



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014026718-9 B1



(22) Data do Depósito: 11/03/2013

(45) Data de Concessão: 18/05/2021

(54) Título: POLIPEPTÍDEO ISOLADO DE CTLA-4, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO E USO DE UM POLIPEPTÍDEO CTLA-4

(51) Int.Cl.: A61K 38/16; C07K 1/00.

(30) Prioridade Unionista: 11/05/2012 US 61/645,686.

(73) Titular(es): MEDIMMUNE LIMITED..

(72) Inventor(es): RALPH MINTER; JULIE DOUTHWAITE; JACQUES MOISAN; MICHAEL BOWEN; STEVE RUST; CYRIL PRIVEZENTZEV.

(86) Pedido PCT: PCT US2013030179 de 11/03/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/169338 de 14/11/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/10/2014

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO ISOLADO DE CTLA-4, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM OUTRO POLI- PEPTÍDEO CTLA-4 E USO DE UM POLIPEPTÍDEO CTLA-4. Variantes do antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4), com elevada afinidade, atividade e estabilidade. Formulações de variantes de CTLA-4 em elevada concentração para a administração sub-cutânea ou intravenosa, por exemplo, em intervalos de dosagem mensais ou menos frequentes. Utilização de variantes de CTLA-4 no tratamento de artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias. Fusão de CTLA-4 com IgG Fc tendo uma estabilidade melhorada e uma meia-vida in vivo mais prolongada.

"POLIPEPTÍDEO ISOLADO DE CTLA-4, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO E USO DE UM POLIPEPTÍDEO CTLA-4".

Referência à listagem de sequência submetida eletronicamente

[001] O conteúdo da listagem de sequência submetida eletronicamente em ficheiro de texto ASCII (Nome CTLA4101P1Sequencelisting.txt; Tamanho: 107,814 bytes; e Data de Criação: 11 de maio, 2012) apresentado com o pedido é aqui incorporado como referência na sua totalidade.

Área da Invenção

[002] Esta invenção refere-se a composições compreendendo as variantes do抗原 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4), opcionalmente fundido com Fc de IgG, e a sua utilização terapêutica para inibir a ativação das células T, especialmente no contexto de condições inflamatórias, tais como artrite reumatoide (AR).

Antecedentes

[003] Pensa-se que a ativação das células T nativas é realizada por um mecanismo de dois sinais. Ao encontrar uma célula que apresenta抗原 (APC), o receptor de células T (TCR) interage com o peptídeo do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e, assim, proporciona o primeiro sinal de ativação para as células T. Este sinal inicial é insuficiente para provocar a ativação das células T e um segundo sinal a partir de receptores co-estimuladores é um requisito absoluto. Um dos mais importantes e melhor descrito receptor co-estimulador é o CD28, que interage com o CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) na superfície de macrófagos, células dendríticas, assim como os linfócitos B e T ativados.

[004] O gene CD86 codifica uma proteína de membrana do tipo I (Swiss-Prot Acc-No P33681). Emendas alternativas resultam em duas variantes de transcrição do gene CD86 que codificam diferentes isoformas. Outras variantes de transcritos foram descritos, mas as

suas sequências de comprimento total não foram determinadas.

[005] A proteína relacionada com CD80 (Swiss-Prot Acc-No P42081) tem uma estrutura secundária semelhante a CD86. CD80 partilha 26% e 46% de resíduos de aminoácidos idênticos ou semelhantes com CD86, respectivamente. CD80 é expresso apenas em níveis baixos em APCs em repouso, mas pode ser sobre-regulado após a ativação. CD80 reconhece os mesmos receptores nas células T, CD28 e CD152 (CTLA-4), mas liga-se ao último com uma afinidade de, cerca de, 2 a 4 vezes mais elevada do que a afinidade a CD86.

[006] Nenhum epítopo peptídeo linear partilhado tinha sido identificado como sendo responsável pela ligação a CD28 e/ou CTLA-4 (Ellis et al., *J Immunol.*, 156, 2700-2709), mas os resíduos conservados nas estruturas secundárias (folhas IgV de CD80 e CD86) foram encontrados em interação com CTLA-4 (Swartz et al. *Nature*, 410, 604-608).

[007] A transdução do sinal a partir de CD28 conduz à ativação de células T e a sobre-regulação do receptor co-inibidor de CTLA-4. CTLA-4 é um membro da superfamília das imunoglobulinas. Liga-se a CD80 e CD86 com uma maior afinidade e avidez em comparação com CD28 e, efetivamente, diminui a expressão dos sinais de ativação.

[008] Várias teorias têm sido postuladas sobre os papéis relativos de CD80 e CD86 na ligação a CTLA-4. Slavik et al. (*Immunol. Res.* 19 (1): 1-24, 1999) analisou a sinalização e a função das famílias CD28/CTLA-4 e CD80/CD86. Sansom (*Immunology* 101: 169-177 2000) resume alguns estudos onde foram investigadas as diferenças entre CD80 e CD86.

[009] Odobasic et al. (*Immunology* 124: 503-513 2008) investigaram o papel de CD80 e CD86 nas respostas das células T efetoras. Este estudo investigou o efeito de anticorpos monoclonais anti-CD80 e anti-CD86 num modelo de rato induzido por antígenios de

artrite. Foi relatado que o bloqueio de ambos CD80 e CD86 provocou uma tendência para a redução da gravidade da doença em comparação com os ratos de controle tratados com anticorpo. Com base nos resultados do tratamento com os anticorpos individuais, os autores concluíram que CD80 exacerba artrite por sob-regular IL-4 sistêmico e aumentar a acumulação das células T nas articulações, enquanto que CD86 aumenta a gravidade da doença por sobre-regular IL-17 e aumentar a acumulação de células T efetoras em articulações, sem afetar o desenvolvimento de Th1 ou Th2. No entanto, o estudo relata que mais nenhuma redução na severidade da artrite foi observada quando ambos CD80 e CD86 foram bloqueados, o que sugere que a inibição da molécula co-estimuladora era adequada para se obter uma melhoria máxima da doença. Este modelo foi baseado em uma resposta recordatória ao antígeno (BSA, neste estudo), injetado diretamente no espaço articular.

[0010] Outro estudo utilizou um modelo de murino de artrite induzido por colágeno, que envolve quebrar a tolerância a um抗igeno endógeno (colágeno). Neste estudo, o bloqueio de ambos CD80 e CD86 foi relatado como sendo necessário para um benefício máximo (Webb et al. Eur J. Immunol 26 (10): 2320-2328, 1996).

[0011] Uma proteína de fusão recombinante que compreende o domínio extracelular de CTLA-4 ligado a um domínio Fc de IgG1 modificada ("CTLA-4 - Ig") tem sido demonstrado que se liga a CD80 e CD86 *in vivo* e suprime eficazmente a ativação das células T mediada por CD28 (Kliwinski et al., J Autoimmun. 2005; 25(3):165-71).

[0012] Proteínas de fusão CTLA-4 têm sido desenvolvidas como agentes terapêuticos para a artrite reumatoide (AR). AR é uma doença degenerativa progressiva levando à destruição da cartilagem e óssea. Há evidências de que muitos ramos do sistema imune estão envolvidos no processo inflamatório, levando a sinoviócitos

semelhantes a fibroblastos e danos articulares mediados por osteoclastos e destruição da cartilagem e do osso. Vários estudos têm mostrado um aumento da ativação de células T na membrana sinovial e até 50% das células que infiltram o pannus inflamado são linfócitos T. Além disso, as células T na sinóvia de pacientes com AR exibem um fenótipo efetor ativado exibindo um aumento da expressão de marcadores associados com a ativação, tais como CD44, CD69, CD45RO, VLA-1 e CD27.

[0013] Mostrou-se que as células T ativadas desempenham um papel essencial no estabelecimento e manutenção da resposta inflamatória patológica encontrada na membrana sinovial da AR*. As células T ativadas são uma fonte importante de citocinas pró-inflamatórias, tais IFNy, IL-17 e TNF α . Estes fatores são ativadores potentes de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS) e sinoviócitos semelhantes a macrófagos (MLS) que conduzem à secreção de metaloproteinases de matriz (MMP), que são mediadoras da destruição de cartilagem, assim como a secreção de mediadores inflamatórios tais como IL-6 , IL-1 e TNF α . As células CD4 + ativadas também podem fornecer auxílio aos linfócitos B conduzindo à produção de anticorpos, tal como o fator reumatoide (RF), que mais contribui para a progressão da doença.

[0014] Abatacept (Orencia®) é uma proteína de fusão CTLA-4 Ig, contendo o domínio extracelular de CTLA-4 fundido com Fc de IgG1. A proteína solúvel resultante é um dímero com um peso molecular de aproximadamente 92 kDa. Tem sido demonstrado que têm efeitos benéficos no tratamento de pacientes com AR na clínica, o que demonstra que a inibição da via de co-estimulação que envolve CD80 e CD86 é uma abordagem terapêutica viável para a artrite reumatoide. A terapia de AR com Abatacept é administrada tanto como uma intravenosa mensal ou por injeção subcutânea semanal.

[0015] Abatacept contém no seu laço semelhante a CDR3 o domínio do aminoácido hexapéptido MYPPPY, que é partilhado entre CD28 e CTLA-4 e é referido como sendo necessário para se ligarem aos ligandos B7. A mutação da primeira tirosina (Y) neste domínio para alanina (A), supriu a ligação a CD80, mas também resultou na redução da ligação a CD86, enquanto que uma substituição de fenilalanina (F) permite que a retenção da afinidade total para CD80 com uma perda total dea ligação CD86 (Harris et al., J. Exp Med. (1997) 185:177-182). Outros resíduos nas regiões semelhantes a CDR3 e CDR1 também são importantes para a interação do Abatacept com seus ligantes. Assim, uma molécula mutante com ácido glutâmico (E) em vez de leucina (L) na posição 104 e tirosina (Y) em vez de alanina (A) na posição 29 apresenta, aproximadamente, duas vezes maior avidez de ligação para CD80 (B7-1) e, aproximadamente, 4 vezes maior avidez de ligação para CD86 (B7-2) que Abatacept. Este composto LEA-29Y (Belatacept, Nulojix®) é relatado como tendo uma afinidade semelhante para ligação a CD80 como para CD86 (3,66 nM e 3,21 nM, respectivamente). Belatacept tem sido desenvolvido como um imunossupressor para o transplante (Larsen et al., Am J. Transplantation (2005) 5:443-453; Gupta & Womer Drugs Des Develop Ther 4: 375-382 2010) e foi recentemente aprovado para a profilaxia de rejeição de órgãos em doentes adultos submetidos a um transplante de rim. Abatacept por si só mostra uma eficácia limitada contra a rejeição de transplante, uma constatação que foi atribuída à sua baixa inibição dependente de CD86 em oposição à co-estimulação dependente de CD80 (Gupta & Womer, supra).

[0016] Formulações de Abatacept e Belatacept para administração subcutânea são descritas em WO2007/07654.

[0017] Seleções para uma maior afinidade e estabilidade foram previamente realizadas utilizando a visualização de ribossomos para

isolar variantes melhoradas de CTLA-4. Ambas mutagêneses por PCR propenso a erros, para mutar a sequência do gene completo, e mutagêneses dirigida, para atingir mutações em regiões-chave, têm sido bem sucedidas para a evolução da proteína. Por exemplo, WO2008/047150 reporta variantes de proteína CTLA-4, mostrando o aumento da atividade e maior estabilidade em comparação com o tipo selvagem.

[0018] Maxygen, Inc. relataram uma molécula terapêutica de CTLA-4-Ig, designada por ASP2408, sendo desenvolvido pela Perseid Therapeutics LLC em colaboração com Astellas Pharma Inc. para o tratamento da AR. CTLA-4-Ig foi relatado como mostrando uma potência aumentada em comparação com Orencia® (Abatacept) (WO2009/058564).

[0019] US 6.750.334 (Repligen Corporation) descreve CTLA-4-C γ 4, como sendo uma proteína de fusão solúvel compreendendo CTLA-4 fundido com uma porção de uma imunoglobulina. A região constante da imunoglobulina, que compreende uma região de dobradiça e domínios CH2 e CH3, é modificada por substituição, adição ou deleção de, pelo menos, um resíduo de aminoácido, para reduzir a ativação do complemento ou a interação do receptor Fc.

[0020] Xencor, Inc. recentemente descreveram uma molécula de CTLA4-Ig, compreendendo uma variante da porção CTLA-4 e uma região Fc de imunoglobulina (WO2011/103584). Foram descritos um número de substituições de aminoácidos na sequência da porção de CTLA-4, para a geração de variantes de CTLA4-Ig com uma maior atividade inibidora de células T. WO2011/103584 também descreve modificações de Fc, por exemplo, para melhorar a ligação a Fc γ Rs, melhorando as funções efetoras mediadas por Fc e/ou estendendo-se na meia-vida *in vivo* de CTLA4-Ig.

Sumário da Invenção

[0021] Em um primeiro aspetto, a invenção proporciona polipeptídeos CTLA-4 que são variantes do tipo selvagem CTLA-4. Os polipeptídeos CTLA-4 da invenção podem ter uma ou mais propriedades melhoradas, tais como potência mais elevada, uma maior afinidade para o CD80 e/ou CD86, aumento na seletividade para CD80 em relação a CD86, uma boa reatividade cruzada e/ou a uma estabilidade mais elevada em relação ao tipo selvagem.

[0022] Melhorias em CTLA-4 podem ser obtidas através da mutação da sequência de aminoácidos do domínio extracelular do tipo selvagem de CTLA-4 humano, também conhecido como o CTLA-4 solúvel. Uma ou mais mutações de aminoácidos, que pode ser um aminoácido de substituição, inserção ou deleção, pode ser introduzido na sequência de um aminoácido de CTLA-4 para produzir uma melhora do polipeptídeo CTLA-4, como aqui descrito. O polipeptídeo pode, por exemplo, exibir uma potência, afinidade e/ou estabilidade aumentadas em relação ao tipo selvagem de CTLA-4.

[0023] O domínio extracelular de CTLA-4 compreende a sequência de aminoácidos do tipo selvagem SEQ ID NO: 35. SEQ ID NO: 35 não é a totalidade do domínio extracelular, mas é a região empregue em Abatacept (Orencia®).

[0024] Os polipeptídeos CTLA-4 da presente invenção podem ou não incluir outros resíduos ou sequências CTLA-4 para além da região que corresponde à SEQ ID NO: 35. De preferência, um polipeptídeo CTLA-4 da invenção é solúvel. Geralmente, não compreende a região transmembranar de CTLA-4.

[0025] Foi aqui identificado um número de mutações dentro da sequência de aminoácidos CTLA-4, as quais estão associadas com a potência, afinidade e/ou estabilidade aumentadas ou que podem ser introduzidas para outros fins, tais como para influenciar a dimerização.

[0026] Exemplos de substituições de aminoácidos no tipo

selvagem de CTLA-4 são os seguintes: R, S, V ou T em I16; T em A24; N ou P em S25; S em G27; I em V 32; G em D41; G em S42; E em V44; K ou V em M54; S ou G em N56; A, G, S ou P em L58; S ou A em T59; T em F 60; Q ou P em L61; G em D 62; Y em D63; P em S 64; N, D, V ou T em I65; A, T, M ou H em S70; R em Q80; Q, S, V, R, K ou L em M85; S em T87; Q, H, T, E ou M em K93; R, Q ou E em L104; V em I106; D ou S em N108; V ou F em I115 e S em C120. Um exemplo de uma deleção de aminoácido é a deleção de T51. A numeração dos resíduos é com referência às sequências CTLA-4 apresentadas na Figura 1A e Figura 2, numeradas com o primeiro resíduo de posição 1 "numeração de sequência". A Figura 1 também mostra a numeração Swiss Prot para comparação.

[0027] Uma variante de CTLA-4 pode ter, por exemplo, até doze ou até vinte mutações de aminoácidos em CTLA-4 solúvel humano de tipo selvagem. As mutações podem incluir qualquer uma ou todas as mutações de aminoácidos listadas acima, e, opcionalmente, uma ou mais mutações diferentes, por exemplo, diferentes substituições, nestes ou em outras posições de resíduos. A sequência de aminoácidos variante pode compreender CTLA-4 humano de tipo selvagem da sequência SEQ ID NO: 35 com um ou mais, por exemplo, pelo menos, cinco, seis ou sete das mutações de aminoácidos listados.

[0028] O polipeptídeo CTLA-4 pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou, pelo menos, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 35.

[0029] Exemplos de sequências de aminoácidos de variante de CTLA-4 de acordo com a invenção incluem as de SEQ ID NOS: 36-55 mostrada na Figura 1A. Uma variante de CTLA-4 pode compreender a

sequência de aminoácidos de CTLA-4 "1299" codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948. O ácido nucleico com o número de acesso NCIMB 41948 codifica para o polipeptídeo CTLA-4 1299 fundido com uma região Fc de imunoglobulina. O polipeptídeo CTLA-4 1299 codificado, a região Fc codificada e o polipeptídeo codificado que compreende o polipeptídeo CTLA-4 1299 fundido com a região Fc, são todos codificados por o ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948, sendo modalidades individuais da presente invenção.

[0030] As mutações preferidas são as substituições de aminoácidos selecionadas a partir do seguinte: R, S ou V em I16; T em A24; N em S25; S em G27; K em M54; S em N56; A ou G em L58; S em T59; T em F 60; Q em L61; Y em D63; P em S 64; N ou D em I65; A em S70; R em Q80; Q ou S em M85; Q ou H em K93; e S em C120. Assim, a sequência de aminoácidos variante pode compreender CTLA-4 humano de tipo selvagem de sequência SEQ ID NO: 35 com um ou mais, por exemplo, pelo menos, cinco ou seis, ou todos, destas posições de resíduos de aminoácidos substituídos com um resíduo diferente, tal como especificado.

[0031] Uma sequência do polipeptídeo CTLA-4 compreende preferencialmente: R, I, S ou V na posição 16; T ou A na posição 24; N na posição 25; S ou G na posição 27; M ou K na posição 54; N ou S na posição 56; A, L ou G na posição 58; T ou S na posição 59; F ou T na posição 60; L ou Q na posição 61; D ou Y na posição 63; S ou P na posição 64; I, N ou D na posição 65; A ou S na posição 70; Q ou R na posição 80; Q, M ou S na posição 85; Q ou H na posição 93; e/ou C ou S na posição 120. Outras posições dos resíduos podem ser humano do tipo selvagem, ou pode ser sujeito a uma ou mais mutações adicionais.

[0032] Um polipeptídeo CTLA-4 pode compreender N na posição

25, que representa uma substituição do tipo selvagem S nesta posição. O polipeptídeo pode compreender Q ou H na posição 93, que representa uma substituição de tipo selvagem K nesta posição. Tal como ilustrado nos exemplos descritos mais adiante, acredita-se que estas substituições nos resíduos 25 e 93 possam estar fortemente associadas a melhorias na afinidade, atividade e/ou estabilidade de CTLA-4.

[0033] Um domínio de aminoácidos preferido, que foi observado em várias variantes de alta potência, é STQDYPN (SEQ ID NO: 69). Este domínio, localizado nos resíduos 59-65, é uma região do laço, que parece estar em estreita proximidade com CD80 e CD86 na estrutura ligada. Assim, em certas modalidades, um polipeptídeo CTLA-4 compreende a SEQ ID NO: 69 nos resíduos 59-65. A numeração dos resíduos é conforme o mostrado na Figura 1A (linha superior da numeração, a partir de 1) e Figura 2. Quando as inserções ou deleções estão presentes, a numeração real dos resíduos do polipeptídeo pode diferir da sequência de referência. A Figura 1A também mostra a numeração Swiss Prot para comparação.

[0034] Também pode ser desejável a mutação C na posição 120, por exemplo, por substituição de S, de modo a remover uma ponte dissulfureto formada entre as moléculas CTLA-4 neste local, e para inibir a dimerização de CTLA-4. Em outras situações, é desejável reter ou promover a dimerização de CTLA-4 ou uma multimerização superior (por exemplo, a formação de tetrâmero). Tal pode ser conseguido, por exemplo, através da retenção de C120 e/ou através da adição de domínios de dimerização, tal como, por conjugação de CTLA-4 a uma região Fc de IgG. A adição de tais domínios e a formação de macromoléculas que compreendem CTLA-4 será ainda discutido mais adiante.

