ введения. Например, устройство для инъекций может представлять собой шприц (например, предварительно заполненный фармацевтической композицией, например, автоматический шприц), который, например, включает цилиндр или втулку для удержания текучей инъецируемой среды (например, содержащей CTLA4-связывающее вещество или его фармацевтическую композицию), иглу для прокалывания кожи и/или кровеносных сосудов для инъекции жидкости и плунжер для выталкивания жидкости из цилиндра через отверстие иглы. В одном из вариантов осуществления изобретения устройство для инъекций, которое содержит CTLA4-связывающее вещество или его фармацевтическую композицию, представляет собой внутривенное (IV) устройство для инъекций. Такое устройство включает CTLA4-связывающее вещество или его фармацевтическую композицию в канюле или троакаре/игле, которые могут быть присоединены к трубке, которая может быть присоединена к мешку или резервуару для хранения жидкости (например, физиологического раствора или раствора Рингера лактата, содержащего NaCl, лактата натрия, KCl, CaCl₂ и необязательно, глюкозу), вводимые в организм субъекта через канюлю или троакар/иглу. В одном из вариантов осуществления изобретения CTLA4-связывающее вещество или его фармацевтическая композиция может быть введено в устройство после того, как троакар и канюля введены в вену субъекта, а троакар удален из введенной канюли. Устройство IV может, например, вводиться в периферическую вену (например, в руку или ладонь); верхнюю полую вену или нижнюю полую вену или в правое предсердие сердца (например, центральное IV); или в подключичную, внутреннюю яремную или бедренную вену и, например, продвигается к сердцу, пока не достигнет верхней полой вены или правого предсердия (например, центральный венозный катетер). В одном из вариантов осуществления изобретения устройство для инъекций представляет собой автоинжектор; безыгольный шприц или внешний инфузионный насос. В безыгольном шприце используется узкая струя жидкости высокого давления, которая проникает в эпидермис, чтобы ввести CTLA4-связывающее вещество или его фармацевтическую композицию в организм пациента. Внешний инфузионный насос представляет собой медицинские устройства, которые доставляют CTLA4-связывающее вещество или его фармацевтическую композицию в организм пациента в контролируемых количествах. Внешние инфузионные насосы могут иметь электрический источник питания или могут быть механическими. Различные насосы функционируют различными способами, например, шприцевой насос удерживает жидкость в резервуаре шприца, а подвижный поршень контролирует подачу жидкости, эластомерный насос удерживает жидкость в растяжимом резервуаре баллонного типа, а давление эластичных стенок баллона приводит в движение доставляемую жидкость. В перистальтическом насосе система роликов зажимает гибкую трубку по ее длине, толкая жидкость вперед. В многоканальном насосе, жидкости могут поступать из нескольких резервуаров с разными скоростями.

Следует также отметить, что фигуры, любой перечень последовательностей и экспериментальная часть/примеры приведены только для дополнительной иллюстрации изобретения и не должны интерпретироваться или толковаться как ограничивающие объем изобретения и/или прилагаемой формулы изобретения каким-либо способом, если явно не указано иное.

Другие аспекты, варианты осуществления, преимущества и применения по изобретению станут понятны из дальнейшего описания настоящего изобретения.

Примеры

Эти примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения и не являются их ограничением. Композиции и методы, представленные в примерах, образуют часть настоящего изобретения.

Пример 1. Связывание нанотела F023700906 с CTLA-4-Fc.

Моновалентное F023700906 нанотело 11F01 (L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L)-FLAG3-HIS6), структурный блок F023700912, демонстрирует связывание с молекулой слияния, содержащей CTLA-4-Fc как от человека, так и от яванского макака. Скорость передачи, скорость и аффинность определяли с помощью системы ProteOn XPR36 (BioRad 670BR0166) с использованием CTLA4-hFc человека и яванского макака (табл. D).

Таблица D-1

Связывание нанотела с CTLA-4-Fc человека и яванского макака

| | CTLA-4-Fc человека | | | CTLA-4-Fc яванского макака | | |
|------------|--------------------|---------------|---------|----------------------------|---------------|---------|
| | Ka (1/мсек) | Kd (1/сек) | KD (M) | Ka (1/мсек) | Kd (1/сек) | KD (M) |
| F023700906 | 4,8E+06 | 5,9E-03 | 1,2E-09 | 4,7E+06 | 5,7E-03 | 1,2E-09 |

Таблица D-2

Реагенты

| Реагент | Система экспрессии | Конц. (мг/мл) | Буфер для композиции | SEC чистота | RP чистота |
|--------------|--------------------|---------------|--|------------------------------|------------|
| hCTLA4-Fc | HEK293F | 16,13 | 10 мМ фосфат натрия, 75 мМ NaCl, 3% Сахароза, рН=7,4 | 94,86% (~150 кДа (тетрамер)) | 61,50% |
| циноCTLA4-Fc | HEK293EBNA | 0,32 | фосфатно-солевой буфер рН 7,4 | 81,58% | 83,50% |

Пример 2. Связывание нанотела F023700912 с поверхностным CTLA4.

F023700912 продемонстрирует связывание с CTLA-4 человека, экспрессируемого на поверхности клетки. Методом проточной цитометрии исследовали связывание серий F023700912 (11F01 (E1D, L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L)-35GS-11F01 (L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L)-35GS-ALB11002-A]) (закрашенные круги), F023700925 (PD1-связывающее вещество-35GS-PD1-связывающее вещество-35GS-11F01 (L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L)-35GS-11F01 (L11V, A14P, Q45R, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L)-35GS-ALB11002-A]) (закрашенные квадраты) и нерелевантные Nb (закрашенные треугольники) с (A) объемно сортированными клетками линии Jurkat JE6.2.11, сверхэкспрессирующими CTLA4 человека, или (B) клетками CHO-K1, сверхэкспрессирующими CTLA4 человека. Нанотела обнаруживали посредством ALB11002-связывающего mAb АВН0074. Данные, полученные в этих экспериментах, приведены на фиг. 5А, В). Эти результаты демонстрируют связывание F023700912 и F023700925 с CTLA-4, экспрессированным на поверхности клетки, указывая на то, что эти нанотела модулируют функцию CTLA-4.

На фиг. 5А, В) представлены серии разведений (начальная концентрация 1 мкМ, 1/4 серийного разведения, 12 баллов) серий Nb с увеличенным периодом полувыведения (ALB0011 структурный блок) F023700912 (закрашенные круги), F023700925 (закрашенные квадраты) и Nb отрицательного контроля IRR00051 (закрашенные треугольники) в 200 мкл FACS буфера (PBS (Life Technologies, 14190-094)), 10% инактивированной теплом фетальной бычьей сыворотки (Sigma, F7524), 0,05% NaN₃ (ThermoScientific, 19038)) добавляли к (A) 2Е4 объемно сортированным клеткам линии Jurkat JE6.2.11, сверхэкспрессирующим CTLA4 человека/лунка или (B) 2Е4 клеткам CHO-K1, сверхэкспрессирующим CTLA4 человека/лунка и инкубировали в течение 30 мин при 4°C.

После трех стадий промывки (1 стадия промывки = удаление разведений Nb, добавление 100 мкл охлажденного FACS буфера, центрифугирование в течение 5 мин при 250g), клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C с 3 мкг/мл анти-ALB11002 мышинового mAb АВН00074 в охлажденном FACS-буфере для детекции нанотел с увеличенным периодом полувыведения.

После трех стадий промывки клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C с разбавлением 1/100 в охлажденном FACS-буфере PE козьих F(ab')₂ антимышиных IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071).

После трех стадий промывки клетки ресуспендировали в 50 мкл охлажденного FACS-буфера, дополненного 5 нМ TO-PRO-3 (Molecular Probes, T3605), и анализировали с помощью FACS Canto.

Сначала популяцию P1 выбирали на основе распределения FSC-SSC. Дискриминационное окно устанавливали на 10000 клеток в P1. Из этой популяции исключали клетки TO-PRO-3+ (мертвые клетки). Для этой P1/TO-PRO-3-негативной популяции вычисляли среднее PE значение.

Пример 3. Нанотело F023700912 блокирует связывание CTLA-4 с CD80 и CD86.

F023700912 блокируют связывание CTLA-4 человека с его лигандами CD80 и CD86. Проводили анализ методом проточной цитометрии в конкурентном эксперименте F023700912 (закрашенные круги) и ипилимумаба (закрашенные квадраты) с фиксированными концентрациями (10×EC₃₀) (A) hCD80-hFc или (B) hCD86-hFc на hCTLA4-сверхэкспрессирующих клетках CHO-K1. Лиганды обнаруживали посредством слитого белка, содержащего Fc человеческого IgG. Данные, полученные в этих экспериментах, приведены на фиг. 6А, В). Эти результаты демонстрируют способность F023700912 блокировать связывание CTLA-4 с его лигандами CD80 и CD86, что иллюстрирует способность F023700912 влиять на иммунные ответы, модулированные CTLA-4, и его взаимодействия с CD80 и CD86.

На фиг. 6А, В) представлена серия разведений (начальная концентрация 1 мкМ, 1/3 серийное разведение, 12 баллов) Nb F023700912 (закрашенные круги) и ипилимумаба (закрашенные квадраты) в 100 мкл буфера FACS (PBS (Life Technologies, 14190-094), 10% инактивированной теплом фетальной бычьей сы-

воротки (Sigma, F7524), 0,05% NaN₃ (ThermoScientific, 19038)) добавляли к 1E5 клеткам CHO-K1, сверхэкспрессирующим CTLA4 человека/лунка в присутствии фиксированной концентрации (А) FITC-меченного человеческого CD80-hFc-HIS6 или (В) FITC-меченного человеческого CD86-hFc-HIS6 (FITC-мечение выполняли со степенью мечения 3,6 и 2 соответственно, концентрацией = 10×EC₅₀, составляющей 3,71E-08 М или 4,35 E-08 М соответственно) и инкубировали в течение 90 мин при 4°C.

