

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2019104889, 02.08.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

02.08.2016 US 62/370,201;

14.04.2017 US 62/485,671

(43) Дата публикации заявки: 04.09.2020 Бюл. № 25

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 04.03.2019

(86) Заявка РСТ:

US 2017/045126 (02.08.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2018/052556 (22.03.2018)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

**ВИСТЕРРА, ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**ВИСВАНАТХАН, Картик (US),  
РАМАКРИШНАН, Боопати (US),  
БУТ, Брайан (US),  
НАРАЙАН, Кристин (US),  
УОЛЛЕКОТТ, Эндрю, М. (US)**(54) **ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

## (57) Формула изобретения

1. Полипептид, содержащий Fc-область, где Fc-область содержит мутацию, где полипептид имеет 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или все из следующих свойств:

а) имеет увеличенную аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) при pH от 6,0 до 6,5 по сравнению с эталонным полипептидом;

б) имеет более высокую аффинность связывания с FcRn при pH между 6,0 и 6,5, чем аффинность связывания при pH между 7,0 и 7,4;

с) связывается с FcRn при pH от 6,0 до 6,5 с константой диссоциации ( $K_d$ ), равной 300 нМ или ниже;

д) связывается с FcRn при pH от 7,0 до 7,4 с  $K_d$ , равной 50 нМ или выше;

е) имеет одинаковую, по существу одинаковую или увеличенную аффинность связывания с рецептором Fcγ по сравнению с эталонным полипептидом;

ф) имеет одинаковую или по существу одинаковую термостабильность по сравнению с эталонным полипептидом;

г) имеет одинаковую, по существу одинаковую или увеличенную аффинность связывания с C1q по сравнению с эталонным полипептидом;

h) имеет одинаковую, по существу одинаковую или увеличенную аффинность связывания с TRIM21 по сравнению с эталонным полипептидом;

и) имеет эффекторную функцию, которая является одинаковой, по существу одинаковой или увеличенной по сравнению с эталонным полипептидом;

ж) имеет повышенный период полураспада *in vivo* по сравнению с эталонным полипептидом;

к) имеет биологическую функцию *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*, которая является одинаковой, по существу одинаковой или увеличенной по сравнению с эталонным полипептидом;

л) имеет показатели для развития, которые являются одинаковыми или по существу одинаковыми по сравнению с эталонным полипептидом;

м) имеет одинаковую, по существу одинаковую или увеличенную аффинность, специфичность связывания, или обе, для эпитопа по сравнению с эталонным полипептидом; или

н) имеет повышенное поглощение слизистой по сравнению с эталонным полипептидом, и

где полипептид обладает, по меньшей мере, свойствами а), б) и одним, двумя, тремя, четырьмя или всеми из свойств е), ф), г), h) или и).

2. Полипептид по п. 1, который имеет, по меньшей мере, свойства а), б), с), d) и одно, два, три, четыре или все из свойств е), ф), г), h) или и).

3. Полипептид по п. 1 или 2, который имеет, по меньшей мере, свойства а), б), одно, два, три, четыре или все из свойств е), ф), г), h) или и) и одно, два, три, четыре, пять, шесть или все из свойств с), d), j), к), л), м) или н).

4. Полипептид по любому из пп. 1-3, который имеет, по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 раз более высокую аффинность связывания для FcRn при pH 6,0 по сравнению с эталонным полипептидом, как определено анализом на основе системы Octet или клеточным анализом.

5. Полипептид по любому из пп. 1-4, который имеет, по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 50 раз более высокую аффинность связывания для FcRn при pH 6,0, чем при pH 7,4, как определено анализом на основе системы Octet или клеточным анализом.

6. Полипептид по любому из пп. 1-5, который связывается с FcRn при pH 6,0 с константой диссоциации ( $K_d$ ), равной 250 нМ или ниже, 200 нМ или ниже, 150 нМ или ниже, 100 нМ или ниже, 50 нМ или ниже, 25 нМ или ниже, 10 нМ или ниже, 5 нМ или ниже, 2 нМ или ниже, 1 нМ или ниже, 0,5 нМ или ниже, 0,2 нМ или ниже, 0,1 нМ или ниже, 0,05 нМ или ниже, 0,02 нМ или ниже, 0,01 нМ или ниже, от 25 нМ до 0,1 нМ, от 20 нМ до 0,5 нМ, от 15 нМ до 1 нМ, от 10 нМ до 5 нМ или от 20 нМ до 10 нМ, как определено анализом на основе системы Octet или клеточным анализом.