[0035] O polipeptídeo CTLA-4 pode compreender a sequência de

aminoácidos SEQ ID NO: 68, ou pode compreender a SEQ ID NO: 68 com uma ou mais mutações. Por exemplo, um polipeptídeo CTLA-4 pode compreender a SEQ ID NO: 68 com até doze mutações, até dez mutações de aminoácidos ou até cinco mutações, por exemplo, uma, duas ou três mutações de aminoácidos. SEQ ID NO: 68 ilustrada na Figura 2, é uma sequência de consenso de resíduos encontrados no grupo de seis polipeptídeos CTLA-4 com, excepcionalmente, boa atividade funcional, que foram produzidos como descrito nos Exemplos. Os seis polipeptídeos têm as sequências de aminoácidos mostradas na Figura 1A, com as SEQ ID NOS como se segue: SEQ ID NO: 43 (variante 1299), SEQ ID NO: 37 (variante 1322), SEQ ID NO: 38 (variante 1321), SEQ ID NO: 36 (variante 1315), SEQ ID NO: 42 (variante 1115), SEQ ID NO: 47 (variante 1227). Estas seis sequências e as variantes com uma ou mais mutações de aminoácidos, por exemplo, até doze, por exemplo, até dez mutações de aminoácidos, por exemplo, até cinco mutações, por exemplo, uma, duas ou três mutações de aminoácidos em qualquer uma destas seis sequências, representam exemplos da invenção. O polipeptídeo CTLA-4 pode compreender a sequência do polipeptídeo CTLA-4 "1299" depositada sob o número de acesso NCIMB 41948, com uma ou mais mutações de aminoácidos, por exemplo, até doze, por exemplo, até dez mutações de aminoácidos, por exemplo, até cinco mutações, por exemplo, uma, duas ou três mutações de aminoácidos.

[0036] Os polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção podem compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou, pelo menos, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 68, com qualquer das SEQ ID NOS: 36-55, ou com a sequência do polipeptídeo CTLA-4 "1299" depositada sob o número de acesso NCIMB 41948.

[0037] A mutação ou mutações podem compreender ou consistir em substituições de aminoácidos e podem, opcionalmente, ser selecionadas a partir do seguinte:

[0038] T no resíduo 16; P no resíduo 25; I no resíduo 32; G no resíduo 41; G no resíduo 42; E no resíduo 44; V no resíduo 54; G no resíduo 56; S ou P no resíduo 58; A no resíduo 59; P no resíduo 61; G no resíduo 62; V ou T no resíduo 65; T, M ou H no resíduo 70; V, R, K ou L no resíduo 85; S no resíduo 87; T, E ou M no resíduo 93; R, Q ou E no resíduo 104; V no resíduo 106; D ou S no resíduo 108; V ou F no resíduo 115; S no resíduo 120; deleção no resíduo 51.

[0039] De preferência, um polipeptídeo compreende N na posição 25, e/ou compreende Q ou H na posição 93. Um polipeptídeo pode compreender, opcionalmente, S na posição 120.

[0040] Como referido acima, de preferência um polipeptídeo compreende R, I, S ou V na posição 16; T ou A na posição 24; N na posição 25; S ou G na posição 27; M ou K na posição 54; N ou S na posição 56; A, L ou G na posição 58; T ou S na posição 59; F ou T na posição 60; L ou Q na posição 61; D ou Y na posição 63; S ou P na posição 64; I, N ou D na posição 65; A ou S na posição 70; Q ou R na posição 80; Q, M ou S na posição 85; Q ou H na posição 93; e/ou C ou S na posição 120. Assim, o polipeptídeo compreende uma ou mais, por exemplo, pelo menos, cinco ou seis, ou mais, das seguintes substituições de aminoácidos em relação ao tipo selvagem de CTLA-4 de SEQ ID NO: 35: R, S ou V em I16; T em A24; N em S25; S em G27; K em M54; S em N56; A ou G em L58; S em T59; T em F60; Q em L61; Y em D63; P em S64; N ou D em I65; A em S70; R em Q80; Q ou S em M85; Q ou H em K93.

[0041] As mutações nas SEQ ID NOS: 36-55 em comparação com o tipo selvagem são ilustrados na Figura 1A. Um polipeptídeo de acordo com a invenção pode compreender CTLA-4 de tipo selvagem

de SEQ ID NO: 35, com uma ou mais mutações exemplificadas nessas variantes, por exemplo, com a combinação de mutações presentes em qualquer uma das SEQ ID NOS: 36-55. Um polipeptídeo pode compreender, opcionalmente, outras mutações, como discutido acima, por exemplo, opcionalmente, uma ou duas mutações adicionais.

[0042] Por exemplo, um polipeptídeo pode compreender uma combinação de mutações selecionadas a partir de:

[0043] - as mutações 1315, isto é, S em I16; N em S25; G em L58; A em S70; R em Q80; S em M85; e Q em K93;

[0044] - as mutações 1322, isto é, N em S25; S em G27; K em M54; S em N56; S em T59; T em F60; Q em L61; Y em D63; P em S64; N em I65; e Q em K93;

[0045] - as mutações 1321, isto é, S em I16; N em S25; K em M54; G em L58; A em S70; R em Q80; S em M85; e Q em K93;

[0046] - as mutações 1115, isto é, V em I16; N em S25; G em L58; A em S70; Q em M85; e Q em K93;

[0047] - as mutações 1299, isto é, R em I16; T em A24; N em S25; S em G27; A em L58; A em S70; Q em M85; e Q em K93; e

[0048] - as mutações 1227, isto é, S em I16; N em S25; S em G27; A em L58; A em S70; Q em M85; e H em K93.

[0049] Por conseguinte, um polipeptídeo CTLA-4 pode ser um que compreende a combinação de resíduos substituídos em qualquer uma das SEQ ID NOS: 36-55 em relação ao tipo selvagem, por exemplo, pode compreender:

[0050] - S no resíduo 16; N no resíduo 25; G no resíduo 58; A no resíduo 70; R no resíduo 80; S no resíduo 85; e Q no resíduo 93;

[0051] - N no resíduo 25; S no resíduo 27; K no resíduo 54; S no resíduo 56; S no resíduo 59; T no resíduo 60; Q no resíduo 61; Y no resíduo 63; P no resíduo 64; N no resíduo 65; e Q no resíduo 93;

[0052] - S no resíduo 16; N no resíduo 25; K no resíduo 54; G no resíduo 58; A no resíduo 70; R no resíduo 80; S no resíduo 85; e Q no resíduo 93;

[0053] - V no resíduo 16; N no resíduo 25; G no resíduo 58; A no resíduo 70; Q no resíduo 85; e Q no resíduo 93;

[0054] - R no resíduo 16; T no resíduo 24; N no resíduo 25; S no resíduo 27; A no resíduo 58; A no resíduo 70; Q no resíduo 85; e Q no resíduo 93; ou

[0055] - S no resíduo 16; N no resíduo 25; S no resíduo 27; A no resíduo 58; A no resíduo 70; Q no resíduo 85; e H no resíduo 93.

[0056] A mutação é preferencialmente uma substituição e pode ser uma substituição conservada. Por "substituição conservada" entende-se uma substituição de um primeiro resíduo de aminoácido com um segundo resíduo de aminoácido diferente, em que o primeiro e o segundo resíduos de aminoácidos têm cadeias laterais, que têm características biofísicas semelhantes. Características biofísicas similares incluem hidrofobicidade, carga, polaridade ou capacidade de fornecer ou aceitar ligações de hidrogênio. Exemplos de substituições conservadas incluem a alteração de serina para treonina ou triptofano, glutamina para asparagina, lisina para arginina, alanina para valina, aspartato para glutamato, valina para isoleucina, asparagina para serina.

[0057] Os polipeptídeos de acordo com a invenção podem incluir uma ou mais mutações nas sequências de aminoácidos (substituição, deleção e/ou inserção de um resíduo de aminoácido) e menos que cerca de 15 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2.

[0058] As mutações, normalmente, não resultam na perda de função, de modo que um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos assim alterada podem reter uma capacidade de se ligar a CD80 e/ou CD86 humanos. Pode reter a mesma afinidade de

ligação ou função como um polipeptídeo, em que a alteração não é realizada, por exemplo, como medido em um ensaio aqui descrito.

[0059] A mutação pode compreender substituir um ou mais resíduos de aminoácido com um aminoácido não padrão ou de ocorrência não natural, modificar um ou mais resíduos de aminoácido em uma forma não padrão e de ocorrência não natural ou inserir um ou mais aminoácidos não padrão ou de ocorrência não natural na sequência. Os exemplos de números e localizações de alterações em sequências da invenção são descritos em outras partes no presente documento. Os aminoácidos de ocorrência natural incluem os 20 L-aminoácidos "padrão" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por seus códigos de letra única padrão. Os aminoácidos não padrão incluem qualquer outro resíduo que pode ser incorporado em uma estrutura principal de polipeptídeo ou resultam da modificação de um resíduo de aminoácido existente. Os aminoácidos não padrão podem ser de ocorrência natural ou de ocorrência não natural. Diversos aminoácidos não padrão de ocorrência natural são conhecidos na técnica, tal como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilhistidina, N-acetilserina, etc. [Voet & Voet, *Biochemistry*, 2^a Edição, (Wiley) 1995]. Esses resíduos de aminoácido que são derivados em sua posição N-alfa estarão apenas localizados no terminal N de uma sequência de aminoácidos. Normalmente, na presente invenção um aminoácido é um L-aminoácido, mas pode ser um d-aminoácido. A alteração pode, então, compreender a modificação de um L-aminoácido em, ou substituir o mesmo por, um d-aminoácido. As formas metiladas, acetiladas e/ou fosforiladas de aminoácidos são também conhecidas e os aminoácidos na presente invenção podem ser submetidos a tal modificação.

[0060] As sequências de aminoácidos nos polipeptídeos da invenção podem compreender aminoácidos não naturais ou não

padrão descritos acima. Os aminoácidos não padrão (por exemplo, d-aminoácidos) podem ser incorporados em uma sequência de aminoácidos durante a síntese, ou por modificação ou substituição dos aminoácidos padrão "originais" após a síntese da sequência de aminoácidos.

[0061] O uso de aminoácidos não padrão e/ou de ocorrência não natural aumenta a diversidade estrutural e funcional e pode assim aumentar o potencial para atingir as propriedades de neutralização e ligação desejadas. Adicionalmente, d-aminoácidos e análogos têm mostrado ter perfis de farmacocinética diferentes em comparação aos l-aminoácidos padrão, devido à degradação *in vivo* de polipeptídeos que têm l-aminoácidos após a administração a um animal, por exemplo, um humano, que significa que os d-aminoácidos são vantajosos para algumas aplicações *in vivo*.

[0062] Variantes podem ser gerados através da utilização de mutagênese aleatória de um ou mais genes VH e/ou VL selecionados para gerar mutações no interior do domínio variável inteiro. Tal técnica é descrita por Gram et al. [Gram et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:3576-3580], que utilizou um PCR propenso a erros. Outro método que pode ser usado é para direcionar a mutagênese para regiões ou localizações particulares no polipeptídeo. Tais técnicas são reveladas por Barbas et al. [Barbas et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:3809-3813] e Schier et al. [Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551-567].

[0063] Todas as técnicas descritas acima são conhecidas como tal na técnica e a pessoa versada será capaz de usar tais técnicas para fornecer polipeptídeos da invenção com o uso de metodologia de rotina na técnica.

[0064] Os algoritmos que podem ser usados para calcular a % de identidade de duas sequências de aminoácidos incluem, por exemplo,

BLAST [Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405 a 410], FASTA [Pearson e Lipman (1988) PNAS USA 85: 2.444 a 2.448], ou o algoritmo de Smith-Waterman [Smith e Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195 a 197], por exemplo, que empregam parâmetros padrão.

[0065] De acordo com a invenção, podem ser proporcionadas composições contendo os polipeptídeos CTLA-4 tendo uma melhor atividade biológica, tal como o aumento da seletividade para CD80 em relação a CD86, uma maior afinidade e/ou maior potência e/ou pode exibir uma boa reatividade cruzada, uma estabilidade melhorada e/ou semi-vida prolongada em comparação com o tipo selvagem de CTLA-4. Como discutido em detalhe aqui, tais propriedades podem contribuir para uma maior eficácia terapêutica e pode permitir que os benefícios terapêuticos sejam alcançados em dosagens reduzidas ou menos frequentes. Uma estabilidade melhorada pode facilitar o fabrico e formulação em composições farmacêuticas.

[0066] O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a invenção é opcionalmente conjugado com uma região Fc de IgG, por exemplo, como uma proteína de fusão. A região Fc pode ser manipulada para aumentar a semi-vida *in vivo* da molécula e para contribuir para a estabilidade global da composição evitando funções efetoras Fc indesejados. A estabilidade melhorada facilita a formulação do produto em concentrações elevadas, por exemplo, para administração subcutânea.

Breve descrição dos desenhos

[0067] Figura 1. (A) Alinhamento de sequências variantes de CTLA-4 (SEQ ID NOS: 36-55) com o tipo selvagem de CTLA-4 humano (SEQ ID NO: 35). As mutações de tipo selvagem são apresentados em caixas cinzentas. A linha superior de numeração, começando a partir de 1, é a numeração referida na presente descrição, a menos que especificado de outra forma. A numeração

Swiss Prot é mostrada abaixo para comparação. (B) Alinhamento de sequências de IgG1 Fc SEQ ID NOS: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 e SEQ ID NO: 60. A linha superior de numeração, começando a partir de 1, é a numeração referida na presente descrição, a menos que especificado de outra forma. A numeração Swiss Prot é mostrada abaixo para comparação.

[0068] Figura 2. Sequência do polipeptídeo CTLA-4 SEQ ID NO: 68. Com numeração sequencial a partir de Met como posição 1, SEQ ID NO: 68 tem 124 resíduos, com variabilidade nos resíduos 16, 24 27, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 70, 80, 85 e 93. O resíduo de aminoácido em cada uma destas posições variáveis é selecionado a partir do grupo dos resíduos indicados em cada caso.

[0069] Figura 3. Perfis de IC₅₀ de variantes de CTLA-4 de tipo selvagem de CTLA-4 em formato de fusão Fc em: (A) o ensaio duplo de célula Raji-Jurkat; (B) o ensaio com células T CD4+ primárias humanas; (C) ensaio de reação de linfócitos mistos de macaco cinomolgo.

[0070] Figura 4. A especificidade de variantes CTLA-4 para CD80 e CD86 em comparação com outros ligandos de proteína relacionados. (A) variante 1299. (B) variante 1322.

[0071] Figura 5. Demonstração da função efetora nula (ADCC e CDC) para variantes CTLA-4 com modificações TM e YTE. (A) ADCC. (B) CDC.

[0072] Figura 6. As melhorias na afinidade monovalente em relação a CD80 e CD86 de variantes CTLA-4, em comparação com o tipo selvagem de CTLA-4 em formato de fusão Fc.

[0073] Figura 7. (A) Construção do design para a proteína tetramérica CTLA-4. (B) Comparação da potência no ensaio Raji Jurkat para o tipo selvagem de CTLA-4 em formato de fusão Fc versus tetramérica CTLA-4.

Descrição Detalhada

[0074] A numeração dos resíduos de CTLA-4, que é utilizada ao longo desta especificação, é como mostrada na Figura 1A (linha de cima, a numeração da sequência) e Figura 2, a menos que indicado de outra forma. CTLA-4 possui uma sequência líder que é clivada e, pelo menos, dois sistemas diferentes de numeração da proteína madura são possíveis. A sequência de CTLA-4 pode começar com, *inter alia*, Ala na posição 1 (US 5.434.131) ou com Met na posição 1 (Larsen et al, Am J. Transplantation (2005) 5:443-453). A menos que o contexto indique claramente o contrário, o sistema de numeração aqui utilizado é aquele em que a posição 1 é Met. Este também corresponde à numeração que é, geralmente, utilizado para se referir aos resíduos do produto Abatacept.

[0075] A numeração dos resíduos FC, que é utilizada ao longo desta especificação, é como mostrada na Figura 1B (linha de cima, iniciando a partir de 1), a menos que indicado de outra forma.

[0076] As seguintes cláusulas numeradas representam aspectos da invenção.

[0077] 1. Um polipeptídeo isolado de CTLA-4 tendo uma maior afinidade de ligação para CD80 humano, uma maior potência e/ou uma maior estabilidade em comparação com o tipo selvagem de CTLA-4 SEQ ID NO: 35, o polipeptídeo comprehende uma sequência de aminoácidos que é uma variante da SEQ ID NO: 35, em que a variante comprehende cinco ou mais das seguintes mutações de aminoácidos na SEQ ID NO: 35:

[0078] R, S, V ou T em I16;

[0079] T em A24;

[0080] N ou P em S25;

[0081] S em G27;

[0082] I em V 32;

- [0083] G em D41;
 - [0084] G em S42;
 - [0085] E em V44;
 - [0086] K em M54;
 - [0087] S ou G em N56;
 - [0088] A, G, S ou P em L58;
 - [0089] S ou A em T59;
 - [0090] T em F 60;
 - [0091] Q ou P em L61;
 - [0092] G em D 62;
 - [0093] Y em D63;
 - [0094] P em S 64;
 - [0095] N, D, V ou T em I65;
 - [0096] A, T, M ou H em S70;
 - [0097] R em Q80;
 - [0098] Q, S, V, R, K ou L em M85;
 - [0099] S em T87;
 - [00100] Q, H, T, E ou M em K93;
 - [00101] R, Q ou E em L104;
 - [00102] V em I106;
 - [00103] D ou S em N108;
 - [00104] V ou F em I115;
 - [00105] S em C120;
 - [00106] deleção em T51.
- [00107] 2. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 1, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 35.
- [00108] 3. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 1 ou 2, compreendendo cinco ou mais das seguintes mutações de aminoácidos:

- [00109] R, S ou V em I16;
 - [00110] T em A24;
 - [00111] N em S25;
 - [00112] S em G27;
 - [00113] K em M54;
 - [00114] S em N56;
 - [00115] A ou G em L58;
 - [00116] S em T59;
 - [00117] T em F60;
 - [00118] Q em L61;
 - [00119] Y em D63;
 - [00120] P em S64;
 - [00121] N ou D em I65;
 - [00122] A em S70;
 - [00123] R em Q80;
 - [00124] Q ou S em M85;
 - [00125] Q ou H em K93;
 - [00126] S em C120.
- [00127] 4. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 1 ou 2 compreende a substituição S25N ou S25P.
- [00128] 5. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 1 a 3, compreendendo a substituição S25N, K93Q ou K93H.
- [00129] 6. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 1 a 5, compreendendo uma sequência de aminoácidos, pelo menos, 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% idêntico a qualquer uma das SEQ ID NOS: 36-55, ou uma sequência de aminoácidos, pelo menos, 70%, 80%, 90%, 95%, 98 ou 99% idêntica à sequência de CTLA-4 de aminoácidos codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948.
- [00130] 7. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das

cláusulas 1 a 6, compreendendo o domínio do aminoácido com a SEQ ID NO: 69 nos resíduos 59-65, em que a numeração dos resíduos inicia-se com referência à SEQ ID NO: 35.

[00131] 8. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 1 a 6, compreendendo uma combinação de mutações selecionadas a partir de:

[00132] - as mutações 1315, isto é, S em I16; N em S25; G em L58; A em S70; R em Q80; S em M85; e Q em K93;

[00133] - as mutações 1322, isto é, N em S25; S em G27; K em M54; S em N56; S em T59; T em F60; Q em L61; Y em D63; P em S64; N em I65; e Q em K93;

[00134] - as mutações 1321, isto é, S em I16; N em S25; K em M54; G em L58; A em S70; R em Q80; S em M85; e Q em K93;

[00135] - as mutações 1115, isto é, V em I16; N em S25; G em L58; A em S70; Q em M85; e Q em K93;

[00136] - as mutações 1299, isto é, R em I16; T em A24; N em S25; S em G27; A em L58; A em S70; Q em M85; e Q em K93; e

[00137] - as mutações 1227, isto é, S em I16; N em S25; S em G27; A em L58; A em S70; Q em M85; e H em K93.