После трех стадий промывки (1 стадия промывки = удаление растворов Nb, добавление 100 мкл охлажденного FACS буфера, центрифугирование в течение 5 мин при 250g) клетки ресуспендировали в 50 мкл охлажденного FACS буфера, дополненного 5 нМ TO-PRO-3 (молекулярные зонды, T3605) и анализировали с помощью FACS Canto.

Сначала P1 популяцию выбирали на основе распределения FSC-SSC. Дискриминационное окно устанавливали на 10000 клеток в P1. Из этой популяции исключали клетки TO-PRO-3+ (мертвые клетки). Для этой P1/TO-PRO-3-негативной популяции вычисляется среднее значение FITC.

Пример 4. Оценка специфичности F023700912.

Анализ специфичности F023700912 продемонстрировал селективное связывание с CTLA-4. Анализ специфичности против BTLA, CD8, PD1, CTLA4, LAG3, CD28 проводили на сверхэкспрессирующих клетках с использованием проточной цитометрии, при этом связывание ICOS оценивали в анализе ELISA в виде рекомбинантного белка (hICOS-hFc). Экспрессию BTLA, CD8, PD1, CTLA4, LAG3, CD28 подтверждали с помощью непосредственно меченных мишень-специфичных Abs. Положительные контроли, анти-hICOS и анти-hCTLA4/анти-hPD1, были положительными. В анализах ELISA не наблюдали связывание с hICOS. На фиг. 7А-Н оценивается связывание с L-клетками отрицательного контроля, CHO-K1 клетками отрицательного контроля, huCD28+ L клетками, huCD8альфа+ L клетками, huLag-3+ CHO-K1 клетками, huBTLA+ CHO-K1 клетками, huCTLA-4+ CHO-K клетками и huPD-1+ CHO-K1 клетками, соответственно. Для F023700912 не наблюдали связывание с BTLA, CD8, PD1, LAG3, CD28, при этом эффективное связывание F023700912 наблюдали на клетках CTLA-4+ CHO-K1. Данные, полученные в этих экспериментах, приведены на фиг. 7А-Н. Эти результаты иллюстрируют селективное связывание F023700912 с CTLA-4, предполагая минимальные ненаправленные эффекты при введении *in vivo*.

На фиг. 7А-Н представлена серия разбавлений (начальная концентрация 1 мкМ, 1/4 серийного разбавления, 12 баллов) партий с увеличенным периодом полувыведения (ALB0011 структурный блок) Nb F023700912 (закрашенные круги), F023700925 (закрашенные квадраты) и отрицательного контроля Nb IRR00051 (закрашенные треугольники) в 200 мкл FACS-буфера (PBS (Life Technologies, 14190-094)), 10% инактивированной теплом фетальной бычьей сыворотки (Sigma, F7524), 0,05% NaN₃ (ThermoScientific, 19038)) добавляли к (А) 2E4 L-клеткам/лунка, (В) 2E4 CHO-K1 клеткам/лунка, (С) человеческим CD28-сверхэкспрессирующим L-клеткам или (D) человеческим CD8 альфа-сверхэкспрессирующим L-клеткам, (Е) 2E4 человеческим LAG3-сверхэкспрессирующим CHO-K1 клеткам/лунка, (F) 2E4 человеческим BTLA-сверхэкспрессирующим CHO-K1 клеткам/лунка, (G) человеческим CTLA4-сверхэкспрессирующим CHO-K1 клеткам/лунка или (H) человеческим PD1-сверхэкспрессирующим CHO-K1 клеткам/лунка и инкубировали в течение 30 мин при 4°C.

После трех стадий промывки (1 стадия промывки = удаление разбавлений Nb, добавление 100 мкл охлажденного FACS буфера, центрифугирование в течение 5 мин при 250g), клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C с 3 мкг/мл анти-ALB0011 мышиного mAb АВН00074 в охлажденном FACS-буфере для детекции Nb с увеличенным периодом полувыведения.

После трех стадий промывки клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C с разбавлением 1/100 в охлажденном FACS-буфере PE козьего F(ab')₂ антимышиного IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071).

После трех стадий промывки клетки ресуспендировали в 50 мкл охлажденного FACS-буфера, дополненного 5 нМ TO-PRO-3 (Molecular Probes, T3605) и анализировали с помощью FACS Canto.

Сначала P1 популяцию выбирали на основе распределения FSC-SSC. Дискриминационное окно устанавливали на 10000 клеток в P1. Из этой популяции исключали клетки TO-PRO-3+ (мертвые клетки). Для этой P1/TO-PRO-3-негативной популяции вычисляли среднее PE значение.

Пример 5. Связывание нанотела F023700912 с альбумином человека, макака-резус и мыши.

F023700912 связывается с альбумином человека, макака-резус и мыши, прогнозируя длительный период полувыведения по сравнению с нанотелом, связывающимся не с альбумином. При анализе с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) наблюдали связывание с сывороточным альбумином человека, макака-резус и мыши. Данные приведены в табл. Е ниже. Ожидается, что связывание альбумина с F023700912 снизит выведение нанотела при введении *in vivo*, улучшая его терапевтический потенциал.

Таблица Е

Связывание нанотела с альбумином

| | Сывороточный альбумин человека | | | Сывороточный альбумин макака-резус | | | Сывороточный альбумин мыши | | |
|------------|--------------------------------|---------------|-----------|------------------------------------|---------------|-----------|----------------------------|----------------------|-----------|
| | Ka (1/мсек) (к) | Kd (1/сек) | KD (M) | Ka (1/мсек) | Kd (1/сек) | KD (M) | Ka (1/мсек) (к) | Kd (1/сек) (к) | KD (M) |
| F023700912 | 9,4E+04 | 8,8E-03 | 9,3E-08 | 9,5E+04 | 8,9E-03 | 9,3E-08 | 1,2E+05 | 1,8E-01 | 1,5E-06 |
| F023700925 | 3,4E+04 | 7,6E-03 | 2,2E-07 | 3,3E+04 | 8,1E-03 | 2,4E-07 | 4,8E+04 | 1,5E-01 | 3,1E-06 |

Аппарат: Biacore T100 (GE Healthcare); сенсорный чип: CM5 (ID T160713-2, GE Healthcare, партия 10242599).

Пример 6. Варианты нанотела F023700906 N73.

Варианты F023701051 (11F01 (L11V, A14P, Q45R, N73Q, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L)-FLAG3-HIS6), F023701054 (11F01 (L11V, A14P, Q45R, N73T, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L)-FLAG3-HIS6) и F023701061 (11F01 (L11V, A14P, Q45R, N73Y, A74S, K83R, V89L, M96P, Q108L)-FLAG3-HIS6) сравнивали с F023700906 по их способности блокировать связывание (A) CD80 или (B) CD86 с CTLA-4-экспрессирующими клетками CHO-K1. Все эти варианты были способны блокировать связывание CD80 и CD84 с CTLA-4. Блокирование связывания CTLA4 с CD80 и CD86 определяли для нескольких вариантов. Эти данные блокирования приведены на фиг. 8А-В. Эти результаты иллюстрируют возможность изменения аминокислоты в положении N73 без значительного воздействия на способность нанотел блокировать связывание CD80 или CD86 с CTLA-4. Такие варианты позволяют устранить деамидирование в N73.

Пример 7. F023700912 устраняет сформированные твердые опухоли у гуманизированных мышей.

Гуманизированным мышам (Jackson Laboratories) имплантировали опухолевые клетки Panc 08.13. Мышей с развившимися опухолями (~100 мм³, n=9-10/группа) обрабатывали следующим образом: 1 - изотипические контроли (hIgG1-2 мг/кг и hIgG4-3 мг/кг); 2 - ипилимумаб-N297A (3 мг/кг); 3 - ипилимумаб (3 мг/кг); 4 - пембролизумаб (2 мг/кг); 5 - ипилимумаб (3 мг/кг)+пембролизумаб (2 мг/кг); 6 - F023700912 (5 мг/кг, обозначенный как CTLA4-Nab 5), 7 - F023700912 (15 мг/кг, обозначенный как CTLA4-Nab-15) и 8 - F023700912 (15 мг/кг)+пембролизумаб (2 мг/кг). Все антитела вводили подкожно каждые 7 дней по 6 доз. F023700912 вводили подкожно каждые 3,5 дня по 11 доз. Объем опухоли и массу тела измеряли каждые 4-5 дней. На фиг. 9А, В представлены средние объемы опухоли+стандартная погрешность (А), отдельные объемы опухолей на день 37 и объемы опухолей у отдельных мышей в течение эксперимента. Объем опухоли для каждой группы, подвергаемой обработке, также показан на фиг. 9С, J. Также измеряли средние (среднее+SEM) и индивидуальные изменения массы тела в каждой группе, подвергаемой обработке (фиг. 9К-С). Количество мышей, которые были обнаружены мертвыми или подвергнуты гуманной эфтаназии вследствие потери массы тела, обозначали как "#". "↑" обозначает антитело, и "↑" обозначает график дозирования нанотела. Эти данные иллюстрируют способность F023700912 индуцировать ответ против опухоли человека *in vivo* у животных, которые содержат человеческие иммунные клетки. Эти данные подтверждают эффективность F023700912 в лечении злокачественной опухоли человека.

Пример 8. Связывание F023700912 и F023700925 с естественными антителами, отобранными у здоровых людей и людей, пораженных злокачественной опухолью.

