



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2019128430, 25.06.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

30.03.2012 US 13/435,567;  
14.06.2012 EP PCT/EP2012/061304;  
23.06.2011 US 61/500,360;  
23.06.2011 US 61/500,464;  
30.09.2011 EP PCT/EP2011/067132;  
30.09.2011 US 61/541,368

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2014102007 22.01.2014

(43) Дата публикации заявки: 25.10.2019 Бюл. № 30

Адрес для переписки:

101000, Москва, ул. Мясницкая, д. 13, стр. 5,  
ООО "Союзпатент"

(71) Заявитель(и):

**АБЛИНКС НВ (ВЕ)**

(72) Автор(ы):

**БАУМЕЙСТЕР, Юдит (ВЕ),**  
**БУШ, Мари-Поль, Люсьен, Арманда (ВЕ),**  
**БУТТОН, Карло (ВЕ),**  
**БЕЙСЕ, Мари-Анж (ВЕ),**  
**СНУК, Верле (ВЕ),**  
**СТАЛЕНС, Стефани (ВЕ)**

(54) **МЕТОДЫ ПРЕДСКАЗАНИЯ, ОБНАРУЖЕНИЯ И УМЕНЬШЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ  
ИНТЕРФЕРЕНЦИИ БЕЛКОВ В СПОСОБАХ АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДИНОЧНЫХ  
ВАРИАБЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ**

## (57) Формула изобретения

1. Способ предсказания, порождает ли ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, белковую интерференцию при иммуноанализе, таком как ADA-анализ, при этом указанный способ, включает проведение иммуноанализа, содержащего, по меньшей мере, стадии:

(i) контактирования указанного ISV или белка/полипептида с антителом, которое было получено от человеческого субъекта и было выбрано/выделено исходя из его способности распознавать и/или связываться с С-концом указанного ISV; и

(ii) установления, связывается ли указанный ISV, белок или полипептид с указанным антителом в указанном иммуноанализе.

2. Способ по п. 1, согласно которому ISV является VHH, оптимизированным по последовательности VHH, гуманизированным VHH или камелизированным VH или является иным типом ISV, то есть иной чем VHH, чем оптимизированный по последовательности VHH, чем гуманизированный VHH или чем камелизированный VH, и который является VH доменом или который содержит VH домен.

3. Способ по любому из пп. 1 или 2, согласно которому ISV является VHH, оптимизированным по последовательности VHH, гуманизированным VHH или камелизированным VH.

4. Способ по любому из пп. 1-3, согласно которому белок или полипептид имеет

указанный ISV на его С-конце.

5. Способ по любому из пп. 1-4, согласно которому тот факт, что ISV, белок или полипептид связывается с указанным антителом на стадии (ii) означает, что ISV, белок или полипептид может порождать, или имеет высокий или повышенный риск порождения такой белковой интерференции.

6. Способ по любому из пп. 1-5, согласно которому антитело является поликлональным антителом.

7. Способ по любому из пп. 1-6, согласно которому антитело является поликлональным антителом, которое было получено начиная с биологического образца, который был получен от человека и который является пригодным в качестве исходного материала для получения поликлональных антител с помощью метода, который включает, по меньшей мере, одну стадию (иммуно)аффинной хроматографии, в которой используется аффинная матрица, которая несет ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, и/или в котором ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, используется в качестве аффинной группы или антигена, и необязательно одну или более дополнительных стадий выделения и/или очистки поликлонального антитела из указанного образца осуществляемых или до и/или после указанной аффинной стадии.

8. Способ по п. 7, согласно которому ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, который нанесен на аффинную матрицу и/или который используется в качестве аффинной группы или антигена, представляет собой ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, который оканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33), или согласно которому ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, который нанесен на аффинную матрицу и/или который используется в качестве аффинной группы или антигена, имеет на своем С-конце ISV или VHH, оптимизированный по последовательности VHH, гуманизированный VHH или камелизированный VH, который оканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33).