[00138] 9. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas anteriores, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOS: 36-55, ou compreendendo a sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948 ou compreendendo uma variante de uma destas sequências com até dez mutações de aminoácidos.

[00139] 10. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas anteriores, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOS: 36-55, ou compreendendo a sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada

pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948 ou compreendendo uma variante de uma destas sequências com até cinco mutações de aminoácidos.

[00140] 11. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 10, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOS: 36-55, ou compreendendo a sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948 ou compreendendo uma variante de uma destas sequências com até três mutações de aminoácidos.

[00141] 12. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 1 ou cláusula 2, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOS: 36-55 ou compreendendo a sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948.

[00142] 13. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 12, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 47 ou a sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948.

[00143] 14. Um polipeptídeo isolado de CTLA-4 tendo uma maior afinidade de ligação para CD80 humano, uma maior potência e/ou uma maior estabilidade em comparação com o tipo selvagem de CTLA-4 SEQ ID NO: 35, em que o polipeptídeo compreende:

[00144] (i) sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 ou SEQ ID NO: 47;

[00145] (ii) uma sequência de aminoácidos que é uma variante de (i) que contém até dez mutações de aminoácidos, em que o resíduo 25

não é mutado e é N;

[00146] (iii) uma sequência de aminoácidos que é uma variante de (i) que compreende uma ou mais mutações de aminoácidos, em que o resíduo 25 não sofre mutação e é N, a variante possui pelo menos 70% de identidade de sequência com (i); ou

[00147] (iv) uma sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948.

[00148] 15. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 14, compreendendo a sequência SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 ou SEQ ID NO: 47, ou uma variante de uma destas sequências com até cinco mutações de aminoácidos.

[00149] 16. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 15, compreendendo a sequência SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 ou SEQ ID NO: 47, ou uma variante de uma destas sequências com até três mutações de aminoácidos.

[00150] 17. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 14, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos tendo, pelo menos, 80% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 ou SEQ ID NO: 47.

[00151] 18. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 17, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos tendo, pelo menos, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência com SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 ou SEQ ID NO: 47.

[00152] 19. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas anteriores, tendo uma afinidade de 50 nM ou menos

para a ligação de CD80 humano, em que a afinidade é Kd, tal como determinado por ressonância de plasma de superfície.

[00153] 20. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 19, tendo uma afinidade de 20 nM ou menos para a ligação de CD80 humano, em que a afinidade é Kd, tal como determinado por ressonância de plasma de superfície.

[00154] 21. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas anteriores, em que o polipeptídeo tem uma maior afinidade do que CTLA-4 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 35) para ligação a CD86 humano.

[00155] 22. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 14 a 21, compreendendo:

[00156] - S no resíduo 16; N no resíduo 25; G no resíduo 58; A no resíduo 70; R no resíduo 80; S no resíduo 85; e Q no resíduo 93;

[00157] - N no resíduo 25; S no resíduo 27; K no resíduo 54; S no resíduo 56; S no resíduo 59; T no resíduo 60; Q no resíduo 61; Y no resíduo 63; P no resíduo 64; N no resíduo 65; e Q no resíduo 93;

[00158] - S no resíduo 16; N no resíduo 25; K no resíduo 54; G no resíduo 58; A no resíduo 70; R no resíduo 80; S no resíduo 85; e Q no resíduo 93;

[00159] - V no resíduo 16; N no resíduo 25; G no resíduo 58; A no resíduo 70; Q no resíduo 85; e Q no resíduo 93;

[00160] - R no resíduo 16; T no resíduo 24; N no resíduo 25; S no resíduo 27; A no resíduo 58; A no resíduo 70; Q no resíduo 85; e Q no resíduo 93; ou

[00161] - S no resíduo 16; N no resíduo 25; S no resíduo 27; A no resíduo 58; A no resíduo 70; Q no resíduo 85; e H no resíduo 93.

[00162] 23. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 14 a 22, compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36,

SEQ ID NO: 42 ou SEQ ID NO: 47, com até três mutações de aminoácidos.

[00163] 24. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 14 a 18, compreendendo: R, I, S ou V na posição 16; T ou A na posição 24; S ou G na posição 27; M ou K na posição 54; N ou S na posição 56; A, L ou G na posição 58; T ou S na posição 59; F ou T na posição 60; L ou Q na posição 61; D ou Y na posição 63; S ou P na posição 64; I, N ou D na posição 65; A ou S na posição 70; Q ou R na posição 80; Q, M ou S na posição 85; Q ou H na posição 93; e C ou S na posição 120.

[00164] 25. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 1 a 6, em que as mutações de aminoácidos são selecionadas a partir de: substituição de T no resíduo 16; substituição de I no resíduo 32; substituição de G no resíduo 41; substituição de G no resíduo 42; substituição de E no resíduo 44; substituição de G no resíduo 56; substituição de S ou P no resíduo 58; substituição de A no resíduo 59; substituição de P no resíduo 61; substituição de G no resíduo 62; substituição de V ou T no resíduo 65; substituição de T, M ou H no resíduo 70; substituição de V, R, K ou L no resíduo 85; substituição de S no resíduo 87; substituição de T, E ou M no resíduo 93; substituição de R, Q ou E no resíduo 104; substituição de V no resíduo 106; substituição de D ou S no resíduo 108; substituição de V ou F no resíduo 115; substituição de S no resíduo 120; deleção do resíduo 51.

[00165] 26. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 14, compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 ou SEQ ID NO: 47 ou compreendendo a sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948.

[00166] 27. Um polipeptídeo CTLA-4 isolado que tem pelo menos 10 vezes maior afinidade de ligação para CD80 do que para CD86.

[00167] 28. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 27, que tem, pelo menos, 50 vezes maior afinidade de ligação para CD80 do que para CD86.

[00168] 29. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 27 ou a cláusula 28, em que o polipeptídeo é tal como definido em qualquer uma das cláusulas 1 a 26.

[00169] 30. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas anteriores, conjugado com uma sequência de aminoácidos de Fc de IgG.

[00170] 31. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 30, em que o Fc de IgG é Fc de IgG1 humana modificada para reduzir a função efetora Fc e compreende uma região de dobradiça de Fc de IgG1 humana nativa.

[00171] 32. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 30 ou a cláusula 31, em que a sequência de aminoácidos de IgG Fc compreende uma região IgG1 Fc humana, em que um ou ambos dos seguintes grupos de resíduos são substituídos como se segue:

[00172] F no resíduo 20; E no resíduo 21; S no resíduo 117; e

[00173] Y no resíduo 38, T no resíduo 40, E no resíduo 42,

[00174] a numeração dos resíduos inicia-se com referência à SEQ ID NO: 56.

[00175] 33. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 30 a 32, em que a sequência de aminoácidos IgG Fc é SEQ ID NO: 59.

[00176] 34. Um polipeptídeo CTLA-4 isolado compreendendo a sequência de aminoácidos de CTLA-4-Ig 1299 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948.

[00177] 35. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma

das cláusulas anteriores, em que o polipeptídeo é um multímero.

[00178] 36. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 35, em que o polipeptídeo CTLA-4 é um dímero.

[00179] 37. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 35, em que o polipeptídeo CTLA-4 é um tetrâmero.

[00180] 38. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a cláusula 37, em que o tetrâmero compreende dois pares de polipeptídeos CTLA-4 cada par compreendendo um polipeptídeo CTLA-4 fundido com uma região constante da cadeia leve de um anticorpo e um polipeptídeo CTLA-4 fundido com a região constante da cadeia pesada de um anticorpo.

[00181] 39. Uma célula hospedeira contendo o ácido nucleico, em que o ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de CTLA-4-Ig 1299 depositada sob o número de acesso NCIMB 41948.

[00182] 40. Uma composição compreendendo:

[00183] um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas anteriores; e

[00184] um ou mais excipientes farmacêuticos.

[00185] 41. Uma composição compreendendo:

[00186] um polipeptídeo CTLA-4 compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 47 ou a sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948, conjugada com uma sequência de aminoácidos de IgG Fc; e

[00187] um ou mais excipientes farmacêuticos.

[00188] 42. Uma composição de acordo com a cláusula 40 ou cláusula 41, em que polipeptídeo CTLA-4 é conjugado com uma sequência de aminoácidos de IgG Fc compreendendo a SEQ ID NO: 59.

[00189] 43. Uma composição de acordo com a cláusula 42, em que polipeptídeo CTLA-4 conjugado com IgG Fc compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 16.

[00190] 44. Uma composição compreendendo o polipeptídeo CTLA-4-Ig 1299 codificado pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948 e um ou mais excipientes farmacêuticos.

[00191] 45. Uma composição de acordo com qualquer uma das cláusulas 40 a 44, compreendendo o polipeptídeo CTLA-4 a uma concentração de pelo menos 70 mg/mL.

[00192] 46. Uma composição de acordo com a cláusula 45, que compreende o polipeptídeo CTLA-4 a uma concentração de pelo menos 100 mg/mL.

[00193] 47. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 1 a 38, ou uma composição de acordo com qualquer uma das cláusulas 40 a 46, para utilização num método de tratamento de um paciente, por via subcutânea ou intravenosa.

[00194] 48. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 1 a 38, ou uma composição de acordo com qualquer uma das cláusulas 40 a 46, para utilização num método de tratamento de artrite reumatoide, esclerose múltipla, asma, doença de Crohn, colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico, ou rejeição de transplante.

[00195] 49. Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das cláusulas 1 a 38, ou uma composição de acordo com qualquer uma das cláusulas 40 a 46, para utilização num método de tratamento que compreende a administração do referido polipeptídeo CTLA-4 ou da referida composição a um paciente em intervalos de 28 dias.

[00196] 50. Um método de produção de um outro polipeptídeo CTLA-4, por mutação de uma sequência de aminoácidos do

polipeptídeo CTLA-4 selecionada a partir de SEQ ID NOS 36-55 ou da sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948, o método compreendendo:

[00197] providenciando um polipeptídeo CTLA-4, que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID NOS 36-55 ou na sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948;

[00198] introdução de uma ou mais mutações na sequência de aminoácidos para proporcionar um outro polipeptídeo CTLA-4;

[00199] testar a estabilidade, afinidade e/ou a potência do outro polipeptídeo CTLA-4; e

[00200] formulação de mais polipeptídeos CTLA-4 em uma composição que compreende um ou mais excipientes farmacêuticos.

[00201] 51. Um método de acordo com a cláusula 50, em que o outro polipeptídeo CTLA-4 é conjugado com uma região Fc.

Potência biológica

[00202] CTLA-4 solúvel compete com CD28 expresso na superfície dos linfócitos T, inibindo a ligação de ligandos de CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) a CD28, que de outro modo resultaria em co-estimulação e ativação de linfócitos T. Assim, CTLA-4 solúvel inibe a ativação dos linfócitos T. A potência desta inibição por CTLA-4 exógeno solúvel pode ser determinada em ensaios *in vitro*. CTLA-4 pode opcionalmente ser conjugado com uma outra molécula, por exemplo, como uma proteína de fusão. Por exemplo, uma IgG Fc pode estar presente, como aqui descrito. O ensaio pode ser utilizado para determinar qualitativamente se um polipeptídeo CTLA-4 é mais ou menos potente do que o tipo selvagem, utilizando CTLA-4 tipo selvagem (opcionalmente conjugado com Fc, de acordo com o caso) como um controle e também pode proporcionar informação

quantitativa relativamente à magnitude da diferença de potência. Os métodos para a realização destes testes e para analisar o significado estatístico dos dados de forma fiável de forma a produzir informação qualitativa ou quantitativa são conhecidos na técnica.

[00203] A ligação de um polipeptídeo CTLA-4 pode ser medida através da produção de IL-2, uma vez que a ligação de CTLA-4 a CD80 e CD86 atenua a produção de IL-2. Os ensaios adequados podem compreender a detecção da quantidade de IL-2 produzida, por exemplo por ELISA.

[00204] Uma redução na quantidade de produção de IL-2 pode ser parcial ou total. Um polipeptídeo CTLA-4 pode reduzir a produção de IL-2 por, pelo menos, 50%, 75% ou 80%, de preferência, pelo menos, 85%, 90% ou 95%, com as concentrações testadas.

[00205] Um ensaio duplo de célula pode ser utilizado para identificar os polipeptídeos CTLA-4 com uma potência mais elevada do que o de tipo selvagem. Os polipeptídeos CTLA-4 são ensaiados para medir a inibição da sinalização. A co-cultura de células T que expressam CD28 (por exemplo, células Jurkat) e de células B que expressam CD80 e CD86 (por exemplo, células Raji) resulta na produção de IL-2 devido à interação entre CD28 e os ligandos CD80 e CD86 na presença de fito-hemaglutinina (PHA). IL-2 é então detetada através de ELISA. Ver o Exemplo 3 para um exemplo detalhado deste ensaio.

[00206] Ensaios de ativação das células T primárias humanas podem ser usados para avaliar a potência dos polipeptídeos selecionados. Polipeptídeos CTLA-4 podem ser classificados pela sua capacidade para inibir a secreção de IL-2 mediada por CD80/86 a partir de linfócitos T CD4+ humanos primários. Os polipeptídeos CTLA-4 também podem ser classificados pela sua capacidade para inibir a proliferação de linfócitos T CD4+ humanos, estimulada por anti-CD3,

na presença de células Raji expressando CD80 e CD86. A proliferação pode ser ensaiada utilizando um ensaio de luminescência homogênea (ATP lite). Uma vantagem deste teste é que mede a potência dos polipeptídeos CTLA-4 para bloquear a ativação de linfócitos CD4+ primários humanos. Ver o Exemplo 4 para um exemplo detalhado deste ensaio.

[00207] Tem-se mostrado que certos polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção ligam-se a CD80 e CD86 com uma potência elevada no ensaio de medição da ativação de células T. Os polipeptídeos CTLA-4 bloqueiam os ligantes CD80 e CD86, prevenindo assim os sinais de ativação adicionais a partir destas moléculas e levando à redução da produção de IL-2.

[00208] A potência dos polipeptídeos CTLA-4 pode ser determinada ou medida usando um ou mais ensaios conhecidos para o perito na especialidade e/ou como descritos ou referidos aqui. A potência é uma medida da atividade expressa em termos da quantidade necessária para produzir um efeito. Tipicamente, uma titulação de um polipeptídeo é comparada num ensaio de células e os valores de IC₅₀ são relatados. Em ensaios funcionais, o IC₅₀ é a concentração de um produto que reduz uma resposta biológica em 50% do seu máximo. IC₅₀ pode ser calculado pela plotagem de % de respostas biológicas máximas como uma função do log da concentração produto e utilizando um programa de software, tal como Prism (GraphPad) para ajustar uma função sigmóide aos dados para gerar os valores de IC₅₀. Quanto mais baixo o valor de IC₅₀ mais potente é o produto.

[00209] Os polipeptídeos CTLA-4 podem ser descritos como tendo uma potência aumentada conforme menos for necessária em comparação com uma referência (por exemplo, o tipo selvagem), de polipeptídeo CTLA-4, para produzir a inibição da produção de IL-2. Tal também se reflete nos valores de IC₅₀ relatados. Os polipeptídeos

CTLA-4 preferidos têm potência aumentada em comparação com CTLA-4 de tipo selvagem humano (SEQ ID NO: 35).

[00210] Um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a invenção pode ter uma maior potência em relação ao tipo selvagem de SEQ ID NO: 35, em que a potência é uma redução em IC₅₀, num ensaio de produção de IL-2, utilizando células T ativadas por células B. A potência pode ser pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos, 40 vezes ou, pelo menos, 50 vezes maior do que o tipo selvagem. Tal como descrito nos Exemplos, um polipeptídeo de SEQ ID NO: 36 (variante 1315) revelou ter cerca de 120 vezes maior potência do que o tipo selvagem de CTLA-4. A potência pode, por exemplo, ser até 150 vezes, até 130 vezes, até 120 vezes, até 100 vezes, até 80 vezes, até 70 vezes ou até 60 vezes maior do que no tipo selvagem. A melhoria na potência pode, por exemplo, estar na gama de 10 vezes a 100 vezes maior do que no tipo selvagem.

[00211] A potência de um polipeptídeo CTLA-4 pode ser determinada com referência a sequências do polipeptídeo CTLA-4 aqui exemplificadas, em vez de (ou assim como) ser com referência ao tipo selvagem, por exemplo, a potência pode ser comparada com qualquer uma das SEQ ID NO: 37 (variante 1322), SEQ ID NO: 38 (variante 1321), SEQ ID NO: 43 (variante 1299), SEQ ID NO: 36 (variante 1315), SEQ ID NO: 42 (variante 1115), SEQ ID NO: 47 (variante 1227) ou variante 1299 como codificadas pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948. Assim, uma destas variantes de CTLA-4 pode ser utilizada como um controle no ensaio. Um polipeptídeo CTLA-4 pode ser, pelo menos, tão potente quanto uma ou mais destas variantes, por exemplo, pelo menos, tão potente como a SEQ ID NO: 43 (variante 1299) ou SEQ ID NO: 47 (variante 1227). Um polipeptídeo CTLA-4 pode ter uma potência que é

aproximadamente a mesma ou menor do que a potência da SEQ ID NO: 36 (variante 1315).

Afinidade

[00212] A afinidade de um polipeptídeo CTLA-4 para a ligação de CD80 ou CD86 pode ser determinada como a afinidade monovalente, utilizando ressonância de plasma de superfície para determinar Kd. Ver Exemplo 8 para um exemplo prático da utilização de ressonância de plasma de superfície para medir a afinidade de ligação e determinar Kd. Kd resultante pode ser comparado com CTLA-4 de tipo selvagem de SEQ ID NO: 35 ou em comparação com a de um dos polipeptídeos CTLA-4 de SEQ ID NO: 37 (variante 1322), SEQ ID NO: 38 (variante 1321), SEQ ID NO: 43 (variante 1299), SEQ ID NO: 36 (variante 1315), SEQ ID NO: 42 (variante 1115), SEQ ID NO: 47 (variante 1227) ou variante 1299 como codificadas pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948 para determinar a afinidade relativa. Um polipeptídeo CTLA-4 pode ter uma maior afinidade de ligação para CD86 humano e/ou CD80 humano, em comparação com a afinidade de CTLA-4 de tipo selvagem.

[00213] Um polipeptídeo CTLA-4 pode ter uma afinidade de ligação para CD80 humano que é maior do que a de CTLA-4 de tipo selvagem, por exemplo, pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 100 vezes ou pelo menos 140 vezes maior do que no tipo selvagem. O polipeptídeo CTLA-4 pode ter, pelo menos, a afinidade de ligação para CD80 humano de uma ou mais de SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 47 ou, pelo menos, a afinidade da variante CTLA-4 1299 como codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948. Um polipeptídeo CTLA-4 pode ter uma afinidade para ligação a CD80 humano que é

aproximadamente a mesma ou menor do que a afinidade da SEQ ID NO: 37. Kd para a ligação de CD80 humano, pode ser de 50 nM ou menos, por exemplo, 25 nM ou menos, 20 nM ou menos ou 10 nM ou menos. Por exemplo, Kd pode estar no intervalo de 5 a 50 nM.

[00214] Um polipeptídeo CTLA-4 pode ter uma afinidade de ligação para CD86 humano que é maior do que a de CTLA-4 de tipo selvagem, por exemplo, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes ou pelo menos 10 vezes maior do que no tipo selvagem. O polipeptídeo CTLA-4 pode ter, pelo menos, a afinidade de ligação para CD86 humano de uma ou mais de SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 47 ou, pelo menos, a afinidade da variante CTLA-4 1299 como codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948. Um polipeptídeo CTLA-4 pode ter uma afinidade para ligação a CD86 humano que é aproximadamente a mesma ou menor do que a afinidade da SEQ ID NO: 37. Kd para a ligação de CD86 humano, pode ser de 2 nM ou menos, por exemplo, 1,5 nM ou menos ou 1 nM ou menos. Por exemplo, Kd pode estar no intervalo de 0,5 a 2 nM.