Эталонное трехвалентное нанотело, 013700112 (не модифицированное для ослабления связывания с естественными антителами), демонстрировало связывание с несколькими образцами сыворотки, полученными от (фиг. 10А) здоровых субъектов или (фиг. 10В) больных злокачественной опухолью. Оптимизированное по последовательности трехвалентное нанотело аналогичного размера, F023700912, демонстрировало более низкую частоту связывания с аналогичными образцами сыворотки. F023700925 содержит те же структурные блоки, что и F023700912. Несмотря на больший размер, пятивалентное нанотело F023700925 больше не связывается с естественным Abs по сравнению с эталонным нанотелом 013700112. Связывание естественных антител с нанотелами, захваченными на сывороточном альбумине человека (HSA), оценивали с использованием биосенсора ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). В качестве подвижного буфера использовали PBS/Tween (забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4, 0,005% Tween20) и эксперименты проводили при 25°C. Лигандные полосы сенсорного чипа ProteOn GLC активировали с помощью EDC/NHS (скорость потока 30 мкл/мин) и HSA вводили при 10 мкг/мл в ацетатном буфере ProteOn pH 4,5 (скорость потока 100 мкл/мин), чтобы обеспечить уровни иммобилизации около 3600 резонансных единиц. После иммобилизации поверхности деактивировали

этанолламин гидрохлоридом (скорость потока 30 мкл/мин). Нанотела вводили в течение 2 мин при 45 мкл/мин на поверхность HSA, чтобы обеспечить уровень захвата нанотела около 600 резонансных единиц для трехвалентного F023700912 и около 1000 резонансных единиц для пентавалентного F023700925. Образцы, содержащие естественные антитела, разбавляли 1:10 в PBS-Tween20

(0,005%) перед инъектированием в течение 2 мин при 45 мкл/мин с последующей стадией диссоциации в течение 400 сек. После каждого

цикла (т.е. перед новой стадией захвата нанотела и инъекции образца крови) поверхности HSA регенерировали инъекцией HCl (100 мМ) в течение 2 мин при 45 мкл/мин. Обработку сенсограммы и анализ данных выполняли с помощью ProteOn Manager 3.1.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Сенсограммы, показывающие связывание естественных антител, получали после двойного контроля путем вычитания 1) диссоциации нанотело-HSA и 2) неспецифического связывания с эталонной лигандной полосой, содержащей только HSA. Уровни связывания естественных антител определяли путем задания приведенных значений через 125 секунд (через 5 секунд после окончания ассоциации). В качестве эталона, образцы, содержащие естественные антитела, также исследовали на связывание с трехвалентным нанотелом, не модифицированным для ослабления связывания этих естественных антител (T013700112).

Пример 9. Эпитопное картирование анти-hCTLA4 нанотела с использованием масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена.

Контактные области между анти-hCTLA4 нанотелом, F023700912 определяли с помощью анализа масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). С помощью HDX-MS измеряли инкорпорацию дейтерия в амидный скелет белка, и изменения в этой инкорпорации зависели от экспозиции водорода растворителя. Осуществляли сравнение уровней обмена дейтерия в образцах, не содержащих антиген, и образцов, связанных с нанотелом, для идентификации областей антигена, которые могут контактировать с нанотелом.

Остатками CTLA4 человека, наиболее сильно защищенными от дейтерирования нанотелом, F023700912, были VRVTVL (остатки 33-38 SEQ ID NO: 110), ADSQVTEVC (остатки 41-49 в SEQ ID NO: 110) и SKVELMYPPPYLIG (остатки 93-106 в SEQ ID NO: 110). Тепловая карта для демонстрации связывания F023700912 с CTLA4 приведена на фиг. 13.

Таблица F

Аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 110)

| | |
|----------|--|
| CTLA4 | AMHVAQFAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYM |
| человека | MGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIG |
| | NGTQIYVIDPEPCPDSDFHNNNNNNHHGGQ |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. CTLA4-связывающее вещество, содержащее один или несколько иммуноглобулиновых одинарных вариабельных доменов (ISVD), которое связывается с CTLA4 человека, где ISVD содержит аминокислотную последовательность:

XVQLVVESSGGVVPQGGSLRLSCAASGGTFSEFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRITYYADSV

KGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTALYYCAAEPESGISGWDYWGQGTLVTVSS,

где X представляет собой D или E (SEQ ID NO: 60);

содержащее увеличивающий период полувыведения фрагмент и/или C-концевой удлинитель.

2. CTLA4-связывающее вещество, содержащее один или несколько иммуноглобулиновых одинарных вариабельных доменов (ISVD), которое связывается с CTLA4 человека, где ISVD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 93-109; лишенное сигнальной последовательности (аминокислоты AAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAANNHHHH (аминокислоты 120-153 SEQ ID NO: 93)).

3. CTLA4-связывающее вещество по п.1 или 2, слитое с увеличивающим период полувыведения фрагментом.

4. CTLA4-связывающее вещество по п.3, где увеличивающий период полувыведения фрагмент представляет собой ISVD, который связывается с сывороточным альбумином человека.

5. CTLA4-связывающее вещество по п.4, где ISVD, который связывается с сывороточным альбумином человека, представляет собой вещество, связывающееся с сывороточным альбумином человека (HSA), с последовательностью SEQ ID NO: 66.

6. CTLA4-связывающее вещество по п.1 или 2, содержащее ISVD, который связывается с CTLA4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, где X представляет собой D или E;

пептидный линкер;

ISVD, который связывается с CTLA4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, где X представляет собой D или E;

пептидный линкер;

увеличивающий период полувыведения фрагмент.

7. CTLA4-связывающее вещество по п.6, содержащее С-концевой удлиняющий аланин.

8. CTLA4-связывающее вещество по п.1 или 2, содержащее:

ISVD, который связывается с CTLA4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, где X представляет собой D или E;

пептидный линкер;

увеличивающий период полувыведения фрагмент.

9. CTLA4-связывающее вещество по п.8, содержащее С-концевой удлинитель аланин.

10. CTLA4-связывающее вещество по любому из пп.6-9, где пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 65).

11. CTLA4-связывающее вещество, содержащее один или несколько иммуноглобулиновых одинарных переменных доменов (ISVD), которое связывается с CTLA4 человека, содержащее аминокислотную последовательность:

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSV
KGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLTTLTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFR
QAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAAEPG
ISGWDYWGQGLTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVV
QPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNK
TTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTTLTVSSA (SEQ ID NO: 62).

12. CTLA4-связывающее вещество, содержащее один или несколько иммуноглобулиновых одинарных переменных доменов (ISVD), которое связывается с CTLA4 человека, содержащее аминокислотную последовательность:

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSV
KGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLTTLTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR
QAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL
SRSSQGLTTLTVSSA (SEQ ID NO: 64).

13. CTLA4-связывающее вещество по п.1 или 2, которое является поливалентным.

14. Набор для лечения или профилактики злокачественного новообразования, связанного с CTLA4, который содержит CTLA4-связывающее вещество по любому из пп.1-13, совместно с дополнительным терапевтическим средством.

15. Полинуклеотид, кодирующий CTLA4-связывающее вещество по любому из пп.1-13.

16. Полинуклеотид по п.15, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 61 или 63.

17. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по любому из пп.15-17.

18. Клетка-хозяин для продукции CTLA4-связывающего вещества по любому из пп.1-13, содержащая полинуклеотид или вектор по любому из пп.15-17.

19. Способ получения CTLA4-связывающего вещества по любому из пп.1-13, включающий введение полинуклеотида, кодирующего CTLA4-связывающее вещество, в клетку-хозяина и культивирование клетки-хозяина в среде в условиях, благоприятных для экспрессии указанного CTLA4-связывающего вещества из указанного полинуклеотида, и очистку CTLA4-связывающего вещества от указанной клетки-хозяина и/или указанной среды.

20. CTLA4-связывающее вещество, полученное способом по п.19.

21. Способ предотвращения связывания CTLA4 с CD80 или CD86, включающий приведение CTLA4 в контакт с CTLA4-связывающим веществом по любому из пп.1-13, совместно с дополнительным терапевтическим средством.

22. Способ усиления иммунного ответа в организме индивида, включающий введение эффективно количества CTLA4-связывающего вещества по любому из пп.1-13 индивида, совместно с дополнительным терапевтическим средством.

23. Способ лечения или профилактики злокачественной опухоли, связанной с CTLA4, включающий введение человеку эффективно количества CTLA4-связывающего вещества по любому из пп.1-13, совместно с дополнительным терапевтическим средством.

24. Способ по п.23, где злокачественная опухоль представляет собой метастатическую злокачественную опухоль, солидную опухоль, гематологическую злокачественную опухоль, лейкоз, лимфому, остеосаркому, рабдомиосаркому, нейробластому, рак почек, переходно-клеточный рак почек, рак мочевого пузыря, опухоль Вильмса, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак простаты, рак костей, рак легких, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак толстой и прямой

кишки, рак шейки матки, синовиальную саркому, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному, множественную миелому, почечно-клеточный рак, ретинобластому, гепатобластому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рабдоидную опухоль почки, саркому Юинга, хондросаркому, рак мозга, глиобластому, менингиому, аденому гипофиза, вестибулярную шванному, примитивную нейроэктодермальную опухоль, медуллобластому, астроцитому, анапластическую астроцитому, олигодендроглиому, эпендимому, папиллому хориоидного сплетения, полицитемию, тромбоцитемию, идиопатический миелофиброз, саркому мягких тканей, рак щитовидной железы, рак эндометрия, карциноидный рак или рак печени.

25. Способ лечения или профилактики инфекционного заболевания, связанного с CTLA4, включающий введение человеку эффективного количества CTLA4-связывающего вещества по любому из пп.1-13, совместно с дополнительным терапевтическим средством.

26. Способ по п.25, где инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию или грибковую инфекцию.