7. Полипептид по любому из пп. 1-6, который связывается с FcRn при pH 7,4 с  $K_d$ , равной 60 нМ или выше, 80 нМ или выше, 100 нМ или выше, 150 нМ или выше, 200 нМ или выше, 500 нМ или выше, от 50 нМ до 500 нМ или от 100 нМ до 250 нМ, как определено анализом на основе системы Octet или клеточным анализом.

8. Полипептид по любому из пп. 1-7, который имеет аффинность связывания для одного, двух или всех FcγRI, FcγRIIa/b или FcγRIII, которая уменьшается не более чем на 10%, 20%, 30%, 40%, или на 50%, или аффинность связывания для одного, двух или всех FcγRI, FcγRIIa/b или FcγRIII, которая увеличивается, по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4 или 5 раз по сравнению с эталонным полипептидом, как определено анализом на основе системы Octet или клеточным анализом.

9. Полипептид по любому из пп. 1-8, который имеет температуру плавления, которая повышается или снижается не более чем на 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C или 10°C по сравнению с эталонным полипептидом, как определено анализом с красителем Sypro Orange.

10. Полипептид по любому из пп. 1-9, который имеет аффинность связывания для C1q, которая уменьшается не более чем на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%, или аффинность связывания для C1q, которая увеличивается, по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4 или 5 раз по сравнению с эталонным полипептидом, как определено с использованием ELISA.

11. Полипептид по любому из пп. 1-10, который имеет аффинность связывания для TRIM21, которая уменьшается не более чем на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%, или аффинность связывания для TRIM21, которая увеличивается, по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4 или 5 раз по сравнению с эталонным полипептидом, как определено с использованием ELISA.

12. Полипептид по любому из пп. 1-11, который имеет уменьшение одного, двух, трех или всех из комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (ADCP) или антителозависимой внутриклеточной нейтрализации (ADIN) не более чем на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%, или увеличение одного, двух, трех или всех из комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (ADCP) или антителозависимой внутриклеточной нейтрализации (ADIN), по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4 или 5 раз по сравнению с эталонным полипептидом.

13. Полипептид по любому из пп. 1-12, который имеет период полураспада *in vivo*, который увеличивается, по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению с эталонным полипептидом, как определено на животной модели.

14. Полипептид по любому из пп. 1-13, который имеет биологическую функцию *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*, которая уменьшается не более чем на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%, или биологическую функцию *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*, которая увеличивается, по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4 или 5 раз по сравнению с эталонным полипептидом.

15. Полипептид по любому из пп. 1-14, который имеет изменение одного, двух, трех или всех показателей из стабильности, растворимости, агрегации или экспрессии не более чем на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% по сравнению с эталонным полипептидом.

16. Полипептид по любому из пп. 1-15, который имеет аффинность, специфичность связывания, или обе, которая уменьшается не более чем на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%, или аффинность, специфичность связывания, или обе, которая увеличивается, по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4 или 5 раз по сравнению с эталонным полипептидом.

17. Полипептид по любому из пп. 1-16, который имеет повышенное поглощение слизистой, по меньшей мере, в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению с эталонным полипептидом, как определено анализом трансцитоза.

18. Полипептид по любому из пп. 1-4 или 8-17, где эталонный полипептид содержит Fc-область дикого типа, Fc-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную ей или которая отличается не более чем на 1, 2, 5, 10 или 15 аминокислотных остатков.

19. Полипептид по любому из пп. 1-18, где мутация находится в остатке в домене CH2.

20. Полипептид по любому из пп. 1-18, где мутация находится в остатке в домене CH3.

21. Полипептид по любому из пп. 1-20, включающий, по меньшей мере, одну мутацию в остатке в домене CH2 и, по меньшей мере, одну мутацию в остатке в домене CH3.

22. Полипептид по любому из пп. 1-21, дополнительно включающий мутацию в остатке в области, отличной от домена CH2 и/или домена CH3.

23. Полипептид по любому из пп. 1-22, где мутация не изменяет или существенно не

изменяет конформацию линкерной области между доменом СН2 и доменом СН3.

24. Полипептид по любому из пп. 1-23, где мутация не вносит 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более последовательных гидрофобных или ароматических остатков в поверхностной области.

25. Полипептид по любому из пп. 1-24, который включает молекулу антитела.