Seletividade para CD80 em relação a CD86

[00215] Os polipeptídeos CTLA-4 aqui descritos podem ligar-se tanto a CD80 e CD86, mas podem ligar-se seletivamente ao CD80 em preferência a CD86. É conhecido que o tipo selvagem de CTLA-4 tem uma maior afinidade de ligação para CD80 em comparação com CD86, e um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a invenção pode também ter uma maior afinidade de ligação para CD80 do que para CD86. No entanto, um polipeptídeo CTLA-4 pode ter uma maior seletividade para a ligação a CD80, de preferência para CD86, em comparação com o tipo selvagem de CTLA-4. Por exemplo, em ensaios de ressonância de plasma de superfície, como aqui descrito,

CTLA-4 de tipo selvagem exibiu cerca de 4 vezes maior afinidade de ligação para CD80 do que para CD86. Em contraste, os polipeptídeos CTLA-4 podem apresentar mais de 10 vezes, mais de 20 vezes, mais de 30 vezes, mais de 40 vezes ou superior a 50 vezes maior afinidade de ligação para CD80 do que para CD86. Por exemplo, um polipeptídeo CTLA-4 pode apresentar 120 vezes ou 130 vezes maior afinidade de ligação para CD80 do que para CD86. Assim, quando comparado com a afinidade de CTLA-4 de tipo selvagem, um polipeptídeo CTLA-4 pode apresentar um maior aumento na afinidade para CD80 do que para CD86. A preferência seletiva para CD80 em relação a CD86 pode ser vista com CD80 humano e CD86 humano.

[00216] Além disso, a mesma preferência seletiva pode ser retida com CD80 e CD86 de macaco cinomolgo. A diferença na afinidade para a ligação de CD80 em relação a CD86 pode ser aproximadamente a mesmo para CD80 e CD86 humano e de cinomolgo.

[00217] As melhorias na afinidade de ligação a CD80 deverão conferir um melhor perfil biológico para a utilização médica. Através da ligação a CD80, que é sobre-regulada em células apresentadoras de抗ígenos no contexto de uma resposta imunitária ativa, CTLA-4 inibe a ligação de CD80 a CD28 nas células T, bloqueando, assim, o sinal de ativação da célula T. Assim, um polipeptídeo CTLA-4 pode ser usado para atenuar a resposta das células T *in vivo* e para o tratamento de condições em que tal é benéfico, como descrito aqui.

[00218] Por engenharia de um polipeptídeo CTLA-4 que direciona seletivamente CD80 em relação a CD86, podem ser obtidos grandes ganhos de afinidade de ligação para CD80. Embora a literatura é inconclusiva quanto às funções relativas de CD80 e CD86, os polipeptídeos da presente invenção ligam-se seletivamente a CD80 em relação a CD86 e exibem excelentes perfis biológicos adequados

para uso terapêutico, como mostrado nos vários ensaios. Sem estar limitado pela teoria, os atributos dos presentes polipeptídeos CTLA-4 podem atribuíveis, pelo menos em parte, à elevada afinidade para ligação a CD80 e/ou para a ligação preferencial de CD80 em relação a CD86.

[00219] Vários dados apontam para um papel de CD80 de entrega de um maior sinal de ativação para os linfócitos T. Por exemplo:

[00220] As células CHO transduzidas CD80 induzem um aumento da produção de IL-2 a partir de células T primárias humanas em comparação com células CHO transduzidas CD86 (Slavik et al. *JBC* 274(5):3116-3124 1999);

[00221] CD80 induz o aumento da atividade de NFkB e do fator de transcrição AP-1 em comparação com CD86 em células T Jurkat (fatores importantes para a produção de citocinas, tais como IL-2) (Olsson et al. *Int. Immunol.* 10(4):499-506 1998);

[00222] CD80 induz o aumento da expressão de CD25 em células T CD8+ que interagem com as células dendríticas infetadas com vírus, em comparação com CD86 (importante para a sobrevivência e proliferação de células T) (Pejawar-Gaddy & Alexander-Miller, *J. Immunol.* 177:4495-4502 2006); e

[00223] em um modelo murino de asma alérgica, utilizando uma molécula mutada CTLA-4 Ig, foi descoberto que CD80, mas não CD86, é um importante fator de eosinofilia pulmonar (Harris et al. *J. Exp. Med.* 185(1) 1997).

[00224] Preferencialmente, o aumento da afinidade de CTLA-4 a CD80 pode, assim, conduzir a uma melhor inibição da ativação das células T por direcionar a via mais eficiente de ativação das células T CD80.

[00225] Além disso, há alguma evidência de que a sinalização de CD86 pode ter um efeito anti-inflamatório benéfico em alguns modelos

de doenças. Por exemplo, num modelo de rato para sepsia, observou-se a mortalidade e a gravidade a ser associada com a sobre-regulação de CD80 e concomitante sub-regulação de CD86 (Nolan et al. *PLoS ONE* 4(8):6600 2009). Assim, uma ligação seletiva de CD80 em relação a CD86 pode proporcionar uma vantagem, uma vez que pode inibir a ligação de CD80 a CD28, ao mesmo tempo reduzir a interação de CD28 para um menor grau.

[00226] Ambas as células positivas de CD80 e CD86 podem ser encontradas nas articulações de doentes com artrite reumatoide, e a ligação de ambas as moléculas B7 podem contribuir para o efeito terapêutico, enquanto a seletividade para CD80 em relação a CD86 pode contribuir para os efeitos qualitativos e quantitativos desejáveis na inibição da ativação de células T. Deste modo, os polipeptídeos CTLA-4 da invenção podem ligar-se tanto a CD80 e CD86 e podem ter uma maior afinidade para CD80 do que para CTLA-4 de tipo selvagem, e também podem ter uma afinidade mais elevada para CD86 do que para o tipo selvagem de CTLA-4.

Reatividade cruzada

[00227] De preferência, os polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção mantêm o perfil de reatividade cruzada do tipo selvagem de CTLA-4.

[00228] O polipeptídeo CTLA-4 pode mostrar uma reatividade cruzada para a ligação de CD80 e CD86 de cinomolgo e/ou rato, assim como CD80 e CD86 humanos. A diferença na afinidade para CD80 de cinomolgo em comparação com CD80 humano pode situar-se dentro de 10 vezes, dentro de 5 vezes, dentro de 2 vezes, cerca de 1,5 vezes ou 1,2 vezes. A diferença na afinidade para CD86 de cinomolgo em comparação com CD86 humano pode situar-se dentro de 10 vezes, dentro de 5 vezes, dentro de 2 vezes, cerca de 1,5 vezes ou de 1,2 vezes. A diferença na afinidade para CD80 de rato em

comparação com o CD80 humano pode situar-se dentro de 10 vezes, dentro de 5 vezes, dentro de 2 vezes, cerca de 1,5 vezes ou de 1,2 vezes. A diferença na afinidade para CD86 de rato em comparação com o CD86 humano pode situar-se dentro de 10 vezes, dentro de 5 vezes, dentro de 2 vezes, cerca de 1,5 vezes ou de 1,2 vezes.

[00229] O polipeptídeo CTLA-4 pode inibir a ativação de linfócitos T de cinomolgo, por exemplo, medida como a inibição da produção de IL-2 numa reação mista de linfócitos, utilizando células mononucleares de sangue periférico a partir de macacos cinomolgos. O polipeptídeo pode apresentar uma maior potência do que o tipo selvagem de CTLA-4 em um ensaio para a inibição da ativação de linfócitos T de cinomolgos.

[00230] Os dados para as espécies de reatividade cruzada, por exemplo, polipeptídeos CTLA-4 da invenção são mostrados no Exemplo 8.

[00231] O polipeptídeo CTLA-4 pode mostrar ligação específica para a CD80 e CD86 em preferência a outras proteínas relacionadas na família B7. Assim, pode haver uma falta de reatividade cruzada com PD-L2, B7-H1, B7-H2, B7-H3 e B7-H3B.

[00232] Os ensaios para determinar a especificidade são conhecidos na área técnica. Por exemplo, pode ser utilizado um imunoensaio de enzimas. Ver o Exemplo 6 para um exemplo deste ensaio adequado.

Estabilidade

[00233] Um polipeptídeo CTLA-4, de preferência, retém pelo menos a estabilidade de CTLA-4 de tipo selvagem e é, de preferência, mais estável do que o tipo selvagem, por exemplo, como medido para CTLA-4 por si só ou CTLA-4 conjugado com (por exemplo, fundido) uma região Fc, tal como descrito abaixo.

[00234] Acredita-se que conjugados CTLA-4 Fc mais estáveis

("CTLA-4 Ig") serão mais capazes de tolerar a formulação com elevadas (por exemplo, ≥ 100 mg/mL) concentrações, necessárias para entrega subcutânea.

[00235] A estabilidade pode ser testada num ensaio de degradação. Tipicamente, esta compreende a incubação do produto a uma temperatura fixa (por exemplo, 5 °C ou 25 °C) durante um período de tempo, por exemplo, por um mês, e determinar a extensão da perda da pureza (grau de degradação) ao longo desse mês. A agregação e/ou fragmentação podem contribuir para a perda de pureza e cada uma pode ser medida separadamente para determinar a percentagem para dois valores, somando à % de perda de pureza. Exemplos de ensaios de degradação são estabelecidos no Exemplo 9 e no Exemplo 10.

[00236] Um polipeptídeo CTLA-4 com uma estabilidade melhorada pode ser mais receptivo a vias de administração, tais como administração subcutânea, devido à agregação reduzida, o que não apenas aumenta a eficácia, mas também reduz o risco de neutralização ou de ligação de anticorpos a ser induzida.

Conjugação de Fc

[00237] Numa modalidade, a invenção proporciona uma afinidade optimizada da molécula CTLA-4 Ig, opcionalmente com uma semivida prolongada (por exemplo, incluindo uma mutação YTE, adicionalmente aqui descrito), para formulação subcutânea ou intravenosa e para o intervalo de dosagem mensal, 28 dias ou menos frequente, para o tratamento de AR moderada a grave, ou outras condições como descrito.

[00238] A invenção proporciona um polipeptídeo que consiste em uma sequência de polipeptídeo CTLA-4 ou que compreende ou é conjugado com uma sequência de peptídeo ou de polipeptídeo, por exemplo, com uma molécula de anticorpo ou uma parte de uma

molécula de anticorpo. Por exemplo, um polipeptídeo CTLA-4 pode ser conjugado com uma sequência de aminoácidos de Fc do anticorpo, por exemplo, Fc de IgG. Uma região Fc compreende uma dobradiça, uma região CH2 e CH3. De preferência, IgG é IgG humana, por exemplo, IgG1, IgG2 ou IgG4.

[00239] Variantes alótipo de IgG1 são conhecidos. De preferência, uma região Fc de IgG1 compreende E no resíduo 142 e M no resíduo 144 (numeração correspondente a SEQ ID NO: 56, partindo de 1, como mostrado na Figura 1). Este alótipo está bem representado na população em geral. Uma região alternativa Fc de IgG1 representando um alótipo diferente, compreende D no resíduo 142 e L no resíduo 144. Este alótipo é empregado em Abatacept.

[00240] A sequência de aminoácidos de IgG Fc pode compreender a sequência de aminoácidos de Fc IgG humana (por exemplo IgG1 ou IgG4) com certas mutações. Por exemplo, onde IgG humana IgG1 é, a sequência de aminoácidos pode ser mutada para reduzir ou suprimir as funções efetoras de Fc, por exemplo, citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). A remoção de funções efetoras de Fc pode ser confirmada através de ensaios de rotina conhecidos. Ver Exemplo 7 para ensaios exemplificativos para a determinação de ADCC e CDC.

[00241] Sabe-se que a função efetora de IgG1 pode ser reduzida por mutação da região de dobradiça de IgG1 Fc. Um exemplo desta situação é na construção Abatacept CTLA-4 - IgG1 Fc, que incorpora uma sequência de dobradiça mutada na região IgG1 Fc, em que o tipo selvagem C é mutado para S. A região IgG1 de Abatacept inclui uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 71, que corresponde à sequência de aminoácidos de IgG1 Fc humana do tipo selvagem SEQ ID NO: 70 com o tipo selvagem C substituído por S. As substituições estão nos resíduos de 6, 12 e 15 da região Fc.

[00242] SEQ ID NO: 70 VEPKSCDKTHTCPPCPAPE

[00243] SEQ ID NO: 71 QEPKSSDKTHTSPPPAPE

[00244] No contexto da presente invenção foi surpreendentemente descoberto que esta mutação reduz a estabilidade do domínio FC, de modo que CTLA4 Abatacept - fusão IgG1 Fc tem uma estabilidade mais baixa do que a fusão CTLA-4 - IgG1 Fc, na qual a sequência de IgG1 Fc do tipo selvagem é usada. Esta perda de estabilidade é indesejável, mas que é importante para reduzir ou evitar a função efetora de IgG1 Fc.

[00245] Uma região Fc conjugada a um polipeptídeo CTLA-4 da invenção, de preferência, não compreende a SEQ ID NO: 71. De preferência, as cisteína nos resíduo 6, 12 e/ou 15 de Fc são retidos. De preferência, um conjugado CTLA-4 -Fc de acordo com a invenção compreende uma região de dobradiça de IgG1 Fc humana de tipo selvagem humano. De preferência, a região Fc compreende a SEQ ID NO: 70. A região Fc pode ser a região Fc do polipeptídeo CTLA4-Ig 1299 como codificado pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948.

[00246] Enquanto que a reversão de Fc Abatacept para o tipo selvagem suprime a instabilidade causada pela mutação Fc, tal também restaura as funções efetoras de IgG1 Fc, o que é indesejável em muitas aplicações terapêuticas. Por conseguinte, esta mutação melhora a estabilidade do domínio Fc Abatacept mas apenas à custa da re-introdução da função efetora indesejável.

[00247] Outras regiões de IgG fc com baixa ou nenhuma função efetora podem ser utilizadas, por exemplo, IgG2.

[00248] A presente invenção proporciona uma forma para utilizar IgG1 Fc em que faltam as funções efetoras, ao mesmo tempo ultrapassando o problema da reduzida estabilidade inerente à mutação Abatacept. Uma região Fc de acordo com a invenção pode ser uma

IgG1 Fc que comprehende uma mutação tripla (TM) L20F, L21E, P117S (Oganesyan et al 2008 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 64:700-4). Esta mutação reduz a função efetora Fc, sem reduzir a estabilidade. Por conseguinte, um tal domínio de Fc facilita a formulação de construções CTLA-4 - Fc a concentrações elevadas, que são adequadas para a produção de composições para administração por via subcutânea.

[00249] Ainda outros benefícios podem ser atingidos através da incorporação de uma mutação "YTE" na região Fc (Dall'Acqua et al 2006 J Biol Chem. 281:23514-24). A mutação YTE proporciona uma meia-vida *in vivo* prolongada, o que pode melhorar a eficácia terapêutica e/ou pode permitir benefícios terapêuticos a serem conseguidos com uma dosagem reduzida ou menos frequente, tal como a dosagem mensal. Um domínio Fc utilizado nos produtos da invenção pode compreender Y no resíduo 38, T no resíduo 40 e E no resíduo 42. Tal representa mutações M38Y, S40T, T42E em IgG1 Fc humana.

[00250] Diferente de YTE e/ou mutação tripla acima mencionada, é preferível que os outros resíduos do domínio Fc sejam resíduos de tipo selvagem de IgG humana. Alguma variação IgG1 Fc humana é conhecida e a região Fc pode compreender qualquer IgG1 humana com YTE e/ou mutação tripla.

[00251] Preferencialmente, o polipeptídeo CTLA-4 é conjugado com uma sequência de aminoácidos IgG1 Fc SEQ ID NO: 59. Tal inclui uma região de dobradiça de IgG1 Fc humana, sem a mutação Abataceptde C para S, incorpora a mutação tripla para reduzir a função efetora e inclui a extensão de semi-vida YTE.

[00252] As regiões Fc melhoradas aqui descritas podem ser utilizadas em conjunto com o tipo selvagem de CTLA-4, proporcionando ainda mais benefícios quando conjugado com um

polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a invenção. Um polipeptídeo CTLA-4 pode ser conjugado com o seu terminal C ao terminal N de uma região Fc, opcionalmente através de um ou mais aminoácidos de ligação ou um peptídeo ligante. Preferencialmente, o conjugado é uma proteína de fusão CTLA-4 - Fc.

[00253] Por exemplo, um polipeptídeo CTLA-4 compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 ou SEQ ID NO: 47 pode ser conjugado com uma sequência de aminoácidos IgG1 Fc SEQ ID NO: 59 ou com uma sequência de aminoácidos IgG1 Fc SEQ ID NO: 60.

[00254] De acordo com a invenção a proteína de fusão CTLA-4 – IgG Fc pode compreender SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 16.

[00255] O polipeptídeo CTLA-4 - IgG Fc 1299 codificado pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948 é uma modalidade da invenção. O polipeptídeo CTLA-4 1299 codificado pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB41948 pode, alternativamente, ser conjugado com uma região Fc diferente, se desejado.

Produtos polipeptídicos CTLA-4

[00256] Os polipeptídeos CTLA-4, incluindo o CTLA-4 - Fc, podem ser monoméricos ou multiméricos, por exemplo, diméricos, triméricos, tetraméricos ou pentaméricos. Como discutido aqui, CTLA-4 pode formar dímeros. Esta dimerização natural pode ser promovida através da conjugação do CTLA-4 com um domínio Fc ou outro domínio de dimerização.

[00257] Multímeros de polipeptídeos compreendendo uma pluralidade de polipeptídeos CTLA-4 são um aspecto da invenção. A pluralidade de polipeptídeos CTLA-4 dentro do multímero podem ser idênticos ou diferentes um do outro. Um multímero pode compreender

alguns polipeptídeos idênticos e/ou alguns polipeptídeos diferentes. Um multímero pode compreender um ou mais polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção e um ou mais outros polipeptídeos. O um ou mais outros polipeptídeos podem incluir, por exemplo, um de tipo selvagem de CTLA-4 e/ou um polipeptídeo que não é um polipeptídeo CTLA-4.

[00258] O multímero pode ser um dímero comprendendo dois polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção, que podem ser idênticos (um homodímero) ou diferentes (um heterodímero).

[00259] O multímero pode ser um tetrâmero composto por quatro polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção, que podem ser todos idênticos (um homotetrâmero) ou pode incluir um ou mais diferentes polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção (um heterotetrâmero). O multímero pode ser um tetrâmero constituído por dois polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção (idênticos ou diferentes um do outro) e dois outros polipeptídeos CTLA-4, tais como polipeptídeos do tipo selvagem de CTLA-4.

[00260] Onde CTLA-4 está na forma multimérica, o polipeptídeo CTLA-4 é opcionalmente conjugado com uma região Fc de imunoglobulina e/ou uma molécula de anticorpo. O conjugado pode ou não incluir um local de ligação ao antigênio de um anticorpo, domínio VH ou VL.

[00261] Um aspecto da invenção é um conjugado compreendendo um ou mais, por exemplo, dois, três, quatro ou cinco polipeptídeos CTLA-4 e uma molécula de anticorpo ou um domínio de anticorpo, de preferência humano. Domínios CTLA-4 dimerizados podem ser conjugados a pares de cadeia pesada-leve de anticorpo. Uma molécula de anticorpo pode compreender dois pares de cadeia pesada-leve, cada cadeia pesada compreende um domínio VH e um ou mais domínios constantes da cadeia pesada (por exemplo, CH1,

CH2 e CH3), e cada cadeia leve que compreende um domínio VL e uma região constante de cadeia leve, em que os dois pares de cadeia pesada-leve estão ligados por meio de dimerização dos domínios constantes da cadeia pesada e em que quatro polipeptídeos CTLA-4 são conjugados com a molécula de anticorpo, um CTLA-4 ligado a cada um dos quatro domínios variáveis. A região constante da cadeia leve pode ser a cadeia leve lambda ou kappa. Um par de moléculas de CTLA-4 pode ser ligado a cada par de domínio VH-VL, em que o polipeptídeo CTLA-4 ligado ao domínio VH forma um dímero com o polipeptídeo CTLA-4 ligado ao domínio VL. Preferivelmente, o terminal C do CTLA-4 é fundido com o terminal N do domínio VH ou VL. De preferência, o emparelhamento VH e VL não confere qualquer ligação com antígenos humanos conhecidos.