27. Способ по любому из пп.23-26, где человеку вводят дополнительное терапевтическое средство и/или в отношении человека осуществляют терапевтическую процедуру, совместно с CTLA4-связывающим веществом.

| Нумерация в соответствии с системой Kabat (VH) | Нумерация в соответствии с системой Chotia (VH) | Нумерация в соответствии с системой Aho | IMGT |
|--|---|---|------|
| 11 | 11 | 12 | 12 |
| 14 | 14 | 15 | 15 |
| 41 | 41 | 48 | 46 |
| 42 | 42 | 49 | 47 |
| 87 | 87 | 101 | 99 |
| 89 | 89 | 103 | 101 |
| 108 | 108 | 144 | --- |
| 110 | 110 | 146 | --- |
| 112 | 112 | 148 | --- |

Источник: <http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/Numbering/NumFrame.html>

Фиг. 1

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|---|--|
| 1 | Эталон А WO 2008/071447, SEQ ID NO:1306 (11F01) | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSS |
| 2 | CDR1 (Kabat) | FYGMG |
| 3 | CDR2 (Kabat) | DIRTSAGRTYYADSVKG |
| 4 | CDR3 (Kabat/Abm) | EMSGISGWDY |
| 5 | CDR1 (Abm) | GGTFSFYGMG |
| 6 | CDR2 (Abm) | DIRTSAGRTY |
| 7 | CDR3 (Kabat/Abm) | EMSGISGWDY |
| 8 | Эталон А (89T) | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSS |
| 9 | Эталон А (11V + 110K) | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSS |
| 10 | Эталон А (11V + 110Q) | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSS |
| 11 | Эталон А (11V + 112K) | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVKS |
| 12 | Эталон А (11V + 112Q) | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVQS |
| 13 | Эталон А (89L + 110K) | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSS |

Фиг. 2-1

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|---|---|
| 14 | Эталон А (89L + 110Q) | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSS |
| 15 | Эталон А (89L + 112K) | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVKS |
| 16 | Эталон А (89L + 112Q) | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVQS |
| 17 | Эталон А (11V + 89L) | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSS |
| 18 | Эталон А (11V + 89L + 110K) | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVKVSS |
| 19 | Эталон А (11V + 89L + 110Q) | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSS |
| 20 | Эталон А (11V + 89L + 112K) | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVKS |
| 21 | Эталон А (11V + 89L + 112Q) | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVQS |
| 22 | Связывающий фрагмент/связывающее вещество CTLA4 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQM NSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSS |
| 23 | Связывающий фрагмент/связывающее вещество CTLA4 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAP GKEREFVADIRTSAGRYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQM NSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSS |

Фиг. 2-2

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|---|---|
| 24 | Связывающий фрагмент/связывающее вещество CTLA4 | DVQLVESGGGVVQPQGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSS |
| 25 | Связывающий фрагмент/связывающее вещество CTLA4 | DVQLVESGGGVVQPQGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSS |
| 26 | Эталон А (89Т)+А | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTATYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSSA |
| 27 | Эталон А (11V + 110К) +А | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSSA |
| 28 | Эталон А (11V + 110Q) +А | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSSA |
| 29 | Эталон А (11V + 112К) +А | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVKSA |
| 30 | Эталон А (11V + 112Q) +А | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVQSA |
| 31 | Эталон А (89L + 110К) +А | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSSA |
| 32 | Эталон А (89L + 110Q) +А | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSSA |
| 33 | Эталон А (89L + 112К) +А | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVKSA |

Фиг. 2-3

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|---|---|
| 34 | Эталон А (89L + 112Q) + А | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVQSA |
| 35 | Эталон А (11V + 89L) + А | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSSA |
| 36 | Эталон А (11V + 89L + 110K) + А | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVKVSSA |
| 37 | Эталон А (11L + 89L + 110Q) + А | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSSA |
| 38 | Эталон А (11V + 89L + 112K) + А | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVKSA |
| 39 | Эталон А (11V + 89L + 112Q) + А | EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVQSA |
| 40 | Связывающий фрагмент/связывающее вещество CTLA4 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLLQM NSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSSA |
| 41 | Связывающий фрагмент/связывающее вещество CTLA4 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLLQM NSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSSA |
| 42 | Связывающий фрагмент/связывающее вещество CTLA4 | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLLQM NSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSSA |
| 43 | Связывающий фрагмент/связывающее вещество CTLA4 | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRRQAP GKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNKNTVYLLQM NSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSSA |

Фиг. 2-4

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|--------------------|---------------------------------|
| 44 | HIS6-FLAG3-маркер | HHHHHHGAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGA |
| 45 | С-концевая область | VTVKS |
| 46 | С-концевая область | VTVQS |
| 47 | С-концевая область | VKVSS |
| 48 | С-концевая область | VQVSS |
| 49 | С-концевая область | VTVKSX(n) |
| 50 | С-концевая область | VTVQSX(n) |
| 51 | С-концевая область | VKVSSX(n) |
| 52 | С-концевая область | VQVSSX(n) |
| 53 | С-концевая область | VTVKSA |
| 54 | С-концевая область | VTVQSA |
| 55 | С-концевая область | VKVSSA |
| 56 | С-концевая область | VQVSSA |
| 57 | С-концевая область | VTVSS |
| 58 | С-концевая область | VTVSSX(n) |
| 59 | С-концевая область | VTVSSA |

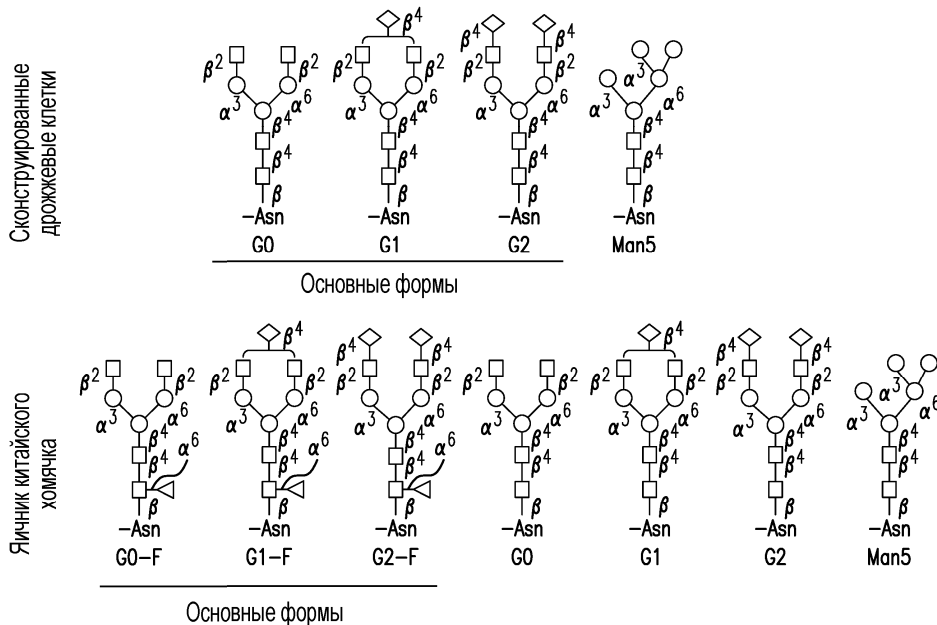
Фиг. 2-5

| | 20 | 40 | 60 |
|------------|---|-------|----|
| SEQIDNO:1 | EVQLVESGGG LVQAGGSLRL SCAASGGTFS FYGMGWFRQA PGKEQEFVAD IRTSAGRTHY | | 60 |
| SEQIDNO:8 | | | 60 |
| SEQIDNO:9 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:10 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:11 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:12 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:13 | | | 60 |
| SEQIDNO:14 | | | 60 |
| SEQIDNO:15 | | | 60 |
| SEQIDNO:16 | | | 60 |
| SEQIDNO:17 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:18 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:19 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:20 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:21 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:22 | V..P..... | | 60 |
| SEQIDNO:23 | V..P..... | | 60 |
| SEQIDNO:24 | D..... V..P..... | | 60 |
| SEQIDNO:25 | D..... V..P..... | | 60 |
| SEQIDNO:26 | | | 60 |
| SEQIDNO:27 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:28 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:29 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:30 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:31 | | | 60 |
| SEQIDNO:32 | | | 60 |
| SEQIDNO:33 | | | 60 |
| SEQIDNO:34 | | | 60 |
| SEQIDNO:35 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:36 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:37 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:38 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:39 | V..... | | 60 |
| SEQIDNO:40 | V..P..... | | 60 |
| SEQIDNO:41 | V..P..... | | 60 |
| SEQIDNO:42 | D..... V..P..... | | 60 |
| SEQIDNO:43 | D..... V..P..... | | 60 |

Фиг. 3А

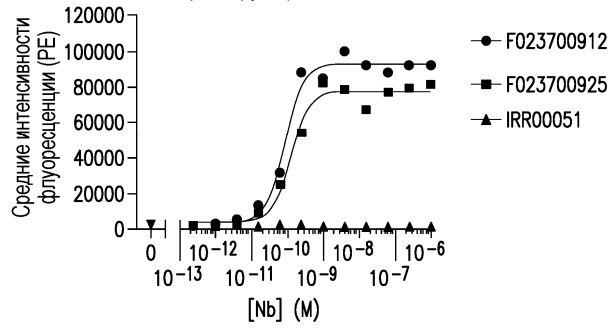
| | 80 | 100 | 120 | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-------|
| SEQIDNO:1 | ADSVKGRFTI | SRDNAKNTVY | LQMNLSKPED | TAVYYCAAEM | SGISGWDYWG | QGTQVTVSS | 119 |
| SEQIDNO:8 | | | | T..... | | | 119 |
| SEQIDNO:9 | | | | | | K..... | 119 |
| SEQIDNO:10 | | | | | | Q..... | 119 |
| SEQIDNO:11 | | | | | | K..... | 119 |
| SEQIDNO:12 | | | | | | Q..... | 119 |
| SEQIDNO:13 | | | | L..... | | K..... | 119 |
| SEQIDNO:14 | | | | L..... | | Q..... | 119 |
| SEQIDNO:15 | | | | L..... | | K..... | 119 |
| SEQIDNO:16 | | | | L..... | | Q..... | 119 |
| SEQIDNO:17 | | | | L..... | | | 119 |
| SEQIDNO:18 | | | | L..... | | K..... | 119 |
| SEQIDNO:19 | | | | L..... | | Q..... | 119 |
| SEQIDNO:20 | | | | L..... | | K..... | 119 |
| SEQIDNO:21 | | | | L..... | | Q..... | 119 |
| SEQIDNO:22 | | S..... | R..... | L..... | | L..... | 119 |
| SEQIDNO:23 | | S..... | R..... | L..... | | L..... | 119 |
| SEQIDNO:24 | | S..... | R..... | L..... | | L..... | 119 |
| SEQIDNO:25 | | S..... | R..... | L..... | | L..... | 119 |
| SEQIDNO:26 | | | | T..... | | A..... | 120 |
| SEQIDNO:27 | | | | | | K..... | A 120 |
| SEQIDNO:28 | | | | | | Q..... | A 120 |
| SEQIDNO:29 | | | | | | K..... | A 120 |
| SEQIDNO:30 | | | | | | Q..... | A 120 |
| SEQIDNO:31 | | | | L..... | | K..... | A 120 |
| SEQIDNO:32 | | | | L..... | | Q..... | A 120 |
| SEQIDNO:33 | | | | L..... | | K..... | A 120 |
| SEQIDNO:34 | | | | L..... | | Q..... | A 120 |
| SEQIDNO:35 | | | | L..... | | A..... | 120 |
| SEQIDNO:36 | | | | L..... | | K..... | A 120 |
| SEQIDNO:37 | | | | L..... | | Q..... | A 120 |
| SEQIDNO:38 | | | | L..... | | K..... | A 120 |
| SEQIDNO:39 | | | | L..... | | Q..... | A 120 |
| SEQIDNO:40 | | S..... | R..... | L..... | | L..... | A 120 |
| SEQIDNO:41 | | S..... | R..... | L..... | | L..... | A 120 |
| SEQIDNO:42 | | S..... | R..... | L..... | | L..... | A 120 |
| SEQIDNO:43 | | S..... | R..... | L..... | | L..... | A 120 |