26. Полипептид по любому из пп. 1-25, который включает IgG.

27. Полипептид по любому из пп. 1-26, который включает IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

28. Полипептид по любому из пп. 1-27, который включает вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина или обе.

29. Полипептид по любому из пп. 1-28, который содержит тетрамер из двух вариабельных областей тяжелой цепи иммуноглобулина и двух вариабельных областей легкой цепи иммуноглобулина.

30. Полипептид по любому из пп. 1-29, который включает полноразмерную молекулу антитела.

31. Полипептид по любому из пп. 1-30, который включает фрагмент молекулы антитела.

32. Полипептид по любому из пп. 1-31, который включает молекулу химерного антитела или молекулу мышинового антитела.

33. Полипептид по любому из пп. 1-32, который включает молекулу человеческого антитела или молекулу гуманизированного антитела.

34. Полипептид по любому из пп. 1-24, который включает слитый белок.

35. Полипептид по любому из пп. 1-34, содержащий 1, 2, 3, 4 или все из следующих:

(i) мутации в остатке в поверхностной области, которая взаимодействует с FcRn;

(ii) мутации в остатке, который является периферическим остатком вдоль поверхности раздела Fc-FcRn;

(iii) мутации в остатке, который является неконтактным остатком в связывании Fc-FcRn;

(iv) мутации в остатке, который представляет контактный остаток спирали, которая усиливает конформационную динамику спирали, включающей 1, 2, 3, 4, 5 или все из P247, K248, D249, T250, L251 или M252; или

(v) мутации, которая модулирует рК гистидина и/или представляет введение гистидина вдоль поверхности раздела Fc-FcRn.

36. Полипептид по любому из пп. 1-35, содержащий мутацию в остатке в поверхностной области, которая взаимодействует с FcRn.

37. Полипептид по п.36, где мутация находится в остатке, выбранном из: L251, I253, R255, P257, H285, N286, K288, T307, V308, L309, Q311, L314, H310, H433, N434, H435, или Y436.

38. Полипептид по любому из пп. 1-37, включающий множество мутаций в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или всех остатках, выбранных из L251, I253, R255, P257, H285, N286, K288, T307, V308, L309, Q311, L314, H310, H433, N434, H435 или Y436.

39. Полипептид по любому из пп. 1-38, содержащий мутацию в остатке, который является периферическим остатком вдоль поверхности раздела Fc-FcRn.

40. Полипептид по п.39, где мутация находится в остатке, выбранном из M252, T256, T307, L309, Q311, H433, N434, Y436, N286 или K288.

41. Полипептид по любому из пп. 1-40, содержащий множество мутаций в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или всех остатках, выбранных из M252, T256, T307, L309, Q311, H433, N434, Y436, N286 или K288.

42. Полипептид по любому из пп. 1-41, содержащий мутацию, которая находится в остатке, который является неконтактным остатком в связывании Fc-FcRn.

43. Полипептид по п.42, где мутация находится в остатке, выбранном из A287, V308, N315, L314, L432, H429, E430 или A431.

44. Полипептид по любому из пп. 1-43, содержащий множество мутаций в 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всех остатках, выбранных из A287, V308, N315, L314, L432, H429, E430 или A431.

45. Полипептид по любому из пп. 1-44, содержащий мутацию в остатке, который находится в контактном остатке спирали, которая усиливает конформационную динамику спирали, включающей 1, 2, 3, 4, 5 или все из P247, K248, D249, T250, L251 или M252.

46. Полипептид по п.45, где мутация находится в остатке, выбранном из P244, P245, T250, L251, P247, E380, M428, A378, D376, P257, V308, A287, L306 или H427.

47. Полипептид по любому из пп. 1-46, содержащий множество мутаций в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или всех остатках, выбранных из P244, P245, T250, L251, P247, E380, M428, A378, D376, P257, V308, A287, L306 или H427.

48. Полипептид по любому из пп. 1-47, содержащий мутацию, которая представляет введение гистидина вдоль поверхности раздела Fc-FcRn.

49. Полипептид по любому из пп. 1-48, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более мутаций, или одну или более комбинаций мутаций, приведенных в таблице 1.

50. Полипептид по любому из пп. 1-49, где мутация является отличной от M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T, T256E или их комбинации.

51. Полипептид по любому из пп. 1-50, где мутация находится в остатке, отличном от остатка M252Y, S254T, T256E, L309N, T250, M428, N434, N434, T307, E380, N434, M252, S254, T256 или их комбинации.