[00262] Opcionalmente, alguns ou todos os anticorpos de domínio VH e/ou VL são suprimidos, de modo que um polipeptídeo CTLA-4 esteja incluído no lugar de, ou no lugar de parte de, VH e/ou VL. Um dímero pode compreender, adequadamente, um par de polipeptídeos CTLA-4, um fundido com uma região constante da cadeia leve de anticorpo e um fundido com uma região constante da cadeia pesada de anticorpo. O tetrâmero pode compreender dois pares de polipeptídeos CTLA-4 cada par compreendendo um polipeptídeo CTLA-4 fundido com uma região constante da cadeia leve de um anticorpo e um polipeptídeo CTLA-4 fundido com a região constante da cadeia pesada de um anticorpo. Como observado acima, uma região constante da cadeia pesada compreende um ou mais domínios constantes de cadeia pesada, por exemplo, CH1, CH2 e CH3, e uma região constante de cadeia leve que podem ser lambda ou kappa.

[00263] A invenção também inclui pentâmeros CTLA4. Cinco polipeptídeos CTLA4 podem ser montados para formar um pentâmero, opcionalmente através de pentamerização de regiões Fc de anticorpos

ligados. A formação de pentâmero é facilitada usando a região Fc de IgM, que é naturalmente pentamérica. Assim, cinco polipeptídeo de CTLA4-Fc incluindo a região Fc de IgM, preferencialmente IgM humana, podem ser providenciados como um pentâmero. CTLA4 pentamérico tem sido descrita (Yamada et al. *Microbiol. Immunol.* 40(7):513-518 1996).

[00264] Os polipeptídeos em um multímero podem estar ligados de forma covalente, por exemplo, por pontes de dissulfeto. As ligações covalentes podem estar presentes entre o polipeptídeo CTLA4 e/ou entre qualquer região Fc ligada ao polipeptídeo CTLA-4. Quando se utilizam regiões Fc e/ou outros domínios de anticorpo, os polipeptídeos podem estar ligados da mesma maneira como ocorre naturalmente em tais domínios de Fc e/ou outros domínios de anticorpo. A formação de ligações dissulfureto entre os resíduos de cisteína de polipeptídeos CTLA-4 é descrita em outras partes deste documento.

[00265] Tais multímeros e conjugados podem ser utilizados em qualquer método ou para qualquer utilização, como aqui descrito para polipeptídeos CTLA-4. A estrutura multimérica pode promover a atividade biológica de CTLA-4, por exemplo, inibição da ativação de células T. A inibição de CTLA-4 de tipo selvagem é mostrada como sendo reforçada na forma tetramérica (Exemplo 11, Figura 7).

[00266] O polipeptídeo CTLA-4 pode ser marcado ou não marcado. Uma etiqueta pode ser adicionada à sequência de CTLA-4 ou a uma região Fc conjugada com ele.

[00267] CTLA-4 e/ou a região Fc pode ser glicosilada ou não glicosilada. De preferência, CTLA-4 e/ou Fc suportam a sua glicosilação humana normal.

[00268] Os polipeptídeos CTLA-4 como aqui descritos podem ser adicionalmente modificados e desenvolvidos para proporcionar outras variantes melhoradas ou alteradas. Por exemplo, a sequência de

aminoácidos de um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a invenção aqui descrita pode ser modificada através da introdução de uma ou mais mutações, por exemplo, substituições, para proporcionar um outro polipeptídeo CTLA-4, o qual pode então ser testado quanto à potência, afinidade (para a CD80 e/ou CD86) e/ou a sua estabilidade, por exemplo, conforme já descrito aqui.

[00269] Os polipeptídeos CTLA-4, de preferência retêm uma ou mais propriedades funcionais desejadas, como aqui descrito. Tais propriedades incluem a capacidade de se ligar a CD80 e/ou CD86, capacidade para se ligar a CD80 e/ou CD86 com uma afinidade maior do que CTLA-4 de tipo selvagem e/ou uma potência, afinidade e/ou estabilidade, tal como aqui descrito para polipeptídeos CTLA-4 da invenção, por exemplo, Kd para a ligação de CD80 humano de 50 nM ou menos, como determinado por ressonância de plasma de superfície. Como aqui descrito, um polipeptídeo de acordo com a invenção, tipicamente, tem uma maior afinidade de ligação para CD80 humano, uma maior potência e/ou uma maior estabilidade em comparação com o tipo selvagem de CTLA-4 SEQ ID NO: 35.

[00270] O polipeptídeo CTLA-4 pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou, pelo menos, 99% com as SEQ ID NOS: 36-55, por exemplo, com a SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 ou SEQ ID NO: 47. O polipeptídeo CTLA-4 pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou, pelo menos, 99% com a SEQ ID NO: 68. O polipeptídeo CTLA-4 pode compreender ou consistir em uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou, pelo menos, 99% com a sequência

de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948.

[00271] O polipeptídeo CTLA-4 pode compreender ou consistir em qualquer SEQ ID NOS: 36-55, SEQ ID NO: 68 ou a sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948, com uma ou mais mutações nos aminoácidos. Por exemplo, pode compreender até doze mutações, até dez mutações de aminoácidos, por exemplo, até cinco mutações, por exemplo, uma, duas ou três mutações de aminoácidos. Exemplos de mutações são aqui descritas.

[00272] Seguidamente à introdução de um ou mais mutações, o polipeptídeo CTLA-4 pode ser testado para propriedades funcionais desejadas, tais como a capacidade de se ligar a CD80 e/ou CD86, capacidade para se ligar a CD80 e/ou CD86 com uma afinidade maior do que CTLA-4 de tipo selvagem e/ou uma potência, afinidade e/ou estabilidade, tal como aqui descrito para polipeptídeos CTLA-4 da invenção, por exemplo, Kd para a ligação de CD80 humano de 50 nM ou menos, como determinado por ressonância de plasma de superfície.

[00273] Um aspeto da invenção consiste em um método que compreende

[00274] proporcionar um polipeptídeo CTLA-4, que compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos de polipeptídeo CTLA-4 como descrito aqui;

[00275] introdução de uma ou mais mutações na sequência de aminoácidos para proporcionar um outro polipeptídeo CTLA-4; e

[00276] testar a estabilidade, afinidade e/ou a potência do outro polipeptídeo CTLA-4.

[00277] A sequência de aminoácidos de polipeptídeo CTLA-4 pode compreender ou consistir em, por exemplo, qualquer uma das SEQ ID

NOS 36-55 ou SEQ ID NO: 68 ou a sequência de aminoácidos de CTLA-4 codificada pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948. Por exemplo, a sequência de aminoácidos pode ser SEQ ID NO: 43, 37, 36, 38, 42 ou 47.

[00278] (i) Entre um e vinte mutações incluídas, opcionalmente, podem ser introduzidas e podem incluir substituições, deleções, inserções ou uma mistura de qualquer uma destas. Por exemplo, uma ou mais substituições, por exemplo, entre uma e vinte substituições podem ser introduzidas.

[00279] (ii) Exemplos de ensaios para testar a estabilidade, afinidade e/ou a potência do outro polipeptídeo CTLA-4 são descritos aqui. O outro polipeptídeo pode ter uma estabilidade, afinidade e/ou potência que não é significativamente mais baixa ou que é maior, do que o polipeptídeo CTLA-4 a partir do qual foi derivado.

[00280] (iii) O método pode compreender a determinação de que outros polipeptídeos CTLA-4 possuem uma potência, afinidade e/ou estabilidade, tal como aqui descrito para polipeptídeos CTLA-4 da invenção, por exemplo, que tem Kd para a ligação de CD80 humano de 50 nM ou menos, como determinado por ressonância de plasma de superfície.

[00281] (iv) Um outro polipeptídeo CTLA-4 identificado como possuindo uma potência, afinidade e/ou estabilidade, tal como aqui descrito para polipeptídeos CTLA-4 da invenção, pode ser em seguida formulado em uma composição farmacêutica ou utilizado em métodos terapêuticos, incluindo os métodos como aqui descritos.

[00282] (v) O método compreende a formulação de mais polipeptídeos CTLA-4 em uma composição que compreende um ou mais excipientes farmacêuticos aceitáveis. Tais composições, a sua utilização e formulação estão descritas em mais detalhe aqui. O polipeptídeo CTLA-4 pode ser fornecido em qualquer formato aqui

descrito, por exemplo, pode ser conjugado a uma região Fc, tal como descrito.

[00283] Uma molécula de ácido nucleico que codifica para um polipeptídeo CTLA-4, por exemplo, uma construção CTLA-4 - Fc, pode ser produzida. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico pode codificar para qualquer sequência de aminoácidos do polipeptídeo CTLA-4 ou da sequência de aminoácidos de CTLA-4 - Fc, de acordo com a invenção. O ácido nucleico pode compreender a sequência de ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948 que codifica para o polipeptídeo CTLA-4-Ig 1299 ou codifica para, pelo menos, a região do polipeptídeo CTLA-4 dos mesmos. A molécula de ácido nucleico pode ser isolada e pode ser incluída em um vetor, por exemplo, um vetor recombinante para a expressão do ácido nucleico numa célula. Uma célula *in vitro* pode compreender o vetor e pode ser utilizada para a expressão do polipeptídeo CTLA-4 ou do produto CTLA-4 Fc. O polipeptídeo pode ser expresso pela linha celular de *E. coli* de depósito NCIMB com número de acesso 41948.

[00284] Um polipeptídeo CTLA-4, tal como aqui descrito pode ser produzido através de um método que inclui a expressão do polipeptídeo a partir de ácido nucleico codificante. Tal pode ser convenientemente conseguido através do crescimento de uma célula hospedeira em cultura, contendo um tal vetor, sob condições adequadas que causam ou permitem a expressão do polipeptídeo CTLA-4. Os polipeptídeos CTLA-4 podem também ser expressos em sistemas *in vitro*, tais como lisado de reticulócitos. Após a produção de um polipeptídeo CTLA-4 por expressão, a sua atividade, por exemplo, a sua capacidade de se ligar a CD86 ou a CD80 pode ser testada de forma rotineira.

[00285] Os sistemas para clonagem e expressão de um polipeptídeo numa variedade de células hospedeiras diferentes são

bem conhecidos, e podem ser empregues para a expressão dos polipeptídeos CTLA-4 aqui descritos, incluindo polipeptídeos CTLA-4 - Fc. As células hospedeiras adequadas incluem bactérias, células eucarióticas, tais como de mamífero e levedura, e sistemas de baculovírus. As linhas celulares de mamífero disponíveis na área para expressão de um polipeptídeo heterólogo incluem células de ovário de hamster chinês, células HeLa, células de rim de hamster bebê, células COS e muitas outras. Um hospedeiro bacteriano comum preferido é *E. coli*. Os vetores adequados podem ser encolhidos ou construídos, contendo sequências reguladoras apropriadas, incluindo sequências promotoras, sequências terminadoras, sequências de poliadenilação, sequências acentuadoras, genes marcadores e outras sequências conforme apropriado. Os vetores podem ser plasmídeos, virais, por exemplo, bacteriófagos, ou fagemídeo, conforme apropriado. Muitas técnicas e protocolos para manipulação de ácido nucleico, por exemplo, na preparação de construtos de ácido nucleico, mutagênese, sequenciamento, introdução de DNA em células e expressão de gene e análise de proteínas são conhecidos.

[00286] Geralmente, o ácido nucleico que codifica um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a presente invenção é fornecido como um isolado, em forma isolada e/ou purificada, ou livre ou substancialmente livre de contaminantes. O ácido nucleico pode ser total ou parcialmente sintético e pode incluir DNA genômico, DNAc ou RNA.

[00287] O ácido nucleico pode ser fornecido como parte de um vetor replicável, e também fornecido pela presente invenção é um vetor incluindo ácidos nucleicos que codificam para um polipeptídeo CTLA-4 da invenção, particularmente qualquer vetor de expressão a partir do qual o polipeptídeo codificado possa ser expresso sob condições apropriadas, e uma célula hospedeira contendo qualquer um desses vetores ou ácido nucleico. Um vetor de expressão, neste

contexto, é uma molécula de ácido nucleico, incluindo o ácido nucleico que codifica para um polipeptídeo de interesse e sequências reguladoras adequadas para a expressão do polipeptídeo, em um sistema de expressão *in vitro*, por exemplo, lisado de reticulócitos, ou *in vivo*, por exemplo, em células eucarióticas tais como células COS ou CHO, ou em células procarióticas, tais como *E. coli*.

[00288] Uma célula hospedeira pode conter ácido nucleico, tal como aqui divulgado. O ácido nucleico da invenção pode ser integrado no genoma (por exemplo, cromossomo) da célula hospedeira. A integração pode ser promovida por inclusão de sequências que promovem a recombinação com o genoma, em concordância com técnicas padrão. O ácido nucleico pode estar num vetor extracromossômico dentro da célula.

[00289] O ácido nucleico pode ser introduzido numa célula hospedeira. A introdução, que pode ser (particularmente para a introdução *in vitro*) geralmente referida, sem limites, por "transformação" ou "transfecção", pode empregar qualquer técnica disponível. Para células eucariontes, as técnicas adequadas podem incluir transfecção de fosfato de cálcio, DEAE-Dextrano, eletroporação, transfecção mediada por lipossomo e transdução com o uso de retrovírus ou outro vírus, por exemplo, varíola ou, para células de inseto, baculovírus. Para células bacterianas, as técnicas adequadas podem incluir transformação de cloreto de cálcio, eletroporação e transfecção com o uso de bacteriófago.

[00290] Os genes marcadores, tais como genes de resistência ou de sensibilidade a antibióticos podem ser utilizados na identificação de clones que contêm o ácido nucleico de interesse, como é bem conhecido na área.

[00291] A introdução pode ser seguida por causar ou permitir a expressão a partir do ácido nucleico, por exemplo, através da cultura

de células hospedeiras (que podem incluir células realmente transformadas embora mais provavelmente as células sejam descendentes das células transformadas) sob condições para expressão do gene, de modo que o polipeptídeo codificado seja produzido. Se o polipeptídeo é expresso acoplado a um peptídeo líder de sinal apropriado, pode ser segregado da célula para o meio de cultura. Seguidamente à produção por expressão, um polipeptídeo pode ser isolado e/ou purificado a partir da célula hospedeira e/ou meio de cultura, conforme o caso e, subsequentemente, utilizado como desejado, por exemplo, na formulação de uma composição que pode incluir um ou mais componentes adicionais, tais como uma composição farmacêutica que inclui excipientes, um ou mais veículos ou transportadores farmaceuticamente aceitáveis (como exemplos, ver abaixo).

[00292] O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a presente invenção pode ser isolado e/ou purificado (por exemplo, utilizando um anticorpo) por exemplo, após a produção, por expressão a partir do ácido nucleico codificante. Assim, um polipeptídeo CTLA-4 pode ser fornecido livre ou substancialmente livre de contaminantes. Um polipeptídeo CTLA-4 pode ser fornecido isento ou substancialmente isento de outros polipeptídeos. O polipeptídeo CTLA-4 isolado e/ou purificado pode ser utilizado na formulação de uma composição, a qual pode incluir pelo menos um componente adicional, por exemplo, uma composição farmacêutica incluindo um excipiente, veículo ou transportador farmaceuticamente aceitável. Uma composição incluindo um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a invenção pode ser usada em tratamento profilático e/ou terapêutico como discutido noutras partes deste documento.

[00293] Por conseguinte, um aspeto da invenção é uma composição compreendendo ou consistindo de um polipeptídeo CTLA-

4 da invenção, opcionalmente, um polipeptídeo CTLA-4 conjugado com Fc de IgG e um ou mais excipientes farmacêuticos. Numerosos exemplos de polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção são descritos aqui e qualquer um pode ser conjugado a uma região Fc.

[00294] Por exemplo, a composição pode compreender ou consistir em:

[00295] um polipeptídeo CTLA-4 compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 43 (variante 1299), SEQ ID NO: 37 (variante 1322), SEQ ID NO: 38 (variante 1321), SEQ ID NO: 36 (variante 1315), SEQ ID NO: 42 (variante 1115) ou SEQ ID NO: 47 (variante 1227), conjugado com uma sequência de aminoácidos IgG Fc SEQ ID NO: 59; e

[00296] um ou mais excipientes farmacêuticos.

[00297] A composição compreendendo ou consistindo no polipeptídeo CTLA-4 Ig 1299 codificado pelo ácido nucleico depositado com o número de acesso NCIMB 41948 e um ou mais excipientes farmacêuticos.

[00298] Por exemplo, o polipeptídeo CTLA-4 pode compreender a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 16.

[00299] Uma composição de acordo com a invenção pode compreender um polipeptídeo CTLA-4 a uma concentração de pelo menos 70 mg/mL, por exemplo, pelo menos 80 mg/mL, pelo menos mg/mL ou, pelo menos, 100 mg/mL. A concentração é calculada como a massa do polipeptídeo, incluindo a glicosilação, e inclui a região Fc quando presente. A concentração do polipeptídeo pode ser determinada por métodos padrão de medição espectrofotométrica utilizando um coeficiente de extinção com base na massa calculada do polipeptídeo, incluindo glicosilação (se presente). Sempre que a glicosilação está presente, ela pode ser considerada como sendo

completa. Métodos adequados encontram-se ilustrados nos Exemplos. Por exemplo, um coeficiente de extinção de 1,09 pode ser utilizado para a determinação da concentração, tal como exemplificado para CTLA-4-Fc 1299.

Formulação e Uso Médico

[00300] Polipeptídeos CTLA-4 da presente invenção podem ser administrados mensalmente ou menos frequente. A baixa frequência de administração é geralmente desejável para reduzir a carga sobre os pacientes e sobre os médicos, mas pode ser associada com o risco de uma menor eficácia terapêutica e/ou a necessidade de aumentar a dose de produto. As melhorias na potência, afinidade e/ou semi-vida de acordo com a presente invenção, reduz os riscos e oferecem a possibilidade de dosagem mais baixa ou menos frequente em comparação com regimes de administração anteriores.

[00301] Para muitos doentes, o tratamento será necessário ao longo de períodos de tempo prolongados, por exemplo, por muitos anos, e, possivelmente, para todo o tempo de vida do paciente. Por conseguinte, prevê-se que várias doses serão administradas. Os intervalos entre dosagens podem ser da ordem de dias, uma semana ou um mês. De preferência, a administração é em intervalos de, pelo menos, ou cerca de 14, 21 ou 28 dias. De preferência, a administração a um doente é através da entrega subcutânea com um intervalo de dosagem de 28 dias ou maior, por exemplo, administração mensal.

[00302] A administração pode ser intravenosa ou por qualquer outra via de administração apropriada. Por exemplo, o polipeptídeo CTLA-4 pode ser administrado por injeção subcutânea, facilitando a auto-administração pelos pacientes em casa e oferecendo a vantagem potencial de reduzir as visitas aos pacientes na clínica, em comparação com regimes de administração por via intravenosa.

[00303] A formulação de CTLA-4 em volumes reduzidos adequados

para administração subcutânea, tipicamente requer uma maior concentração do produto de CTLA-4 em comparação com a formulação para administração intravenosa. As concentrações de pelo menos 70 mg/mL, são tipicamente preferidas para administração por via subcutânea, mais preferencialmente pelo menos 100 mg/mL. A melhoria da estabilidade de composições CTLA-4 de acordo com a presente invenção facilita a formulação a uma concentração elevada, por exemplo, para administração subcutânea.

[00304] As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção, e para utilização de acordo com a presente invenção, podem incluir, em adição ao ingrediente ativo, um excipiente, transportador, tampão, estabilizante ou outros materiais farmaceuticamente aceitáveis, bem conhecidos pelos peritos na técnica. Tais materiais devem ser não tóxicos e não devem interferir com a eficácia do ingrediente ativo. A natureza precisa do transportador ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser qualquer via adequada, mas mais provável de injeção (com ou sem uma agulha), especialmente injeção subcutânea. Outras vias de administração preferidas incluem a administração por inalação ou administração intransal.

[00305] Para injeção intravenosa, subcutânea ou intramuscular, o ingrediente ativo será na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável que é livre de pirogênio e tem pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Aqueles de habilidade relevante na técnica serão bem capazes de preparar soluções adequadas com o uso de, por exemplo, veículos isotônicos, tais como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer ou Injeção de Ringer Lactada. Conservantes, estabilizadores, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos podem ser incluídos, conforme requerido.