Фиг. 3В



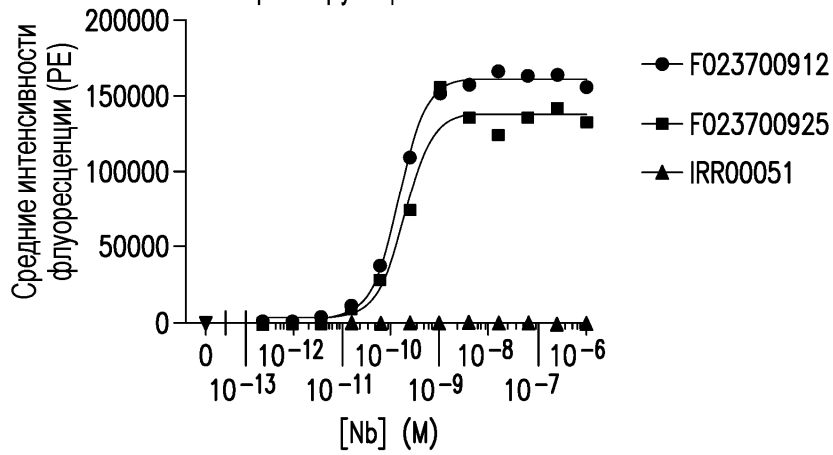
Фиг. 4

FACS связывание F023700912 и F023700925 с клетками линии Jurkat, экспрессирующими CTLA4 человека



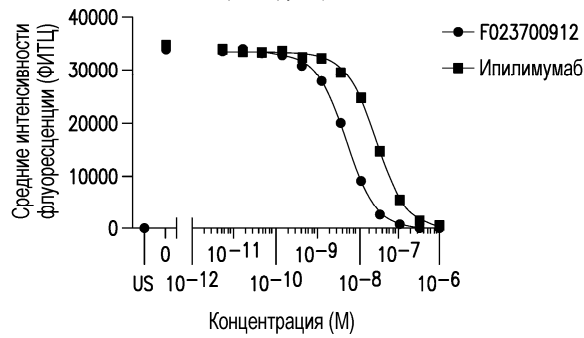
Фиг. 5А

FACS связывание F023700912 и F023700925 клетками CHO-K1, экспрессирующими CTLA4 человека



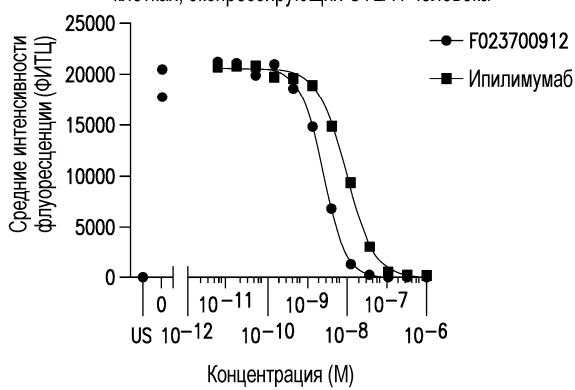
Фиг. 5В

FACS концентрация относительно CD80 человека (10×ЕС30) на CHO-K1 клетках, экспрессирующих CTLA4 человека



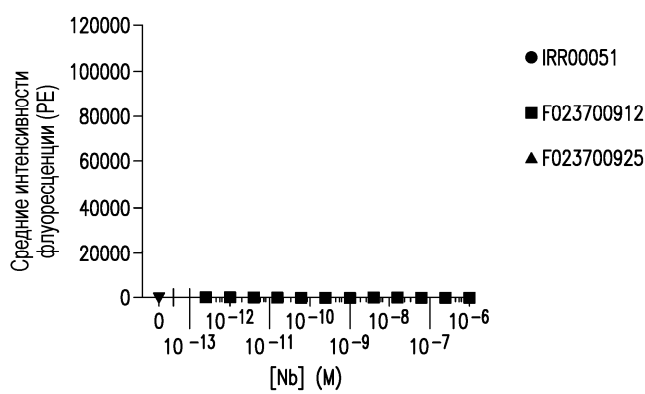
Фиг. 6А

FACS концентрация относительно CD86 человека (10×ЕС30) на CHO-K1 клетках, экспрессирующих CTLA4 человека