9. Способ по любому из пп. 7 или 8, согласно которому ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, который нанесен на аффинную матрицу и/или который используется в качестве аффинной группы или антигена, представляет собой ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, который заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33) и который имеет остаток пролина в положении 14; или согласно которому ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, который нанесен на аффинную матрицу и/или который используется в качестве аффинной группы или антигена, имеет на своем С-конце ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, который заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33) и который имеет остаток пролина в положении 14.

10. Способ по любому из пп. 7-9, согласно которому ISV или VHH, оптимизированный по последовательности VHH, гуманизированный VHH или камелизированный VH, который нанесен на аффинную матрицу и/или который используется в качестве аффинной группы или антигена, представляет собой оптимизированный по последовательности и/или гуманизированный VHH или оптимизированный по последовательности и/или камелизированный VH, такой как камелизированный человеческий VH; или согласно которому лекарственное средство на основе ISV или лекарственное средство на основе VHH, оптимизированного по последовательности VHH, гуманизированного VHH или камелизированного VH, которое нанесено на

аффинную матрицу и/или которое используется в качестве аффинной группы или антигена, имеет на своем С-конце ISV или VHH, оптимизированный по последовательности VHH, гуманизированный VHH или камелизированный VH, который представляет собой оптимизированный по последовательности и/или гуманизированный VHH или оптимизированный по последовательности и/или камелизированный VH, такой как камелизированный человеческий VH.

11. Способ по любому из пп. 9 или 10, согласно которому ISV или VHH, оптимизированный по последовательности VHH, гуманизированный VHH или камелизированный VH, которое нанесено на аффинную матрицу и/или которое используется в качестве аффинной группы или антигена, представляет собой оптимизированный по последовательности и/или гуманизированный VHH или оптимизированный по последовательности и/или камелизированный VH, который заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33) и которое имеет остаток пролина в положении 14, который был введен в рамках гуманизации и/или оптимизации последовательности соответствующего природного VHH; или согласно которому лекарственное средство на основе ISV или лекарственное средство на основе VHH, оптимизированного по последовательности VHH, гуманизированного VHH или камелизированного VH, которое нанесено на аффинную матрицу и/или которое используется в качестве аффинной группы или антигена, имеет на своем С-конце оптимизированный по последовательности и/или гуманизированный VHH или оптимизированный по последовательности и/или камелизированный VH, который заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33) и который имеет остаток пролина в положении 14, который был введен в рамках гуманизации и/или оптимизации последовательности соответствующего природного VHH.

12. Способ по любому из пп. 1-5, согласно которому антитело является моноклональным антителом.

13. Способ по любому из пп. 1-5 или 12, согласно которому антитело является поликлональным антителом, которое получают начиная от биологического образца, полученного от человека, и который является пригодным в качестве исходного материала для получения моноклонального антитела способом, который включает, по меньшей мере, одну стадию скрининга или селекции, в котором ISV, VHH, оптимизированный по последовательности VHH, гуманизированный VHH или камелизированный VH, лекарственное средство на основе ISV или лекарственное средство на основе VHH, оптимизированного по последовательности VHH, гуманизированного VHH или камелизированного VH, используется для скрининга и селекции моноклонального антитела, которое связывается с указанным ISV, VHH, оптимизированным по последовательности VHH, гуманизированным VHH или камелизированным VH, лекарственным средством на основе ISV или лекарственным средством на основе VHH, оптимизированного по последовательности VHH, гуманизированного VHH или камелизированного VH, и в частности с его С-концом, и необязательно одну или более дополнительных стадий выделения и/или очистки моноклонального антитела из указанного образца, осуществляемых или до и/или после указанной стадии(й) скрининга и/или селекции.