[00306] O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a presente invenção

pode ser utilizado num método de diagnóstico ou tratamento do corpo humano ou animal, preferencialmente humano.

[00307] Métodos de tratamento podem compreender a administração de um polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a invenção, por exemplo, administração de uma composição farmacêutica compreendendo o polipeptídeo CTLA-4. O polipeptídeo CTLA-4 ou a composição que compreende um polipeptídeo CTLA-4, tal como aqui descrito pode ser para utilização num método de tratamento de um paciente, por via subcutânea ou intravenosa.

[00308] Um polipeptídeo CTLA-4 pode ser administrado a um indivíduo, de preferência por administração de uma "quantidade profilaticamente eficaz" ou uma "quantidade terapeuticamente eficaz" (conforme o caso, embora a profilaxia possa ser considerada terapia), sendo esta suficiente para apresentar benefício para o indivíduo. A quantidade real administrada e a taxa e tempo de administração, dependerão da natureza e da gravidade de que está a ser tratada. A prescrição do tratamento, por exemplo, decisões sobre a dosagem etc., é da responsabilidade dos médicos de clínica geral e outros médicos.

[00309] Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, ou simultânea ou sequencialmente dependendo da condição a ser tratada.

[00310] Polipeptídeos CTLA-4 são úteis para a atenuação da resposta das células T e, assim, podem ser utilizados para o tratamento de condições em que a atenuação da resposta das células T é benéfica. As indicações clínicas em que um polipeptídeo CTLA-4 pode ser utilizado para fornecer o benefício terapêutico incluem doenças auto-imunes e/ou doenças inflamatórias. Os exemplos de indicações terapêuticas são a artrite reumatoide (AR), artrite reumatoide juvenil, artrite psoriática, psoríase, esclerose múltipla,

asma, doença de Crohn, lúpus nefrite, lúpus eritematoso sistêmico, espondilite anquilosante, rejeição de transplante, diabetes tipo I, síndrome de Sjogren e colite ulcerosa, bem como outras doenças auto-imunes, tais como alopecia. Polipeptídeos CTLA-4 de acordo com a invenção são considerados como sendo particularmente adequados para pacientes com AR moderada a grave.

[00311] Os doentes tratados com polipeptídeos CTLA-4 ou composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser aqueles que têm AR moderada a gravemente ativa, apesar do tratamento anterior ou em curso com doença sintética modificando fármacos anti-reumáticos (DMARDs) ou com outros produtos biológicos para além de CTLA-4, por exemplo, outros para além de Abatacept. O polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a invenção pode ser utilizado para tratar pacientes em monoterapia, em combinação com pacientes DMARDs convencionais com respostas inadequadas a DMARDs convencionais, ou em pacientes com insuficiência biológica.

[00312] A eficácia do tratamento pode ser monitorizada e os dados podem ser obtidos na progressão de lesões nas articulações e/ou função do paciente.

Exemplos

[00313] A seguinte sequência de CTLA4-Ig foi depositada em NCIMB:

[00314] *Escherichia coli* DH5a Variante 1299 = NCIMB 41948

[00315] (i) Data de depósito = 13 de março de 2012

[00316] A estratégia utilizada para otimizar a potência biológica da molécula de fusão CTLA-4 Fc consistiu em duas atividades principais. Uma atividade foi a utilização de apresentação de ribossoma para executar a evolução dirigida do domínio CTLA-4 para selecionar uma melhor afinidade para os ligandos CD80 e CD86, assim como uma melhor estabilidade desse domínio. As saídas das seleções de

exibição de ribossoma, que consistem em várias populações de variantes de CTLA-4, foram sequenciadas e essas sequências únicas de codificação foram expressas com um parceiro de fusão de Fc para testar diretamente em ensaios *in vitro* de estimulação da célula T. A vantagem desta abordagem é a classificação diversas variantes de CTLA-4 (> 1000 foram testados) num formato de fármacos, como, por exemplo, no âmbito de um domínio de Fc, que promove a dimerização, num ensaio biologicamente relevante. Uma característica adicional desta estratégia foi realizar recombinações dessas mutações CTLA-4 que foram associadas com a melhora da função biológica, de modo a obter um maior ganho na potência, através da sinergia.

[00317] Esta abordagem foi capaz de selecionar simultaneamente para uma maior afinidade de variantes CTLA-4 e para a estabilidade da proteína. As seleções de afinidade empregam concentrações decrescentes do ligando-alvo, neste caso, CD80/86, para seletivamente enriquecer a maior afinidade de variantes de CTLA-4. As seleções para uma utilização com uma melhor estabilidade tanto de um agente de desestabilização, tal como DTT, ou esferas de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) para remover, a partir do conjunto de seleção, as variantes que são menos estáveis ou mais propensas a desdobramento. Assim, a pressão de estabilidade e de afinidade poderia ser aplicada em uma única seleção, em vez de seguir abordagens paralelas.

[00318] A segunda atividade era a engenharia racional do domínio Fc para introduzir mutações conhecidas para eliminar funções efetoras mediadas por Fc e para aumentar a semi-vida de circulação da molécula *in vivo*. Diferentes regiões de variantes Fc foram preparadas como fusões com CTLA-4 e testadas em estudos de estabilidade acelerada *in vitro*, para selecionar a região Fc com o perfil ótimo de estabilidade.

[00319] A seguir a estas duas atividades paralelas e subsequente rastreio, os domínios CTLA-4 mais potentes, como medido por inibição em vários ensaios *in vitro* de estimulação de células T, foram combinados com o mais estável domínio Fc alterado, tal como medido através de estudos de estabilidade acelerada *in vitro*. Além disso, testes *in vitro* para a potência biológica e a estabilidade da proteína permitiram a classificação relativa das moléculas no formato final do fármaco.

Exemplo 1 Construção de uma biblioteca de variantes de CTLA-4 e seleção dos ribossomas exibidos para a potência e estabilidade aumentadas.

[00320] A exibição de ribossomas foi realizada num domínio humano de CTLA-4 monomérico, correspondente ao P16410 Swiss-Prot, resíduos 38-161 do domínio extracelular, sem a região Fc anexada. Esta sequência (SEQ ID NO: 35) é também referida como CTLA-4 de tipo selvagem. A construção de exibição de ribossoma de CTLA-4 foi obtida por clonagem da parte necessária de cDNA de CTLA-4 humano em um vetor contendo elementos reguladores nas extremidades 5' e 3' que são necessários para a exibição de ribossoma (Hanes et al, Meth. Enzymol. (2000) 328:404). Esta construção compreende uma sequência do promotor polimerase de RNA T7 seguido de um local de ligação ao ribossoma procariótico (sequência de Shine-Dalgarno) a montante da sequência de codificação de CTLA-4. A cisteína no aminoácido 120 (ou posição 157 de acordo com a numeração Swiss-Prot P16410) na interface de dimerização de CTLA-4 humano foi mutada para uma serina, de modo a evitar a dimerização de moléculas de CTLA-4 em formato de exibição de ribossoma, que pode de outro modo interferir com a seleção de sequências CTLA-4 melhoradas. A jusante da sequência de CTLA-4, uma porção da proteína do gene III do fago filamentoso,

foi incluída para agir como um espaçador, para permitir que as variantes de CTLA4 sejam exibidas para fora do túnel do ribossoma. A construção de exibição de ribossoma de CTLA-4 também continha sequências de laço hairpin 5' e 3' ao nível do mRNA para ajudar a estabilizar as bibliotecas de mRNA contra a degradação da nuclease.

Biblioteca propensa a erros

[00321] A construção de exibição de ribossoma de CTLA-4 humano descrita acima foi utilizada como um modelo, no qual há a geração de uma biblioteca de variantes aleatórios utilizando PCR propenso a erro. PCR propenso a erro foi aplicado ao gene CTLA-4, utilizando o Kit de PCR de mutagênese aleatória diversificada (Clontech) de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram adaptadas para se obter uma média de quatro mutações de aminoácidos por molécula e uma biblioteca de aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ moléculas variantes. Este procedimento de mutagênese aleatória foi ainda incorporado no processo de seleção, em que foi aplicado à saída da terceira rodada de seleção, de modo a introduzir mais diversidade para a população enriquecida de ligantes, antes de prosseguir a seleção.

Biblioteca direcionada ao 'Loop4'

[00322] A construção de exibição de ribossoma de CTLA-4 também foi utilizada como um modelo no qual há a geração de uma biblioteca de variantes com mutagênese dirigida para uma região da molécula de CTLA-4, com o potencial para contribuir para a interação com CD80 e CD86. A estrutura de co-cristal do CTLA-4 humano:complexo CD80 humano (Protein Data Bank (PDB): 1I8L) e CTLA-4 humano:complexo CD86 humano (PDB: 1I85) foram examinados para visualizar a interação de ligação entre as moléculas, em particular, as cadeias laterais dos aminoácidos de CTLA-4, em estreita proximidade com os ligandos. Uma região da proteína CTLA-4 humana (SEQ ID 35) que compreende a posições de aminoácidos 59 a 65 (ou posições 96 a

102 de acordo com a numeração SwissProt de CTLA-4 P16410) foi vista a formar um laço que se estende na direção de CD80 e CD86. Cada um dos resíduos nesta região foi totalmente ao acaso, utilizando mutagênese de saturação (NNS) para criar uma biblioteca de, aproximadamente, $3,4 \times 10^{10}$ moléculas variantes. Esta biblioteca 'Laço 4' foi construída através de técnicas convencionais, utilizando os oligonucleótideos sobrepostos (SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 34).

Seleção para uma afinidade melhorada e estabilidade

[00323] A seleção para melhorar a ligação de variantes CTLA-4 para CD80 e CD86 humano foi realizada utilizando seleções baseadas na afinidade de ribossomas, conforme descrito em Hanes et al (Meth. Enzymol. (2000) 328:404). Resumidamente, bibliotecas de DNA de variantes de CTLA-4 foram transcritas e, em seguida, traduzidas em um sistema de tradução isento de células procariotas, e as reações de tradução foram interrompidas para gerar complexos ternários de seleção de exibição de ribossoma (RNAm-ribossoma-proteína), que foram em seguida incubadas com proteínas de fusão Fc CD80 humano ou CD86 humano (R&D Systems). Complexos de ligação CD80 ou CD86 foram capturados por incubação com proteína G revestida em pérolas magnéticas (Dynal) e os complexos ternários ligados foram recuperados por separação magnética, enquanto que os complexos não ligados foram lavados. RNAm que codifica para as variantes de CTLA-4 ligados foi recuperado por transcrição inversa e PCR. Para dirigir a seleção para variantes CTLA-4 com melhorias de ligação, o processo de seleção foi repetido utilizando concentrações decrescentes de CD80 ou CD86 ao longo de várias rodadas.

[00324] Em conjunto com a seleção de uma melhor afinidade para o CD80 e CD86, conjuntos de variantes de CTLA-4 foram simultaneamente selecionados por exibição de ribossoma para a melhoria da estabilidade. Nas primeiras rodadas da seleção (Rondas 1

e 3) foi usado DTT para aplicar uma pressão de seleção que favoreceu a recuperação dos variantes CTLA-4 mais estáveis (Jermutus et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 2;98(1):75-80). Uma concentração final de 0,5 mM DTT foi incluída na reação de tradução, após a reação foi incubada com uma suspensão de pérolas de Sepharose (GE Healthcare) de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), também na presença de 0,5 mM de DTT. O passo de HIC foi usado para capturar as variantes com um mau enrolamento e removê-los a partir da reação por centrifugação, antes da incubação com CD80 e seleção por afinidade como descrito acima.

Biblioteca de mutagênese Hotspot e recombinação racional de mutações-chave

[00325] Após a despistagem inicial de variantes CTLA-4 a partir de PCR propenso a erros e bibliotecas dirigidas a Laço4, as mutações associadas com a atividade melhorada foram identificadas e utilizadas para conceber novas variantes de CTLA-4. Numa estratégia, foi construída uma biblioteca de mutagênese Hotspot, em que as posições 16, 25, 58, 70, 85 e 93 da SEQ ID NO: 35 (ou posições 53, 62, 95, 107, 122 e 130, de acordo com a numeração SwissProt de CTLA-4 P16410) foram totalmente ao acaso, em uma única biblioteca usando mutagênese de saturação (NNS). A biblioteca foi criada utilizando os oligonucleótideos que se sobrepõem e mutagênicos (SEQ ID NO: 61 a SEQ ID NO: 67 inclusive). Esta biblioteca foi então selecionada para melhorar a afinidade, tal como descrito acima.

[00326] Numa abordagem alternativa, um menor número de mutações, identificadas a partir de bibliotecas de mutagênese Hotspot e Laço4, propensas a erros, que foram associadas com uma atividade melhorada, foram combinadas por mutagênese dirigida a oligonucleótideos para criar recombinantes racionais que foram então diretamente testados para a atividade biológica. As mutações

escolhidas para esta estratégia foram: I16S, S25N, S25P, G27S, M54K, N56S, L58G, T59S, F60T, L61Q, L61P, D62G, D63Y, S64P, I65N, I65V, S70A, Q80R, M85S e K93Q (ou, numeradas de acordo com CTLA-4 SwissProt P16410: I53S, S62N, S62P, G64S, M91K, N93S, L95G, T96S, F97T, L98Q, L98P, D99G, D100Y, S101P, I102N, I102V, S107A, Q117R, M122S e K130Q).

Exemplo 2 Expressão de CTLA-4 do tipo selvagem e variantes como proteínas de fusão Fc

[00327] Os genes da variante de CTLA-4 das seleções de ribossomas de apresentação foram clonados no vetor de pEU7.1. Este vetor permite a expressão do gene CTLA-4 como uma fusão em quadro com a região IgG1 Fc (SEQ ID NO: 56). O resultante dos ribossomas de apresentação foi amplificado por PCR e clonado em pEU7.1, antes da transformação em células DH5-alfa E. coli. Os oligonucleótideos utilizados para a clonagem por PCR também foram concebidos para reverter a serina na posição 120 (resíduo 157 de acordo com a numeração da Swiss-Prot P16410) para o aminoácido cisteína de tipo selvagem. Após a sequenciação de transformantes individuais, um total de mais de 1000 de variantes com sequências de aminoácidos únicas de CTLA-4 foram selecionados para a expressão da proteína. Em lotes de 88 variantes, o plasmídeo de DNA codificante foi purificado seguindo os protocolos do fornecedor (Qiagen) e quantificado por espectrofotometria a 260 nm, de modo que a concentração de DNA possa ser usada para calcular a quantidade adequada de DNA para transfeção.

Expressão, purificação e quantificação de proteínas CTLA-4 a partir das placas de 24 poços

[00328] 3 mL de células de ovário de hamster chinês (CHO) (ECACC), foram cultivadas a 1 milhão de células por mL em poços separados de uma placa de 24 poços (Whatman 734-2558) em meio

CD-CHO (Invitrogen 10743-029) contendo 25 µM de L-metionina sulfoximina (Sigma M5379). Placas de 24 poços contendo células foram seladas com uma tampa respirável (Applikon biotechnology, Z365001224) e colocadas num grampo para palcas de poços profundos (Applikon biotechnology, Z365001700). As células foram agitadas a 250 rpm, 80% de umidade, 5% de CO₂ e 37 °C. Para a transfecção, 50 µL de NaCl 150 mM, contendo 3 mg do plasmídeo de DNA foi misturado com 50 µL contendo 21 µg de PEI linear de 25 kDa (Polysciences, 23966). O complexo DNA-PEI formado foi adicionado às células, não permitindo mais do que 15 minutos entre o início da formação do complexo e a adição às células. 16 a 24 horas após a transfecção, as células foram alimentadas através da adição de 300 µL/poço de CD-CHO Efficient Feed B (Invitrogen A10240). As placas foram agitadas a 250 rpm, 80% de umidade, 5% de CO₂ e 37 °C durante adicionais 5 a 6 dias para permitir a expressão da proteína para o meio de crescimento. Após expressão, o meio de cultura gasto contendo proteína foi clarificado por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes clarificados (1,2 mL) foram redistribuídos para Palcas de Filtro de 96 poços (3M Empore, 12146036), utilizando o robô de manuseio de líquidos Freedom Evo® (Tecan). Os etritos de células residuais foram removidos por filtração usando uma bomba de vácuo e um vácuo QIAvac 6S Manifold (Qiagen). 1,8 mL de sobrenadante clarificado e filtrado foi processado para purificação realizada num robô de manuseio de líquidos (Perkin Elmer) Minitrack (RTM) utilizando colunas de afinidade de Proteína A PhyTip (RTM) (Phynexus, PTP-92-20-01), 20µL de volume de leito de resina). As colunas PhyTip (RTM) foram condicionadas por 500 µL NaP 20 mM pH 7,0. As colunas PhyTip (RTM) foram, em seguida, carregadas pela passagem dos sobrenadantes brutos em lotes de 6x300 µL, lavou-se com 200 µL de D-PBS, 200 µL de NaP 20 mM, pH

7,0, eluiu-se com 120 µL de 100 mM HEPES 140 mM NaCl pH 3 e neutralizou-se com 20 µL de HEPES 1M a pH 8,0.

[00329] As proteínas purificadas foram transferidas para uma placa de polipropileno preta de 96 poços (Greiner, 655209), seguida pela adição de 145 µL de PBS, 0,02% Tween20, 1 mg/mL de BSA, tampão de azida de sódio a 0,05% (tampão de octetos). Uma curva padrão foi gerada utilizando CTLA-4 do tipo selvagem da proteína de fusão Fc previamente purificado, em tampão idêntico. Um conjunto de concentrações padrão foram preparadas na placa de polipropileno preta em um volume de 150 µL com uma concentração inicial de 500 µg/mL e 3 diluições. Usando biossensores revestidos com Proteína A Octeto RED (ForteBio Inc., 18-0004) a quantificação foi realizada usando 120 segundos de tempo de leitura com uma taxa de fluxo de 200 rpm. Uma coluna de 8 biossensores foi utilizada para cada placa de 96 poços de amostras. Os biossensores foram regenerados pela adição de 200 µL de 10 mM de glicina pH1.7 (Sigma, L-7403) na placa de 96 poços. Os biossensores foram neutralizados antes de processar as próximas amostras, adicionando 200 µL de tampão Octeto. 3 ciclos de regeneração/neutralização foram realizados com um tempo de 30s e um caudal de 200rpm. As concentrações das amostras desconhecidas foram determinadas por comparação das taxas de ligação entre a curva padrão e desconhecida, utilizando o pacote de software de análise de dados de Octet RED.

Expressão, purificação e quantificação de proteínas CTLA-4 em maior escala

[00330] Para preparação em maior escala de proteínas CTLA-4 como fusões de Fc, os mesmos passos gerais, como utilizados para o método de placa de 24 poços, foram aplicados. Os plasmídeos contendo o gene da variante de CTLA-4, tal como uma fusão em quadro para Fc de IgG1, foram preparados a partir de células de E.

coli. Para a preparação de proteínas numa escala a >100 mg, toda a construção que contém o gene CTLA-4 diretamente na estrutura com o gene de IgG1 Fc foi preparado por síntese de genes. Em todos os casos, o plasmídeo de DNA que codifica a proteína de interesse foi preparado e transfetado em células CHO para expressão. Em lugar das placas de 24 poços, um maior volume de células foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos ou em sacos onda, antes de purificação a partir dos sobrenadantes de cultura. As colheitas foram reunidas e filtradas antes da purificação por cromatografia em proteína A. Os sobrenadantes da cultura foram carregados numa coluna de tamanho adequado de cerâmica de Proteína A (BioSeptra) e lavou-se com 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM de NaCl. A IgG ligada foi eluída da coluna usando 0,1 M de citrato de sódio (pH 3,0) e foi neutralizada pela adição de Tris-HCl (pH 9,0). O material eluído foi trocado em tampão para PBS utilizando colunas Nap10 (GE, 17-0854-02) e a concentração de IgG foi determinada espectrofotometricamente usando um coeficiente de extinção com base na sequência de aminoácidos da proteína. As proteínas purificadas foram analisadas para a agregação ou a degradação utilizando SEC-HPLC e SDS-PAGE.