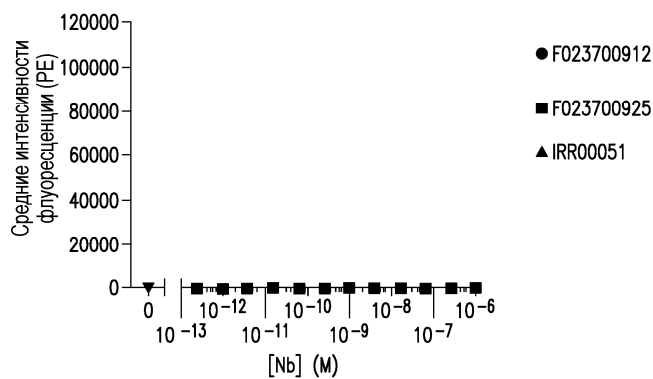
Фиг. 6B

FACS связывание F023700912 и F023700925 с L клетками



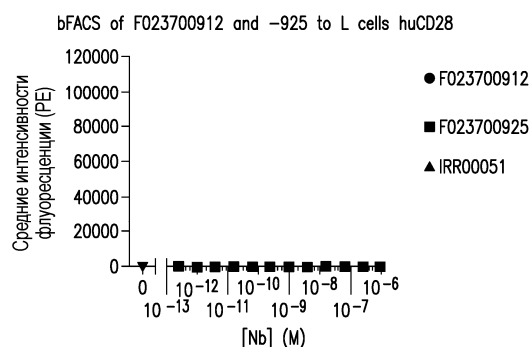
Фиг. 7A

FACS связывание F023700912 и F023700925 с клетками CHO-K1



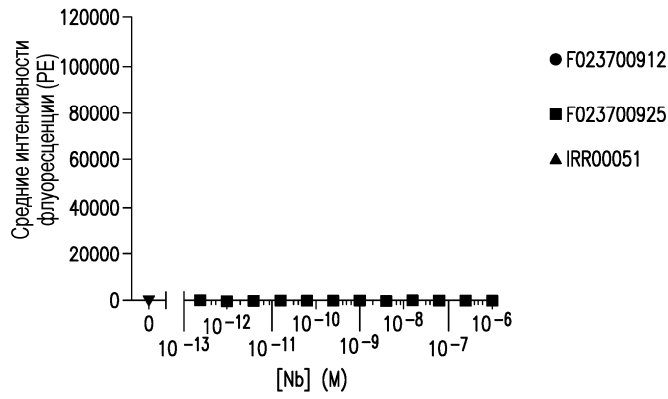
Фиг. 7B

FACS связывание F023700912 и F023700925 с L клетками huCD28



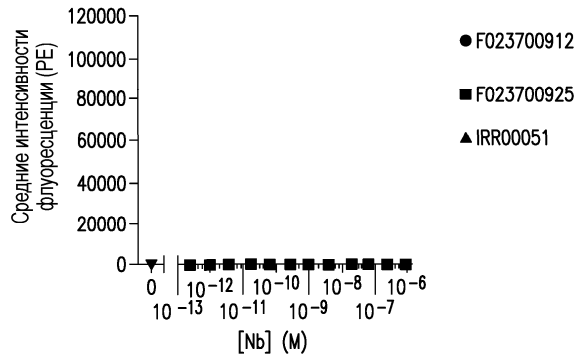
Фиг. 7C

FACS связывание F023700912 и F023700925 с L клетками huCD8альфа



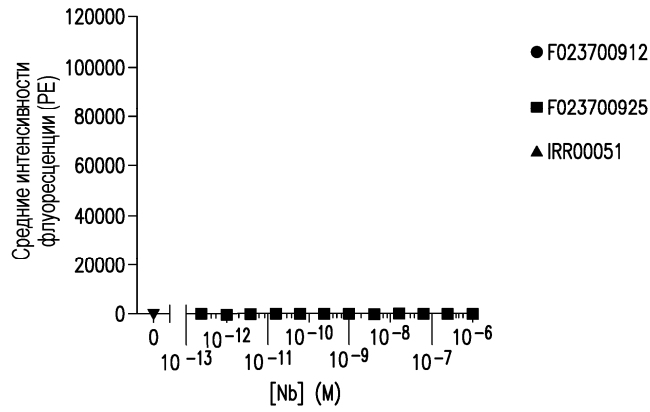
Фиг. 7D

FACS связывание F023700912 и F023700925 с CHO-K1 huLAG3 клетками



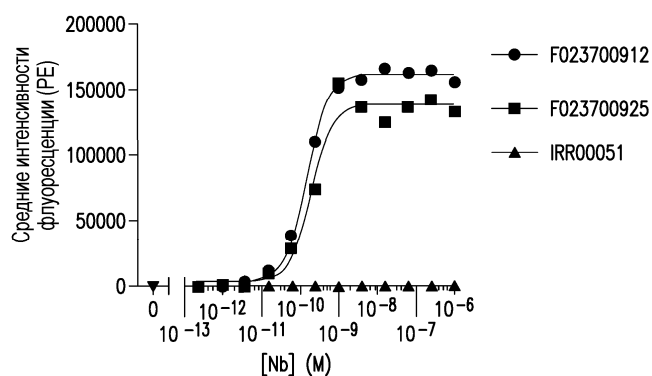
Фиг. 7E

FACS связывание F023700912 и F023700925 с CHO-K1 huBTLA клетками



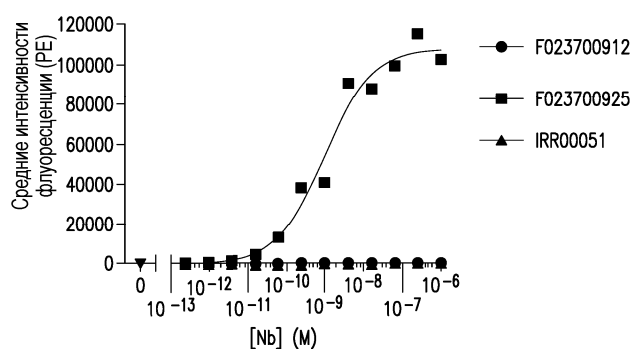
Фиг. 7F

FACS связывание F023700912 и F023700925 с CHO-K1 huCTLA4 клетками



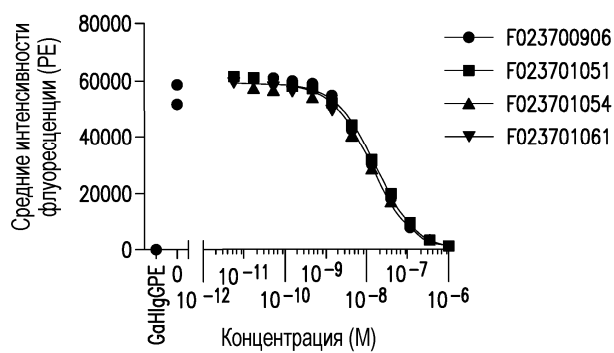
Фиг. 7G

FACS связывание F023700912 и F023700925 с CHO-K1 huPD1 клетками



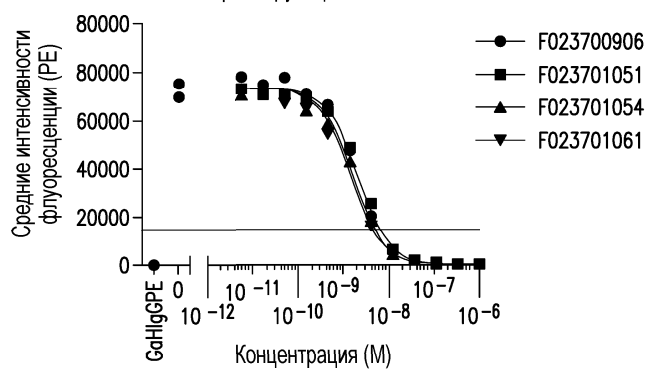
Фиг. 7H

сFACS относительно CD80 человека (EC30) на CHO-K1 клетках, экспрессирующих CTLA4 человека



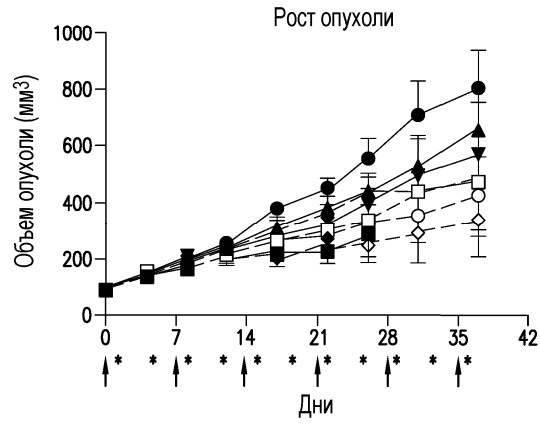
Фиг. 8A

сFACS относительно CD86 человека (EC30) на CHO-K1 клетках, экспрессирующих CTLA4 человека

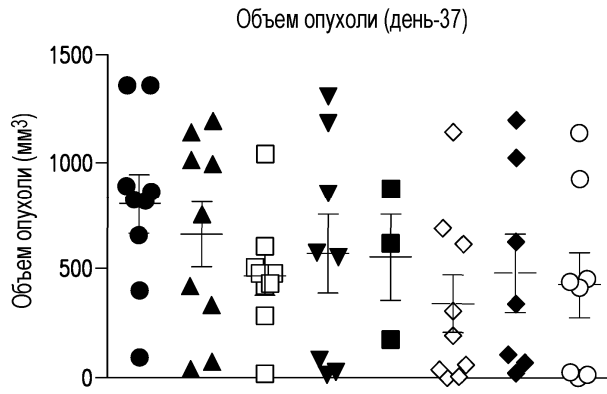


Фиг. 8B

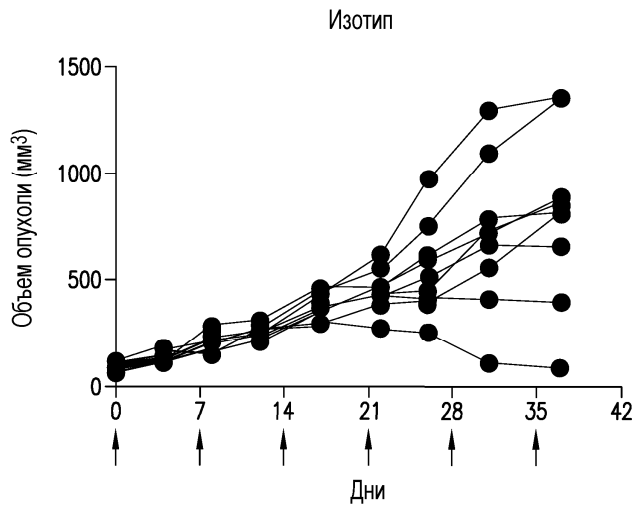
- Изотип
- Ипилимумаб+Пембролизумаб
- ▲ Ипилимумаб (N297A)
- ◇ CTLA4 Nab-5
- Ипилимумаб
- ◆ CTLA4 Nab-15
- ▼ Пембролизумаб
- Пембролизумаб + CTLA4 Nab-15



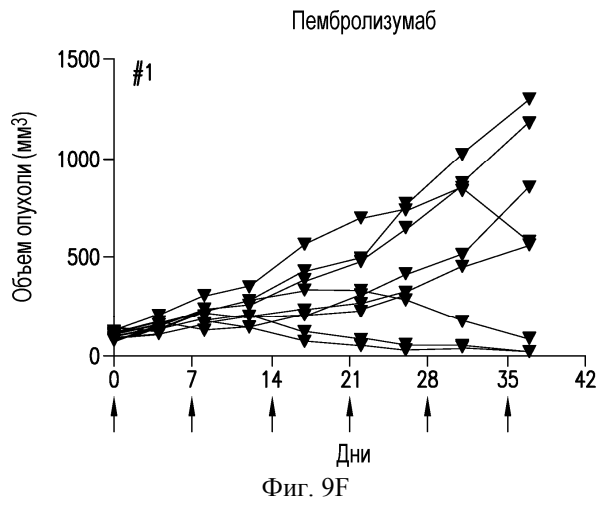
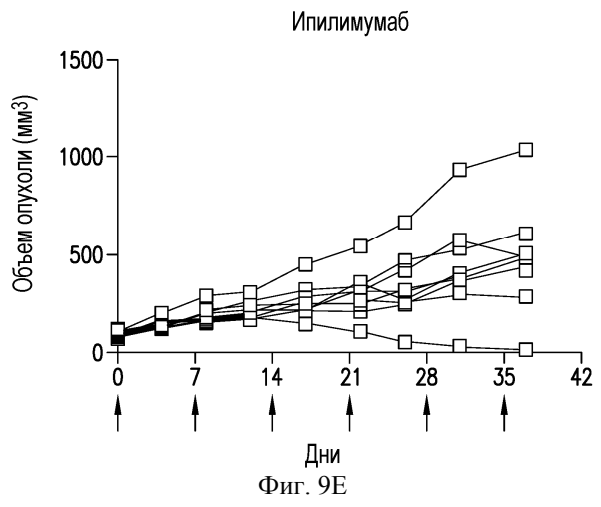
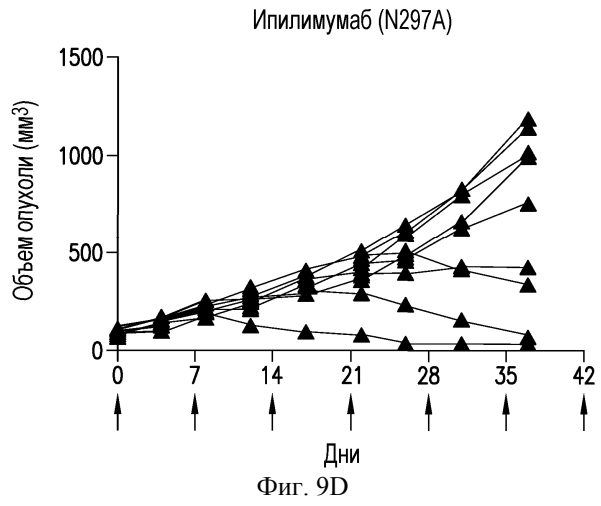
Фиг. 9А