52. Полипептид по любому из пп. 1-51, который не имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или всех из следующей мутации или мутаций:

- (i) M252Y, S254T, и T256E;
- (ii) L309N; (iii) T250Q и M428L;
- (iv) M428L и N434A;
- (v) N434A;
- (vi) T307A, E380A и N434A;
- (vii) M252W;
- (viii) V308F;
- (ix) V308F и N434Y; или
- (x) H435A.

53. Полипептид по любому из пп. 1-52, содержащий первую мутацию, выбранную из M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T или T256E и вторую мутацию, выбранную из мутации, приведенной в таблице 1, отличной от M252Y, S254T, T256E, L309N, T250Q, M428L, N434S, N434A, T307A, E380A, N434A, M252Y, S254T и T256E.

54. Полипептид по любому из пп. 1-53, дополнительно содержащий мутацию в Fc-области, которая усиливает эффекторную функцию.

55. Полипептид по п.54, где мутация находится в остатке, выбранном из S239, A330, I332, F243, G236 или их комбинации.

56. Полипептид по любому из пп. 1-55, дополнительно содержащий мутацию в Fc-области, которая снижает эффекторную функцию.

57. Полипептид по п.56, где мутация находится в остатке, выбранном из K322, L234, L235, P331, N297 или их комбинации.

58. Полипептид по любому из пп. 1-57, где Fc-область содержит:

(a) 1, 2, 3, 4, 5 или все комбинации мутаций, выбранных из: T256D/Q311V/A378V, H285N/T307Q/N315D, H285D/T307Q/A378V, T307Q/Q311V/A378V, T256D/N286D/T307R/

Q311V/A378V или T256D/T307R/Q311V;

(b) мутации или комбинации мутаций, способные нарушать эффекторную функцию Fc, или

(c) обе (a) и (b).

59. Полипептид по любому из пп. 1-58, который содержит мутации в остатках, выбранных из:

(i) T256, Q311 и A378;

(ii) H285, T307 и N315;

(iii) H285, T307 и A378;

(iv) T307, Q311 и A378;

(v) T256, N286, T307, Q311 и A378; или

(vi) T256, H285, T307, Q311 и A378.

60. Полипептид по любому из пп. 1-59, который содержит мутации, выбранные из:

(i) T256D, Q311V и A378V;

(ii) H285N, T307Q и N315D;

(iii) H285D, T307Q и A378V;

(iv) T307Q, Q311V и A378V;

(v) T256D, N286D, T307R, Q311V и A378V; или

(vi) T256D, H285D, T307R, Q311V и A378V.

61. Полипептид по любому из пп. 1-60, дополнительно содержащий мутацию в области, отличной от Fc-области.

62. Полипептид по любому из пп. 1-61, содержащий множество мутаций, где, по меньшей мере, одна мутация является компенсаторной или полезной мутацией.

63. Полипептид по любому из пп. 1-62, который представляет выделенный полипептид.

64. Полипептид по любому из пп. 1-62, который представляет синтетический полипептид.

65. Композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-64.

66. Композиция по п.65, дополнительно включающая фармацевтически приемлемый носитель.

67. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-64.

68. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.67.

69. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.67 или вектор по п.68.

70. Набор, содержащий полипептид по любому из пп. 1-64 и инструкции по применению полипептида.

71. Контейнер, содержащий полипептид по любому из пп. 1-64.

72. Способ получения полипептида, включающий культивирование клетки по п.69 в условиях, позволяющих продуцировать молекулу антитела, тем самым обеспечивая продукцию полипептида.

73. Способ по п.72, дополнительно включающий выделение или очистку полипептида.

74. Способ лечения расстройства, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества полипептида по любому из пп. 1-64 или композиции по пп.65 или 66, тем самым обеспечивая лечение расстройства.

75. Полипептид по любому из пп. 1-64 или композиция по пп.65 или 66 для применения в лечении расстройства у субъекта.

76. Применение полипептида по любому из пп. 1-64 или композиции по пп.65 или 66 в производстве лекарственного средства для лечения расстройства у субъекта.

77. Способ детектирования молекулы, включающий контактирование клетки или образца от субъекта с полипептидом по любому из пп. 1-64, тем самым обеспечивая

детектирование молекулы.

RU 2019104889 A

RU 2019104889 A