Exemplo 3 Atividade biológica de variantes de CTLA-4 num ensaio duplo de célula Raji (células B) e Jurkat (células T)

[00331] A estratégia de rastreio descrita aqui inclui a medição da atividade biológica de mais de 1000 variantes de CTLA-4, expressos com um parceiro de fusão Fc, em um ensaio de estimulação de células T *in vitro*. As variantes CTLA-4 de todas as diferentes estratégias de mutagênese (incluindo PCR propenso a erros, mutagênese direcionada, recombinação hotspot e recombinação racional) foram testadas para atividade biológica e classificadas de acordo com a sua atividade biológica em relação ao tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID

NO: 35) também expresso no formato fusão Fc.

[00332] Para determinar a atividade biológica de variantes de CTLA-4, as amostras foram adicionadas a um ensaio duplo de célula consistindo de células Raji (células B) e células Jurkat (células T). A interação de CD28, expressa por células Jurkat, com os ligandos CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), expressos em células Raji, combinada com um sinal de co-ativação para o receptor da célula T (tal como o PHA (fito-hemaglutinina)) resulta na libertação de interleucina-2 (IL-2) de células Jurkat. CTLA-4 solúvel pode ligar-se a ligandos de CD80 e CD86, bloqueando a sua interação com CD28 e atenuar esta resposta. Assim, a potência de clones Ig CTLA-4 Ig é determinada por inibição da libertação de IL-2 a partir de células T, como medido por um ensaio de IL-2 HTRF (CisBio 64IL2PEC).

[00333] Placas de baixa ligação de proteínas de 384 poços (Greiner # 781280) foram usadas para executar onze 1 em 3 diluições em série de amostras de ensaio, que foram feitas em meio de crescimento completo (RPMI 1640 Glutamax, Invitrogen # 61870, 10% de FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina, Invitrogen # 15140). Todas as diluições das amostras foram feitas em duplicado a partir de 5-30 µg/mL de concentração da amostra de topo nas células.

[00334] As células em suspensão Raji e Jurkat foram transferidas de frascos de cultura para frascos de centrifugação e centrifugou-se a 240g durante 5 minutos. Ambas as linhas celulares foram ressuspensas a uma concentração de 750.000 células/mL em meio de crescimento e plaqueadas em cada a 0,02 mL/poço ($I = 15.000$ células/linha celular/poço) para uma placa de 384 poços Maxisorp (Nunc 464718). 0,02 mL foi transferido a partir de placas de diluição da amostra para as placas da célula e 0,02 mL e 40 µg/mL de PHA (Sigma # L-1668) (ou 0,02 mL de meio para poços de controle negativo) foi adicionado a todos os outros poços para dar uma

concentração final de 10 µg/mL e incubou-se a 37 °C com 5% de CO₂.

[00335] Após 20 a 24 horas, os sobrenadantes celulares foram colhidos e a secreção de IL-2 foi medida usando um kit comercial HTRF IL-2 (CisBio 64IL2PEC). Resumidamente; um 'mix master' de anti-hIL-2 criptato (doador de fluoróforo) e anti-Hil-2 d2 (fluoróforo receptor) foi realizado por diluição 1/200 em tampão conjugado recém-constituído (0,2% BSA/0,8M KF/PBS). Uma curva padrão de oito pontos foi gerada usando IL-2 (NIBSC # 96/504) diluída 1 em 2 em meio com uma concentração superior de 2 ng/mL. Volumes iguais da mistura principal de reagente e as amostras foram misturadas em uma placa de ensaio de baixo volume de 384 poços (Costar 3676) e incubadas 3-168 horas à temperatura ambiente. As placas foram lidas num Envision (Perkin Elmer) utilizando um comprimento de onda de excitação de 320 nm e de emissão de comprimentos de onda de 620 nm e 665 nm.

[00336] Os valores de ligação específica e da % delta F foram calculados para cada poço da seguinte forma:

$$\% \text{ Delta F} = \frac{(\text{Razão Amostra A665/A620} - \text{Razão NSB A665/A620})}{(\text{Razão NSB A665/A620})} \times 100$$

$$\% \text{ ligação específica} = \frac{(\% \text{ Amostra Delta F} - \% \text{ NSB Delta F})}{(\% \text{ Total Delta F} - \% \text{ NSB Delta F})} \times 100$$

[00337] Os poços apenas com meio (Min /ligação não específica (NSB)) foram usados como referência e poços com apenas PHA (Max/Total) foram utilizados para determinar o sinal máximo para os ensaios. Os resultados foram analisados usando o software GraphPad Prism (v5.01) e as concentrações de IC50 foram determinadas utilizando um modelo de ajuste da curva de regressão não linear (Log [inibidor] vs resposta com inclinação variável), utilizando os mínimos quadrados do método de ajuste.

[00338] A seguinte tabela resume o número de moléculas de variantes de CTLA-4 classificadas como tendo uma melhoria

significativa na potência biológica em relação ao tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) também expresso no formato fusão Fc:

Estratégia de mutagênese	Número de variantes de CTLA-4 com atividade biológica melhorada significativa versus tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) no formato fusão Fc
Biblioteca de PCR Propenso a erros	50
Biblioteca Laço4 alvo	1
Biblioteca Hotspot	21
Recombinante Racional	35
TOTAL	107

[00339] A seguir à repetição do teste destes 107 variantes de CTLA-4, medições precisas de IC₅₀ foram determinadas e o melhoramento no enrolamento em relação ao tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) no formato fusão Fc foi calculado. A tabela abaixo resume estes dados para alguns das mais potentes variantes de CTLA-4 de cada uma das estratégias de mutagênese.

Nome da Variante CTLA-4	SEQ ID NO	Estratégia de Otimização	Ensaio duplo de célula Raji-Jurkat IC ₅₀ (nM)	Melhoramento do enrolamento em relação ao tipo selvagem (SEQ ID NO: 35)
Tipo Selvagem	35	NA	29,80	1
Variante 1315	36	Recombinant e Racional	0,24	123
Variante 1322	37	Recombinant e Racional	0,33	91

Nome da Variante CTLA-4	SEQ ID NO	Estratégia de Otimização	Ensaio duplo de célula Raji-Jurkat IC ₅₀ (nM)	Melhoramento do enrolamento em relação ao tipo selvagem (SEQ ID NO: 35)
Variante 1321	38	Recombinante Racional	0,44	68
Variante 0943	39	Recombinante Racional	0,54	56
Variante 0898	40	Recombinante Racional	0,60	50
Variante 1319	41	Recombinante Racional	0,78	38
Variante 1115	42	Biblioteca Hotspot	0,44	67
Variante 1299	43	Biblioteca Hotspot	0,53	56
Variante 1249	44	Biblioteca Hotspot	0,69	43
Variante 1303	45	Biblioteca Hotspot	0,93	32
Variante 1114	46	Biblioteca Hotspot	1,40	21
Variante 1227	47	Biblioteca Hotspot	1,60	19
Variante 0722	48	Biblioteca Propensa a erros	1,07	28

Nome da Variante CTLA-4	SEQ ID NO	Estratégia de Otimização	Ensaio duplo de célula Raji-Jurkat IC ₅₀ (nM)	Melhoramento do enrolamento em relação ao tipo selvagem (SEQ ID NO: 35)
Variante 0645	49	Biblioteca Propensa a erros	1,24	24
Variante 0636	50	Biblioteca Propensa a erros	1,26	24
Variante 0745	51	Biblioteca Propensa a erros	1,36	22
Variante 0673	52	Biblioteca Propensa a erros	1,38	22
Variante 0788	53	Biblioteca Propensa a erros	1,60	19
Variante 0701	54	Biblioteca Propensa a erros	1,61	19
Variante 0439	55	Biblioteca Laço4 alvo	1,20	25

[00340] As sequências destas variantes de CTLA-4 são mostradas na Figura 1A.

[00341] Os perfis de IC₅₀ de 6 das mais potentes variantes de CTLA-4 e do tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) em formato de fusão Fc no ensaio duplo de células de Raji-Jurkat são mostrados

na Figura 3A.

Exemplo 4 Atividade biológica de variantes de CTLA-4 num ensaio duplo de células Raji (células B) e células T CD4+ humanas

[00342] O sangue humano foi coletado em tubo CPT Vacutainer (BD Biosciences) e foi adicionado 400 µL de reagente de purificação CD4+ RosetteSep (Stem Cell Technologies). Após a 20 minutos de incubação, os tubos foram centrifugados a 1700g durante 25 minutos. As células foram recolhidas e transferidas para um tubo de 50 mL e centrifugadas a 350g durante 10 minutos. As células vermelhas do sangue foram lisadas por ressuspensão em 20 mL de reagente Vitalizar e incubadas durante 30 minutos a 1 hora. As células foram então centrifugadas a 350 g durante 10 minutos e lavou-se uma vez com meio de células T (Xvivo-15 media (Lonza), suplementado com 1% Anti/anti (Invitrogen)). Um milhão de células por mL de suspensão de células Raji e células T CD4+ humanas primárias foi preparado em meio completo de células T e mantidas separadas até que esteja pronto para adicionar à placa de ensaio de 96 poços. Numa placa de 96 poços separada (de baixa ligação de proteína), diluições de moléculas de variantes de CTLA-4 foram feitas em meio completo de células T, começando com uma concentração inicial de 100 µg/mL e fazendo doze 1:5 diluições em série. 100 µL de cada uma das quatro concentrações de variantes de CTLA foi dispensado para a cultura de tecidos em placa de ensaio de 96 poços. A suspensão de células de Raji e de células T CD4+ humanas foram misturadas numa proporção de 1:1 e o anticorpo anti-CD3 (clone UCHT1 (BD Bioscience)) foi adicionado a uma concentração final de 10 µg/mL. 100 µL da suspensão de células foi distribuída em cada poço contendo as variantes de CTLA-4 e incubado durante 18 a 24 horas. As placas foram então colhidas por centrifugação a 350g durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços. A

secreção de IL-2 foi medida usando um kit IL-2 humana DuoSet de acordo com o protocolo do fabricante (R&D Systems).

[00343] Uma comparação da potência com o tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) em formato de fusão Fc no ensaio de células T CD4+ primárias humanas para 6 das mais potentes variantes de CTLA-4 é mostrada na Figura 3B.

Exemplo 5 Atividade biológica de variantes CTLA-4 de uma reação linfocitária mista, utilizando células mononucleares do sangue periférico de macaco cinomolgo

[00344] O sangue do macaco cinomolgo de dois animais em separado foi recolhido em tubos Vacutainer CPT (BD Biosciences) e centrifugado a 1700g durante 25 minutos. As células foram recolhidas e transferidas para um tubo de 50 mL e centrifugadas a 350 g durante 10 minutos. As células vermelhas do sangue foram lisadas por ressuspensão em 20 mL de reagente Vitalizar e incubadas durante 30 minutos a 1 hora. As células foram então centrifugadas a 350 g durante 10 minutos e lavou-se uma vez com meio de células T (Xvivo-15 media (Lonza), suplementado com 1% Anti/anti (Invitrogen)). Numa placa de 96 poços separada (de baixa ligação de proteína), diluições de moléculas de variantes de CTLA-4 foram feitas em meio completo de células T, começando com uma concentração inicial de 100 µg/mL e fazendo doze 1:5 diluições em série. 100 µL de diluições de CTLA-4 Ig foi dispensado para a cultura de tecidos em placa de ensaio de 96 poços. A suspensão de células PBMC a partir de cada animal foi misturada numa proporção de 1:1 e 100 µL da suspensão de células foi distribuída em todos os poços que contêm as diluições de CTLA-4 Ig e incubou-se durante 24 horas. As placas foram então colhidas por centrifugação a 350g durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços. A secreção de IL-2 foi medida usando um kit ELISA IL-2 de cinomolgo, de acordo com o

protocolo do fabricante (MABTech).

[00345] Uma comparação da potência com o tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) em formato de fusão Fc no ensaio de reação de linfócitos mistos de macaco cinomolgo para duas das mais potentes variantes de CTLA-4 é mostrada na Figura 3C.

Exemplo 6 Especificidade da ligação da variante a CD80 e CD86

[00346] As variantes CTLA-4 foram marcadas com peroxidase de rábano usando o kit de marcação de HRP ativado (Pierce). A proteína de fusão Fc de domínios extracelulares de membros da família B7 (R&D Systems) foi revestida durante a noite a uma concentração de 5 µg/mL em PBS na placa Maxisorp (Nunc). As placas foram bloqueadas com BSA a 1% e as variantes CTLA-4 marcadas com HRP foram adicionados em várias concentrações e a quantidade de proteína ligada foi determinada utilizando um substrato colorimétrico (substrato BD OptEIA, BD Biosciences).

[00347] A especificidade de duas das mais potentes variantes de CTLA-4 para CD80 e CD86, em comparação com outros ligandos de proteína relacionados, é apresentada na Figura 4.

Exemplo 7 Análise das funções efetoras mediadas por Fc

[00348] Ensaio de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC)

[00349] O sangue humano foi recolhido em tubos Vacutainer CPT (BD Biosciences) e centrifugado a 1700g durante 25 minutos. As células foram recolhidas e transferidas para um tubo de 50 mL e centrifugadas a 350g durante 10 minutos. As células vermelhas do sangue foram lisadas por ressuspensão em 20 mL de reagente Vitalizar e incubadas durante 30 minutos a 1 hora. As células foram então centrifugadas a 350 g durante 10 minutos e lavou-se uma vez com meio de células T (Xvivo-15 media (Lonza), suplementado com 1% Anti/anti (Invitrogen)). 500.000 PBMC foram plaqueadas em 200

μL Xvivo-15 media na presença de vários anticorpos e proteínas de fusão Fc. Após 24 horas de incubação, a viabilidade dos linfócitos B foi determinada por citometria de fluxo por coloração com anticorpos anti-CD19 (BD Biosciences) e 7-AAD (Molecular Probes). O número de células B viáveis foi calculado para cada amostra através da multiplicação de 500.000 por a percentagem de células viáveis por as propriedades de difusão frente/lateral que eram também CD19+ e 7-AAD⁻.

Ensaio de citotoxicidade dependente de complemento (CDC)

[00350] O soro humano foi recolhido em tubos separadores de soro e adicionado ao meio Xvivo-15 a uma concentração final de 10% p/v. 100.000 células B de Raji foram incubadas durante 18 horas em meio contendo diferentes anticorpos e proteínas de fusão Fc. A viabilidade celular Raji foi determinada usando citometria de fluxo por coloração com 7-AAD (Molecular Probes). O número de células viáveis foi calculado para cada amostra através da multiplicação de 100.000 por a percentagem de células viáveis por as propriedades de difusão frente/lateral que eram também 7-AAD⁻. O meio contendo soro humano, que foram previamente inativados pelo calor durante 30 minutos a 56 °C foi utilizado como um controle para confirmar a citotoxicidade celular mediada pelo complemento. Uma demonstração da função efetora nula (ADCC e CDC) para duas das mais potentes variantes de CTLA-4 com modificação TM é mostrada na Figura 5.

Exemplo 8 Análise cinética da ligação de variantes de CTLA-4 a CD80 e CD86 humanos, de macaco cinomolgo e de ratinho

Clonagem e expressão de CD80 e CD86

[00351] As moléculas de cDNA que codificam para os domínios extracelulares (ECDs) de CD80 e CD86 humanos e de rato foram sintetizados por extensão do iniciador de PCR de clonagem e clonado em pDONR221 (Invitrogen Cat. No.12536-017). As sequências de

bancos de dados foram utilizadas para CD80 e CD86 humanos e de rato (ver tabela 1). As sequências de macaco cinomolgo não estavam disponíveis, pelo que com base na elevada homologia entre macaco cinomolgo e macaco Rhesus, as sequências de CD80 (número de acesso ENSMMUG00000016367) e de CD86 (número de acesso ENSMMUG00000000912) de macaco Rhesus, foram utilizadas para desenhar iniciadores capazes de amplificar a sequência do gene codificadora em macacos cinomolgos.

[00352] Os fragmentos de cDNA que codificam para os domínios extracelulares foram então transferidos para o vetor de expressão de mamífero pDEST12.2 (Invitrogen), usando a enzima clonase II de LR Gateway, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen Cat. No.12538-120). O vetor pDEST12.2 foi modificado para incluir uma etiqueta FLAG 10xhis (DYKDDDDKAAHHHHHHHH) em quadro com o gene de interesse inserido, e também pela inserção da origem de replicação oriP do vetor pCEP4 (Invitrogen cat. Nº V044-50), que permite a replicação epissómica do plasmídeo após transfecção de linhas celulares que expressam o produto do gene EBNA-1 (tais como células HEK293-EBNA). A proteína expressa no sobrenadante HEK293-EBNA foi purificado utilizando cromatografia de afinidade de Ni-NTA (coluna HisTrap HP (GE Healthcare cat. No. 17-5248-02)) seguida por cromatografia de exclusão de tamanho (Superdex 200 coluna (GE Healthcare cat. No.17-1069-01)).

Domínios extracelulares CD80

Espécies	Aminoácidos em ECD	Número de Acesso (Swiss-Prot)	SEQ ID NO
Humano	1-242	P33681	1
Rato	1-245	Q00609	2
Cinomolgo	1-242	NA	3

Domínios extracelulares CD86

Espécies	Aminoácidos em ECD	Número de Acesso (Swiss-Prot)	SEQ ID
Humano	7-246	P42081	4
Rato	1-245	P42082	5
Cinomolgo	1-242	NA	6

Análise por ressonância de plasma de superfície (SPR) da afinidade de ligação

[00353] A análise SPR de CTLA-4:interações CD80 e CD86 foi realizada numa máquina Biacore 2000 SPR. Cerca de 200 RU de variantes CTLA4 foram covalentemente acoplados através de grupos primários de amina a um chip CM5 Biacore (GE Healthcare cat. N° BR-1000-1014), utilizando um kit de acoplamento amina (GE Healthcare cat. N° BR-1000-1050). Titulações de CD80 e CD86 em tampão HBS-EP (GE Healthcare cat. N° BR-1001-1088) foram realizadas sobre variantes de CTLA-4 imobilizadas. Todos os traços foram subtraídos duplamente de referência. A análise foi realizada usando o software de avaliação da Biacore, utilizando uma mistura 1:1 de modelo de Langmuir para encaixar as constantes de associação e dissociação. Onde as variantes tiveram uma análise cinética de equilíbrio muito rápida.

[00354] A afinidade monovalente (K_d em nM) de variantes de CTLA-4 selecionadas e do tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35), em formato de fusão Fc para ligantes humanos, de macaco cinomólogo e de rato é mostrada abaixo.

	CD80 Humano	CD86 Humano	Cino. CD80	Cino. CD86	CD80 Rato	CD86 Rato
CTLA-4 de Tipo Selvagem	1540	6420	1550	6530	2950	5550
Variante 1322	8	526	6	330	NA	NA

	CD80 Humano	CD86 Humano	Cino. CD80	Cino. CD86	CD80 Rato	CD86 Rato
Variante 1321	23	1085	19	960	NA	NA
Variante 1299	12	1388	10	1020	NA	NA
Variante 1315	20	1129	17	750	NA	NA
Variante 1227	11	1154	9	1020	NA	NA
Variante 1115	20	1542	18	1070	NA	NA
Variante 1114	42	1340	39	1280	2170	4860

[00355] As melhorias na afinidade (melhoria no enrolamento em relação a CTLA-4 de tipo selvagem em formato de fusão Fc) de variantes CTLA-4 selecionadas para ligantes humanos, de macacos cinomolgos e de rato são mostradas abaixo.

	CD80 Humano	CD86 Humano	Cino. CD80	Cino. CD86	CD80 Rato	CD86 Rato
CTLA-4 de Tipo Selvagem	1	1	1	1	1	1
Variante 1322	193	12	258	20	NA	NA
Variante 1321	67	6	82	7	NA	NA
Variante 1299	128	5	155	6	NA	NA
Variante 1315	77	6	91	9	NA	NA
Variante 1227	140	6	172	6	NA	NA
Variante 1115	77	4	86	6	NA	NA
Variante 1114	37	5	40	5	1	1

[00356] Notou-se que estas variantes, que foram as variantes mais potentes testadas nos ensaios de atividade biológica, demonstraram maiores ganhos de afinidade para o ligando de CD80 humano do que o ligando de CD86 humano (conforme resumido na Figura 6). Um padrão semelhante de um maior ganho de afinidade para CD80 em relação a CD86 foi observado usando os ligantes cinomolgos.