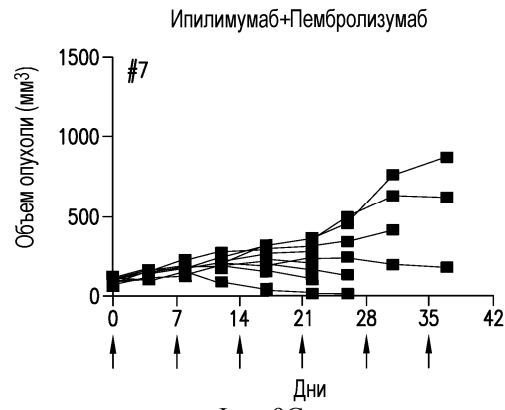


Фиг. 9В

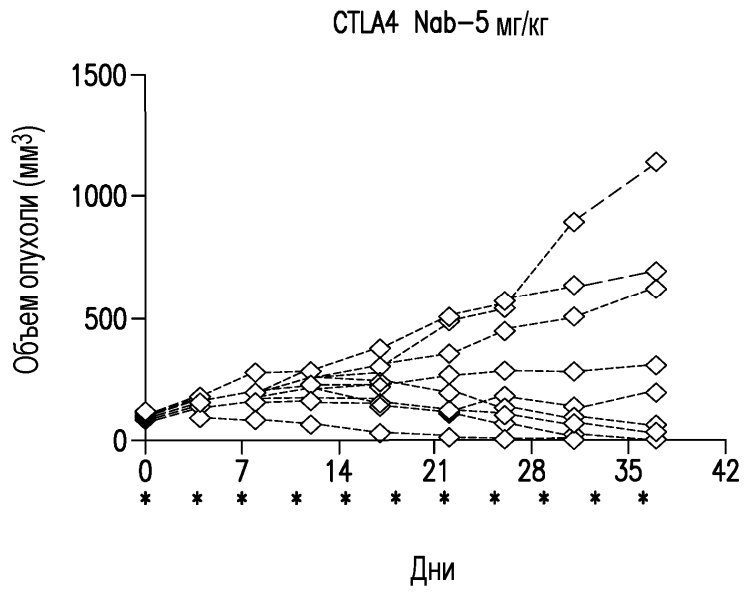


Фиг. 9С

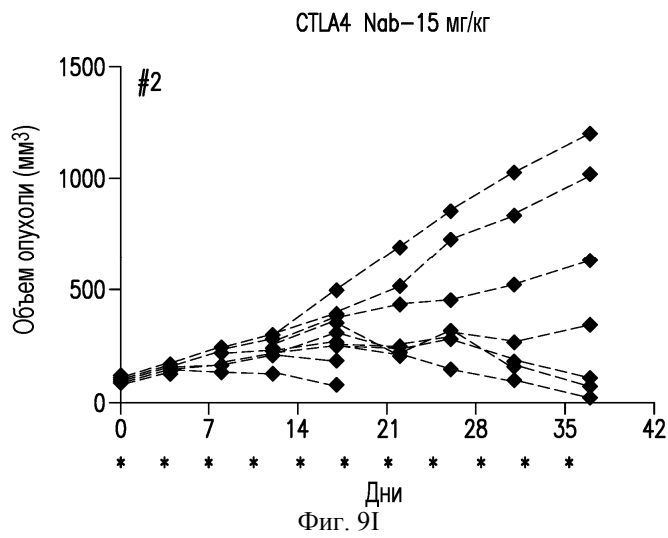




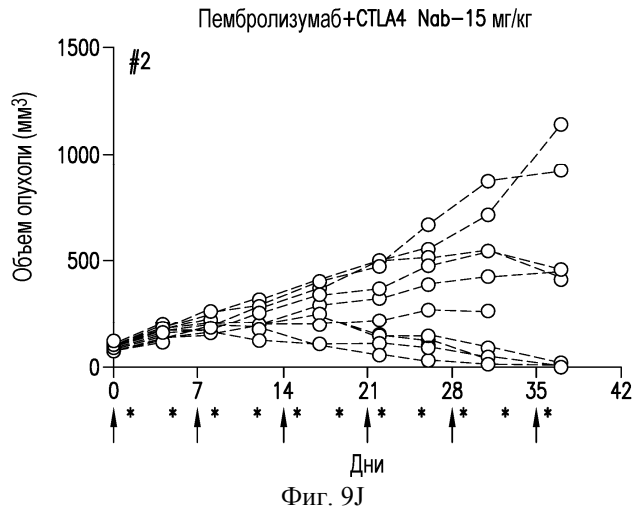
Фиг. 9G



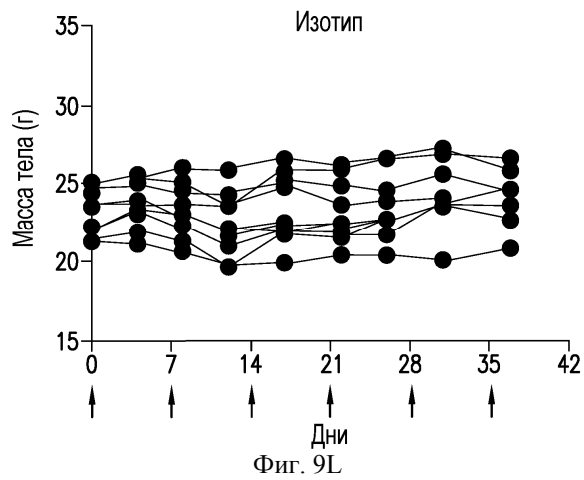
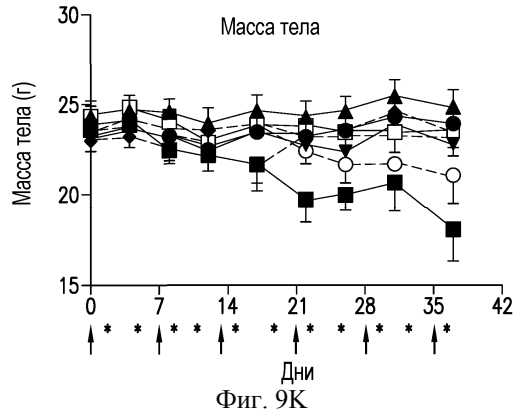
Фиг. 9H



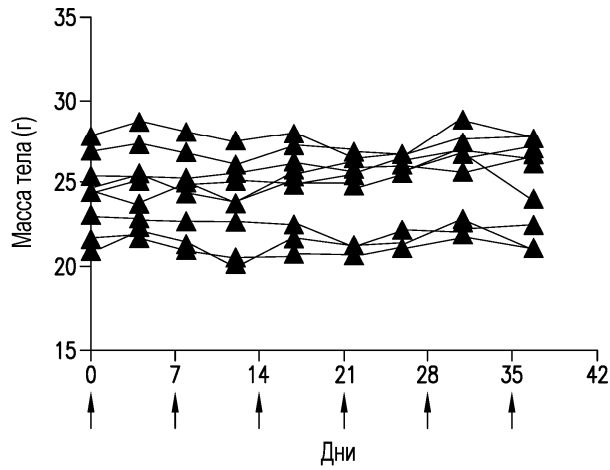
Фиг. 9I



- Изотип
- ▲ Ипилимумаб (N297A)
- Ипилимумаб
- ▼ Пембролизумаб
- Ипилимумаб+Пембролизумаб
- ◇ CTLA4 Nab-5
- ◆ CTLA4 Nab-15
- Пембролизумаб + CTLA4 Nab-15

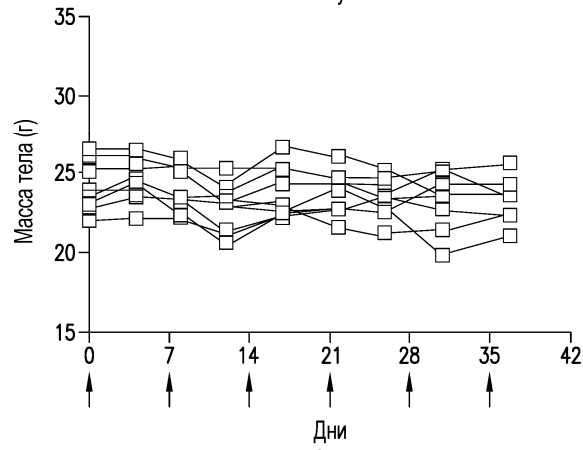


Ипилимумаб (N297A)