14. Способ по п. 13, согласно которому ISV или VHH, оптимизированный по последовательности VHH, гуманизированный VHH или камелизированный VH, который используется на стадии скрининга или селекции, заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33), или согласно которому лекарственное средство на основе ISV или лекарственное средство на основе VHH, оптимизированного по последовательности VHH, гуманизированного VHH или

А  
0  
3  
4  
8  
1  
6  
1  
0  
2  
R  
U

RU  
2  
0  
1  
9  
1  
2  
8  
4  
3  
0  
A

камелизированного VH, которое используется на стадии скрининга или селекции, имеет на своем С-конце ISV или VHN, оптимизированный по последовательности VHN, гуманизированный VHN или камелизированный VH, который заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33).

15. Способ по п. 13 или 14, в котором ISV или VHN, оптимизированный по последовательности VHN, гуманизированный VHN или камелизированный VH, который используется на стадии скрининга или селекции, заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33) и который имеет остаток пролина в положении 14, или в котором лекарственное средство на основе ISV или лекарственное средство на основе VHN, оптимизированного по последовательности VHN, гуманизированного VHN или камелизированного VH, которое используется на стадии скрининга или селекции, имеет на своем С-конце ISV или VHN, оптимизированный по последовательности VHN, гуманизированный VHN или камелизированный VH, который заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33) и который имеет остаток пролина в положении 14.

16. Способ по пп. 13, 14 или 15, в котором ISV или VHN, оптимизированный по последовательности VHN, гуманизированный VHN или камелизированный VH, который используется на стадии скрининга или селекции, представляет собой оптимизированный по последовательности и/или гуманизированный VHN или оптимизированный по последовательности и/или камелизированный VH, такой как камелизированный человеческий VH; или в котором лекарственное средство на основе ISV или лекарственное средство на основе VHN, оптимизированного по последовательности VHN, гуманизированного VHN или камелизированного VH, которое используется на стадии скрининга или селекции, имеет на своем С-конце ISV или VHN, оптимизированный по последовательности VHN, гуманизированный VHN или камелизированный VH, который является оптимизированным по последовательности и/или гуманизированным VHN, или оптимизированным по последовательности и/или камелизированным VH, такой как камелизированный человеческий VH.

17. Способ по любому из пп. 15-16, в котором ISV или VHN, оптимизированный по последовательности VHN, гуманизированный VHN или камелизированный VH, который используется на стадии скрининга или селекции, представляет собой оптимизированный по последовательности и/или гуманизированный VHN или оптимизированный по последовательности и/или камелизированный VH, который заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33) и который имеет остаток пролина в положении 14, который был введен в рамках гуманизации и/или оптимизации последовательности соответствующего природного VHN; или в котором лекарственное средство на основе ISV или лекарственное средство на основе VHN, оптимизированного по последовательности VHN, гуманизированного VHN или камелизированного VH, которое используется на стадии скрининга или селекции, имеет на своем С-конце оптимизированный по последовательности и/или гуманизированный VHN или оптимизированный по последовательности и/или камелизированный VH, который заканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS (SEQ ID NO:33) и который имеет остаток пролина в положении 14, который был введен в рамках гуманизации и/или оптимизации последовательности соответствующего природного VHN.

18. Способ по п. 1, где указанный способ включает проведение иммуноанализа, который, по меньшей мере, содержит этапы:

(i) контактирования указанного ISV или VHN, оптимизированного по последовательности VHN, гуманизированного VHN или камелизированного VH, или лекарственного средства на основе ISV или на основе VHN, оптимизированного по

А  
0  
2  
0  
1  
9  
1  
2  
8  
4  
3  
0  
А  
R  
U

RU  
2  
0  
1  
9  
1  
2  
8  
4  
3  
0  
А

последовательности VHH, гуманизированного VHH или камелизированного VH, с моноклональным антителом 21-4, экспрессируемым клеточной линией гибридомы, задепонированной под учетным номером LMBP-9680-CB, т.е. используемым в качестве “аналитического антитела”; и

(ii) определения, связывается ли указанный ISV или VHH, оптимизированный по последовательности VHH, гуманизированный VHH или камелизированный VH или лекарственное средство на основе ISV или на основе VHH, оптимизированного по последовательности VHH, гуманизированного VHH или камелизированного VH указанным моноклональным антителом 21-4 в указанном иммуноанализе.