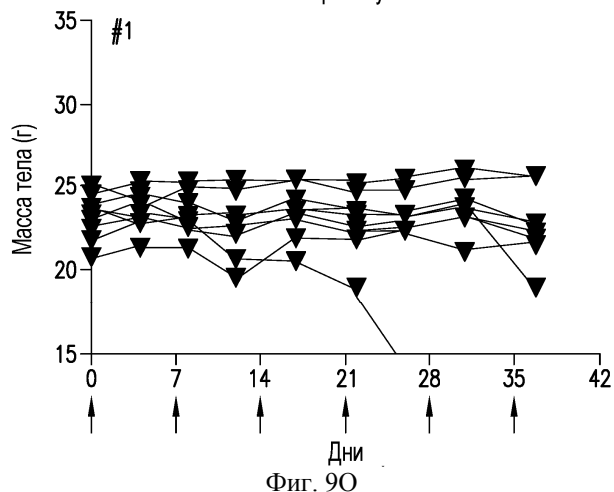
Фиг. 9М

Ипилимумаб

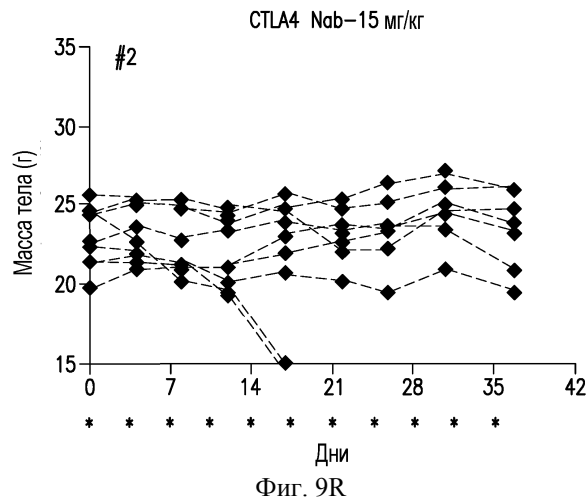
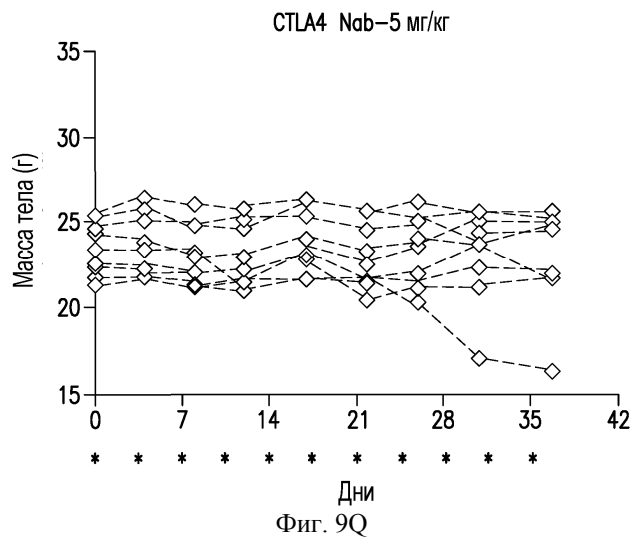
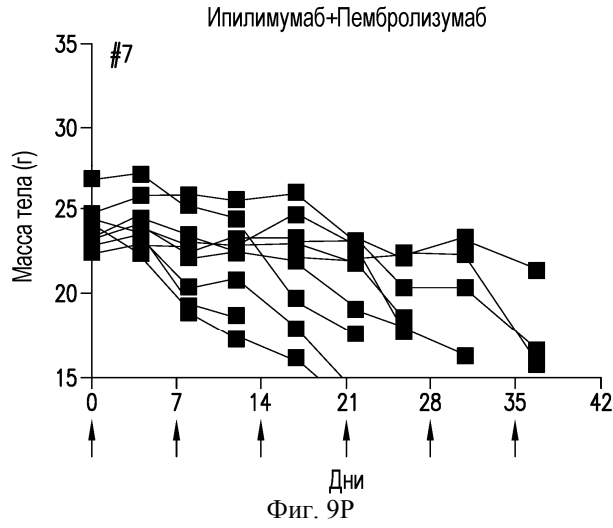


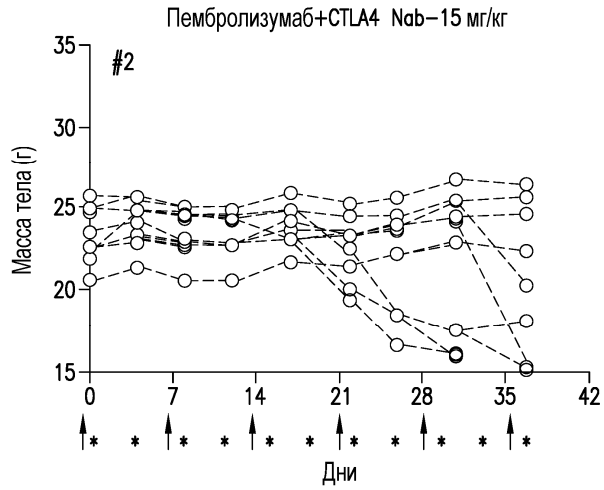
Фиг. 9N

Пембролизумаб

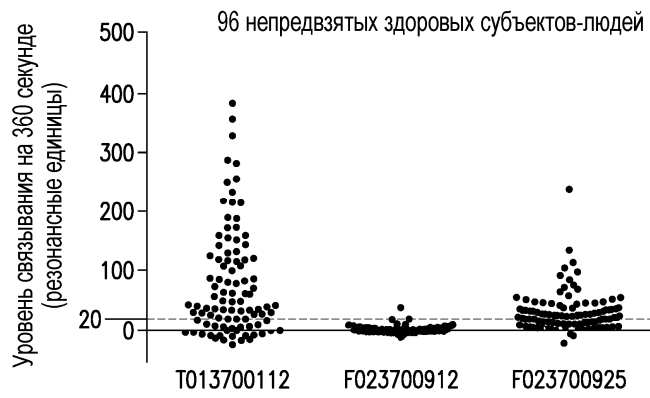


Фиг. 9O

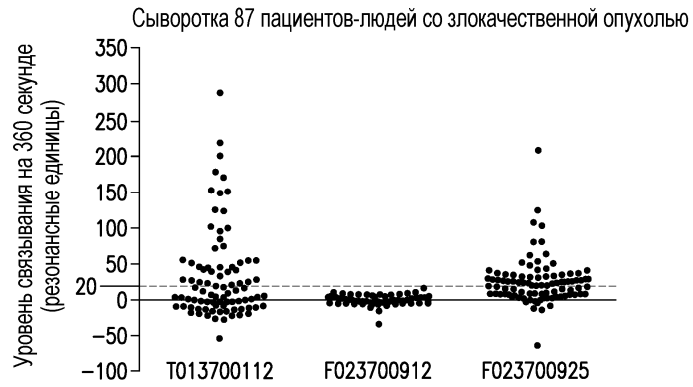




Фиг. 9S



Фиг. 10А



Фиг. 10В

| Нанотело | Описание |
|------------|--|
| F023700906 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023700912 | 4CTLA011F01(E1D,L11V,A14P,Q45R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-35GS-4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-35GS-ALB11002-A |
| F023700914 | 4CTLA011F01(E1D,L11V,A14P,Q45R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-35GS-ALB11002-A |
| F023701047 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73S,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701048 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73V,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701049 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73G,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701050 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701051 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73Q,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701052 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73M,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701053 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73H,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701054 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73T,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701055 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73D,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701056 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73E,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701057 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73W,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701058 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73F,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701059 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73K,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701060 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73A,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701061 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73Y,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |
| F023701062 | 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73P,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-FLAG3-HIS6 |

Фиг. 11

>PF023700906.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHDGDKDHDIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 93)

>PF023700912.1 4CTLA011F01(E1D,L11V,A14P,Q45R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 35GS-4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-35GS-ALB11002-A
 DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
 GGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTIS
 RDNSKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
 GSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGR
 FTISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSA (SEQ ID NO: 62)

>F023700914 4CTLA011F01(E1D,L11V,A14P,Q45R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 35GS-ALB11002-A
 DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
 GGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTIS
 RDNAKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSA (SEQ ID NO: 64)

>PF023701047.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73S,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHDGDKDHDIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 94)

>PF023701048.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73V,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHDGDKDHDIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 95)

>PF023701049.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73G,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHDGDKDHDIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 96)

>PF023701050.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73R,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDRS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHDGDKDHDIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 97)

Фиг. 12А

>PF023701051.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73Q,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRQDS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 98)

>PF023701052.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73M,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRQDS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 99)

>PF023701053.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73H,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRQDS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 100)

>PF023701054.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73T,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRQDS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 101)

>PF023701055.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73D,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRQDS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 102)

>PF023701056.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73E,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDES
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 103)

>PF023701057.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73W,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRQDS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 104)

>PF023701058.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73F,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
 FLAG3-HIS6
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDFS
 KNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGLVTVSSAAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAHHH
 HHH (SEQ ID NO: 105)

Фиг. 12В

>PF023701059.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73K,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
FLAG3-HIS6

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDKS
KNTVYLMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGTLLTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHH
HHH (SEQ ID NO: 106)

>PF023701060.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73A,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
FLAG3-HIS6

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDS
KNTVYLMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGTLLTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHH
HHH (SEQ ID NO: 107)

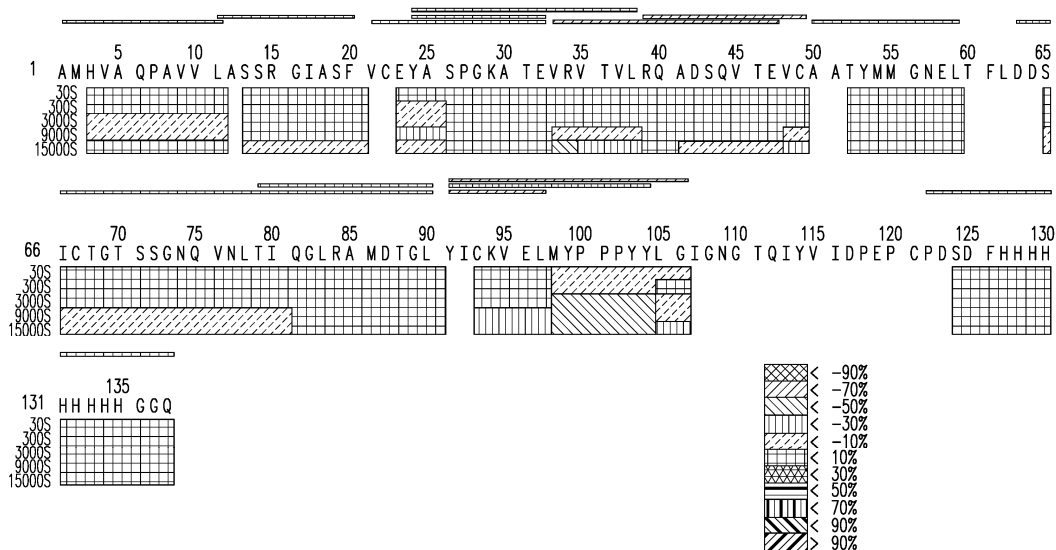
>PF023701061.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73Y,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
FLAG3-HIS6

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDS
KNTVYLMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGTLLTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHH
HHH (SEQ ID NO: 108)

>PF023701062.1 4CTLA011F01(L11V,A14P,Q45R,N73P,A74S,K83R,V89L,M96P,Q108L)-
FLAG3-HIS6

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEREVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDP
KNTVYLMNSLRPEDTALYYCAAEPGSGISGWDYWGQGTLLTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHH
HHH (SEQ ID NO: 109)

Фиг. 12С



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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