19. Способ по п. 18, который также может использоваться для предсказания, будет ли ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, порождать, или имеет высокую или повышенную склонность к порождению, белковую интерференцию в иммуноанализе.

20. Способ по п. 18, который также может использоваться для предсказания, будет ли указанный ISV или белок или полипептид, содержащий, по меньшей мере, один ISV, связываться фактором(ами) интерференции, присутствующим в крови или сыворотке человека.

21. Способ по п. 18, согласно которому ISV является или VHH, оптимизированным по последовательности VHH, гуманизированным VHH или камелизированным VH или другим ISV, т.е. отличным от VHH, оптимизированного по последовательности VHH, гуманизированного VHH или камелизированного VH, который является VH-доменом или который содержит VH-домен.

22. Способ по п. 18 или 19, согласно которому ISV является VHH, оптимизированным по последовательности VHH, гуманизированным VHH или камелизированным VH.

23. Способ по любому из пп. 18–22, согласно которому белок или полипептид имеет указанный ISV на его С-конце.

24. Способ по любому из пп. 18–23, который осуществляется согласно протоколу, указанному в Примере 9.

25. Способ уменьшения склонности ISV, который оканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS, порождать белковую интерференцию при анализе антилекарственных антител, при этом указанный способ, включает модификацию указанного ISV путем добавления от 1 до 10 аминокислотных остатков, каждый независимо выбран из любой природной аминокислоты, к указанному С-концу, так что склонность порождать белковую интерференцию значительно снижается по сравнению с ISV, который оканчивается на своем С-конце аминокислотной последовательностью VTVSS.

26. Способ по п. 25, который включает добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков к С-концу ISV.

27. Способ по п. 25 или 26, где указанные аминокислотные остатки независимо выбраны из аланина, глицина, валина, лейцина или изолейцина.

28. Способ по любому из пп. 25-27, который также включает введение одной или нескольких аминокислотных замен, вставок или делеций в С-концевую область ISV, где эта С-концевая область содержит С-концевую последовательность VTVSS (SEQ ID NO:33) и аминокислотные остатки в положениях 11, 13, 14, 15, 82, 82a, 82b, 83, 84, 107 и 108.

29. Способ по п. 28, который включает введение одной или нескольких аминокислотных замен в С-концевую область ISV.

30. Способ по любому из пп. 25-29, где уменьшение склонности порождать белковую интерференцию определяется с использованием способа по любому из пп. 1-22.

31. Применение С-концевого удлинения для уменьшения склонности ISV, порождать

белковую интерференцию, где указанное С-концевое удлинение добавляется к С-концу аминокислотной последовательностью VTVSS(SEQ ID NO:33) в ISV, и оно содержит 1-10 аминокислотных остатков, независимо выбранных из любой природной аминокислоты.

32. Применение по п. 31, где С-концевое удлинение включает 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков.

33. Применение по п. 31 или 32, где указанные аминокислотные остатки независимо выбраны из аланина, глицина, валина, лейцина или изолейцина.

34. Применение по любому из пп. 31-33, где указанное С-концевое удлинение имеет формулу (X)<sub>n</sub>, где:

а) n = 1, 2 или 3 где каждый X = Ala или Gly; или

б) n = 1, 2 or 3 где каждый X = Ala; или

с) n = 1, 2 or 3 где каждый X = Gly; или

д) n = 2 или 3 где по меньшей мере один X = Ala или Gly; или

е) n = 2 или 3 где все кроме одного X = Ala или Gly,

35. Применение по п. 34, где указанное С-концевое удлинение имеет формулу (X)<sub>n</sub>, где:

а) X является Ala и n равно 1, 2 или 3; или

б) X является Gly и n равно 2 или 3.

36. Применение по п. 34, где указанное С-концевое удлинение имеет формулу (X)<sub>n</sub>, где X является Ala и n равно 1.