Exemplo 9 Estudos de estabilidade acelerada do tipo selvagem de CTLA-4 com mutações Fc

Expressão, purificação e quantificação de proteínas CTLA-4

[00357] O DNA que codifica para o domínio extracelular de CTLA4 nativo fundido com variantes de Fc 1 a 4, foi克隆ado em pEE 12.4 (Lonza) e expresso em células CHO. Resumidamente, 1×10^6 células CHOK1SV (Lonza) foram transfetadas com nucleofection (Lonza) usando o programa U-024 e Solução V com 5 mcg de DNA de plasmídeo linearizado. Após transfecção as células foram cultivadas em CD-CHO (Invitrogen), 1 x suplemento GS e 50 μ M de MSX. As células começaram a crescer aproximadamente 2 semanas após a transfecção, altura em que foram expandidas em frascos de agitação para produção de proteínas. Para a purificação, uma série de passos foram utilizados começando com um passo de captura MabSelect, seguido de um passo de polimento de permuta aniônica SuperQ, seguido por SEC para os agregados retirados. As proteínas foram armazenadas em solução salina de fosfato tamponada (PBS) pH 7,2.

Estudos de estabilidade

[00358] Os estudos de estabilidade foram realizados em moléculas CTLA-4 fundidas com diferentes variantes de Fc para comparar a sua estabilidade e para determinar a configuração Fc mais estável. As moléculas que foram testadas incluem: CTLA-4 Fc variante-1 (SEQ ID NO: 7); CTLA-4 Fc variante-2 (SEQ ID NO: 8); CTLA-4 Fc variante-3 (SEQ ID NO: 9); e CTLA4 Fc variante-4 (SEQ ID NO: 10). As diferenças de aminoácidos na região Fc são destacadas na Figura 1B para a variante Fc-1 (SEQ ID NO: 57), Fc variante-2 (SEQ ID NO: 58), Fc variante-3 (SEQ ID NO: 59) e Fc variante-4 (SEQ ID NO: 60).

[00359] CTLA-4 Fc variante-1 (SEQ ID NO: 7) é a molécula Abatacept, compreendendo o tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) fundida com uma região Fc de IgG1 com uma dobradiça modificada (SEQ ID NO: 57).

[00360] CTLA-4 Fc variante-2 (SEQ ID NO: 8) é Abatacept

modificado para incorporar uma mutação YTE na região Fc e compreende o tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) fundida com Fc de IgG1 com uma dobradiça modificada e uma mutação YTE (SEQ ID NO: 58).

[00361] CTLA-4 Fc variante-3 (SEQ ID NO: 9) compreende o tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) fundida com Fc de IgG1 em que as mutações observadas C> S em Abatacept são revertidas, compreendendo uma dobradiça de tipo selvagem, e que inclui ainda uma mutação tripla (TM) e mutação YTE (SEQ ID NO: 59).

[00362] CTLA-4 Fc variante-4 (SEQ ID NO: 10) compreende o tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) fundida com Fc de IgG4 que compreende uma mutação YTE e uma região de dobradiça que compreende a mutação de prolina na posição 111 (SEQ ID NO: 60).

[00363] A posição 111 na numeração Swiss Prot corresponde ao resíduo 14 da sequência IgG1 correspondente SEQ ID NO: 56 como mostrado na Figura 1, ou o resíduo 228, no comprimento total da região constante de IgG4. A introdução de uma serina para mutação de prolina nesta posição, é conhecida por estabilizar a interação de dissulfureto inter-cadeias e, portanto, minimizar a formação de moléculas IgG4 (Aalberse and Schuurman, *Immunology* 105(1):9-19 2002; Van der Neut Kolfschoten et al, *Science* 307(5844):1554-7 2007; Angal et al, *Mol Immunol* 30(1):105-8 1993; Schuurman et al *Mol Immunol* 38(1):1-8 2001), assim, minimiza os desafios associados com o desenvolvimento do fármaco candidato. Além disso, como este resíduo prolina encontra-se na posição correspondente da IgG1, não são antecipados quaisquer problemas de imunogenicidade.

[00364] As moléculas foram recebidas sob a forma líquida a ~10 mg/mL em tampão PBS. As quatro moléculas foram concentradas utilizando filtros centrífugos Amicon ultra, 30.000 MW de corte. As moléculas foram centrifugadas a 4200 g até obter o volume alvo (30 -

60 minutos). As concentrações foram medidas espectrofotometricamente usando um coeficiente de extinção de anticorpo padrão de 1,4. As concentrações finais foram calculadas para ser entre 71-85 mg/mL. Embora no presente exemplo tenha sido usado um coeficiente de extinção de anticorpo de 1,4, o coeficiente de extinção do polipeptídeo real foi subsequentemente determinado para ser mais perto de 1,1. Estas concentrações calculadas, na verdade, representam uma gama de concentração de 91-108 mg/mL. Uma maior concentração pode ser alcançada se desejado por ultrafiltração contínua, sujeito a restrições de volume.

[00365] As amostras de cada variante de Fc foram incubadas a 5 °C e 25 °C durante 1 mês. A cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão de tamanho (SE-HPLC) foi o ensaio de estabilidade usado para determinar e comparar as taxas de degradação para as quatro moléculas. SE-HPLC foi executada de acordo com SOP DV-9525 com uma taxa de fluxo de 1 mL/min. Qualquer pico que elui antes do pico do monômero (com um tempo de eluição menos do que a do monômero) no cromatograma de HPLC é designado como um pico do agregado. Qualquer pico que elui após o pico do monômero (com um tempo de eluição superior à do monômero) é designado como um pico do fragmento. A percentagem total de fragmento e agregado é determinada pela área do pico(s) do agregado e do pico(s) do fragmento como uma fração da área total de todos os picos de proteína no cromatograma. Antes da incubação, SE-HPLC foi executada em todas as amostras para o tempo 0. Posteriormente, os dados de SE-HPLC foram recolhidos a cada semana durante o estudo de estabilidade a 25 °C e a cada 2 semanas para o estudo de estabilidade a 5 °C. A duração total para ambos os estudos foi de 1 mês. Abaixo são mostradas as taxas de agregação, fragmentação e de degradação, calculadas usando um ajuste linear aos dados de um

mês.

Taxas após 1 mês a 5 °C

Molécula	% Agregado/Mês	% Fragmento/Mês	% Perda de Pureza/Mês
Fc variante-1 (SEQ ID 57)	2,6	0,4	3,0
Fc variante-2 (SEQ ID 58)	3,2	0	3,2
Fc variante-3 (SEQ ID 59)	1,0	0	1,0
Fc variante-4 (SEQ ID 60)	0,8	0,9	1,7

Taxas após 1 mês a 25 °C

Molécula	% Agregado/Mês	% Fragmento/Mês	% Perda de Pureza/Mês
Fc variante-1 (SEQ ID 57)	12,8	0,7	13,4
Fc variante-2 (SEQ ID 58)	14,3	0,9	15,2
Fc variante-3 (SEQ ID 59)	7,8	0	7,8
Fc variante-4 (SEQ ID 60)	9,2	3,6	12,8

[00366] Com base nestes dados, a Fc variante-3 (SEQ ID NO: 59) foi escolhida como o parceiro ideal de fusão com base nas menores taxas de perda de pureza, tanto a 5 °C e 25 °C.

Exemplo 10 - Estudos de estabilidade acelerada de variantes de CTLA-4 fundidas com Fc Variante-3

[00367] Os estudos de estabilidade foram realizados em 6 das mais potentes moléculas de CTLA-4 variantes fundidos com Fc variante-3

(SEQ ID NO: 59) para determinar a variante de CTLA-4 mais estável. As moléculas que foram testadas neste formato foram: variante 1115 (SEQ ID NO: 15), variante 1227 (SEQ ID NO: 16), variante 1299 (SEQ ID NO: 13), variante 1315 (SEQ ID NO: 14), variante 1321 (SEQ ID NO: 12), variante 1322 (SEQ ID NO: 11).

[00368] As moléculas foram recebidas sob a forma líquida a ~10mg/mL em tampão PBS. As 6 moléculas foram concentradas utilizando filtros centrífugos Amicon ultra, 30.000 MW de corte. As moléculas foram centrifugadas a 4200g até obter o volume alvo (30 - 60 minutos). Os coeficientes de extinção foram calculados usando as sequências de aminoácidos. Os coeficientes de extinção calculados foram de 1,10 para 1315 e 1321; e 1,09 para 1115, 1227, 1299 e 1322. As concentrações foram medidas utilizando o coeficiente de extinção apropriado. As concentrações finais foram entre 94,6 - 101,6 mg/mL.

[00369] Os estudos de estabilidade foram realizados a 5 °C e 25 °C seguindo as mesmas orientações descritas na seção anterior, com exceção da coleta de apenas 0 e 1 mês para o estudo de estabilidade a 5 °C. A duração total para ambos os estudos foi de 1 mês. Abaixo são mostradas as taxas de agregação, fragmentação e de degradação, calculadas usando um ajuste linear aos dados de um mês.

Taxas após 1 mês a 25 °C

Molécula	% Agregado/Mês	% Fragmento/Mês	% Perda de Pureza/Mês
1115	6,0	0	6,0
1227	4,0	0	4,0
1315	24,0	0	24,0
1299	1,5	0	1,5
1321	8,8	0	8,8
1322	1,4	0	1,4

Taxas após 1 mês a 5 °C

Molécula	% Agregado/Mês	% Fragmento/Mês	% Perda de Pureza/Mês
1115	0,4	0	0,4
1227	0,8	0	0,8
1315	2,6	0	2,6
1299	0,2	0	0,2
1321	0,6	0	0,6
1322	0,1	0	0,1

[00370] As variantes 1299 e 1322 foram encontradas como tendo níveis mais baixos de perda de pureza, nos estudos tanto a 5 °C e 25 °C em mais de 1 mês. Assim, os estudos de estabilidade foram estendidos a 6 meses a 5 °C para as variantes de 1299 e 1322. Abaixo são mostrados os resultados obtidos a partir dos pontos de tempo mensais.

Dados de estabilidade 1299 a 5 °C

Pontos Temporais (meses)	% Agregado	% Fragmento	% Pureza
0	1,1	0,0	98,9
1	1,4	0,0	98,6
2	2,0	0,0	98,0
3	1,9	0,0	98,1
4	2,4	0,0	97,6
5			
6			

% Perda de Pureza/ano, calculado a partir de dados lineares = 3,6%

Dados de estabilidade 1322 a 5 °C

Pontos Temporais (meses)	% Agregado	% Fragmento	% Pureza
0	1,2	0,0	98,8
1	1,4	0,0	79,5
2	1,8	0,0	98,2
3	1,7	0,0	98,3
4	2,1	0,0	97,9
5			
6			

% Perda de Pureza/ano, calculado a partir de dados lineares = 2,6%

Exemplo 11 - Construção de uma molécula tetravalente de CTLA-4Projeto e construção de vetores de expressão de CTLA-4 tetravalente

[00371] Usando o ligante nitrofenol IgG NIP 74 (cadeia pesada SEQ ID NO: 17; cadeia leve SEQ ID NO: 18) como um suporte, CTLA-4 tetravalente foi produzido por fusão de CTLA-4 com o terminal amino de ambos os anticorpos de cadeia V_H e V_L (Figura 7A). As construções de expressão foram produzidas por fusão de CTLA-4 com o V_H e V_L utilizando uma estratégia de PCR em 2 etapas e, em seguida, sub-clonagem dos produtos de PCR em vetores de expressão de IgG contendo os domínios constantes de anticorpos. O PCR primário amplificou CTLA-4 e IgG V_H e V_L com os iniciadores específicos de gene (SEQ ID NOS 21-28), que foi adicionado um ligante flexível na extremidade 3' de CTLA-4 e na extremidade 5' de V_H e V_L. O 'pull-through' secundário de PCR ligado a CTLA-4 à extremidade 5' de V_H e V_L por hibridação das sequências de ligação complementares. A construção final de CTLA-4-V_H foi amplificada utilizando iniciadores que introduziram um local BssHII na extremidade 5' e um local BstEII na extremidade 3' (SEQ ID NOS 29-30). A construção final de CTLA-4-VL foi amplificada utilizando iniciadores que introduziram um local

ApaLI na extremidade 5' e um local *PacI* na extremidade 3' (SEQ ID NOS 31-32). Os produtos de PCR foram, em seguida, digeridos com as respectivas enzimas de restrição antes de serem ligados diretamente nos vetores de expressão pré-digeridos de IgG, pEU1.4 para a cassette CTLA-4-V_H e pEU3.4 para a cassette CTLA-4-V_L, e usados para transformar células DH5-alfa de *E. coli* quimicamente competentes. Clones corretos, correspondentes a SEQ ID NOS 19 e 20, foram identificados por análise de sequência para estudos de expressão.

Expressão e purificação de CTLA-4 tetramérico

[00372] Para ambos os plasmídeos necessários para a transfecção, um que codifica para a proteína de fusão CTLA-4 de cadeia pesada e um que codifica para a proteína de fusão CTLA-4 de cadeia leve, uma única colônia foi utilizada para inocular 100 mL de caldo 2xTY contendo 100 µg/mL de ampicilina. As culturas foram incubadas durante a noite (16 horas) a 37 °C e 300 rpm. O DNA de plasmídeo foi isolado a partir do sedimento bacteriano, utilizando o kit EndoFree Plasmid Maxi (QIAGEN; 12362) seguindo as instruções do fabricante. Na manhã do dia da transfecção, células CHO foram cultivadas a um milhão de células por mL em meio CD-CHO (Invitrogen; 10743-029) contendo 25 µM de L-metionina sulfoximina (Sigma; M5379). As células foram cultivadas num volume de 500 mL e incubadas a 37 °C, 140rpm, 80% de umidade e 5% de CO₂. De modo a formar complexos de DNA-PEI para a transfecção, 250 µg de cada um dos vetores foram misturados e diluídos em NaCl a 150 mM para originar 500 µg de DNA num volume final de 1 mL. O DNA foi, em seguida, misturado com 1 mL de 5 mg/mL de PEI (Polysciences, 23966) diluído em 150 mM de NaCl e incubado à temperatura ambiente durante 1 minuto. A mistura de DNA-PEI foi então cuidadosamente adicionado à cultura CEP6 que foi, em seguida, incubada durante 24 horas antes da adição de 150 mL

de alimentação B CD-CHO eficiente (Invitrogen; A10240). A cultura foi então incubada durante mais seis dias.

[00373] A cultura foi centrifugada a 2000g durante 30 minutos; o sobrenadante de cultura clarificado foi então filtrado através de 500 ml Stericup (Millipore; SCGVU05RE). A purificação de CTLA-4 tetravalente, a partir do sobrenadante de cultura clarificado foi realizada utilizando um sistema de ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare; 28-4062-64) e cromatografia de afinidade, seguida de cromatografia de filtração em gel. 5 mL da coluna MabSelect Claro (GE Healthcare; 11-0034-94) foi equilibrada com dez volumes de coluna D-PBS (Invitrogen; 14040-174). O sobrenadante de cultura clarificado foi passado sobre a coluna antes de a coluna ser lavada com mais de dez volumes de coluna D-PBS. A proteína ligada foi eluída com 0,1 M de glicina, pH 2,7 e as fracções de 1 mL foram recolhidas. Cada fracção foi neutralizada com 100 µL de Tris 1M, pH 10 e as fracções contendo a proteína eluída foram reunidas e concentradas para 2 mL usando a unidade de filtração Vivaspin, 10,000 MWCO (Sartorius Stedim; VS2002) seguindo as instruções do fabricante. 2 mL da amostra concentrada foi carregada em uma coluna HiLoad 16/60 Superdex 200 de filtração em gel (GE Healthcare; 17-1069-01), que tinha sido equilibrada em D-PBS. Durante todo o processo fracções de 1,2 mL foram recolhidas. As fracções contendo a proteína alvo de peso molecular correto (volume de retenção de 56 mL) foram reunidas, concentradas para 1 mL utilizando unidades de filtração Vivaspin, 10,000 MWCO e armazenadas a -80 °C.

[00374] CTLA-4 tetramérico purificado foi perfilado ao lado do tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) em formato de fusão Fc no ensaio duplo de células de Raji-Jurkat e os dados são apresentados na Figura 8. Os valores de IC₅₀ no ensaio de CTLA-4 tetramérico e do tipo selvagem de CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) em formato de fusão Fc

foram de 1,93 nM e 11,39 nM, respectivamente. Tal indica um ganho de potência de 5,9 vezes sobre a conversão de um formato de fusão Fc dimérico para um tetramérico, formato semelhante a IgG.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado de CTLA-4 tendo uma maior afinidade de ligação para CD80 humano, uma maior potência e/ou uma maior estabilidade em comparação com o tipo selvagem de CTLA-4 SEQ ID NO: 35, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo comprehende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 43.

2. Polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que possui uma afinidade de 50 nM ou menos para ligação a CD80 humano, em que a afinidade é K_D conforme determinada por ressonância de plasma de superfície, opcionalmente em que o polipeptídeo possui uma afinidade de 20 nM ou menos para ligação a CD80 humano.

3. Polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo tem uma maior afinidade do que CTLA-4 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 35) para ligação a CD86 humano.

4. Polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que possui pelo menos 10 vezes mais afinidade para ligar a CD80 do que para ligar a CD86, opcionalmente em que o peptídeo possui pelo menos 50 vezes mais afinidade para ligar CD80 do que para ligar CD86.

5. Polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é conjugado com uma sequência de aminoácidos de Fc de IgG,

opcionalmente em que o Fc de IgG é Fc de IgG1 humana modificada para reduzir a função efetora Fc e comprehende uma região de dobradiça de Fc de IgG1 humana nativa,

opcionalmente em que a sequência de aminoácido do Fc de IgG comprehende uma região Fc de IgG1 humana

em que um ou mais dos seguintes grupos de resíduos são

substituídos conforme a seguir:

F no resíduo 20; E no resíduo 21; S no resíduo 117; e
Y no resíduo 38, T no resíduo 40, E no resíduo 42,
A numeração dos resíduos sendo definida com referência a
SEQ ID NO: 56.

6. Polipeptídeo CTLA-4 de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos IgG Fc é SEQ ID NO: 59.

7. Polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo comprehende a sequência da SEQ ID NO: 13.

8. Polipeptídeo CTLA-4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo está em um multímero, opcionalmente em que o polipeptídeo CTLA-4 está em um dímero ou tetrâmero, o tetrâmero comprehendendo dois pares de polipeptídeos CTLA-4, cada par comprendendo um polipeptídeo CTLA-4 fundido a uma região constante de cadeia leve de anticorpo e um polipeptídeo CTLA-4 fundido a uma região constante de cadeia pesada de anticorpo.

9. Célula hospedeira contendo o ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que o ácido nucleico codifica um polipeptídeo CTLA-4 ou proteína de fusão Fc de IgG de CTLA-4 conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a célula hospedeira é selecionada do grupo de: bactérias, levedura e sistemas de baculovírus.

10. Composição caracterizada pelo fato de que comprehende:
um polipeptídeo CTLA-4 ou proteína de fusão Fc de IgG de CTLA-4 como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8; e
um ou mais excipientes farmacêuticos.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que comprehende o polipeptídeo CTLA-4 ou prote-

ína de fusão Fc de IgG de CTLA-4 a uma concentração de pelo menos 70 mg/ml, opcionalmente a uma concentração de pelo menos 100 mg/ml.

12. Uso de um polipeptídeo CTLA-4 ou proteína de fusão Fc de IgG de CTLA-4 como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 ou de uma composição como definida nas reivindicações 10 ou 11, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para terapia de um paciente por administração subcutânea ou intravenosa.

13. Uso de um polipeptídeo CTLA-4 ou proteína de fusão Fc de IgG de CTLA-4 como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 ou de uma composição como definida nas reivindicações 10 ou 11, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratamento de artrite reumatóide, esclerose múltipla, asma, doença de Crohn, colite ulcerosa, lúpus eritematoso sistêmico ou rejeição de transplante.

A Numeração de Sequência		B Numeração de Sequência (topo) e numeração de acordo com Swiss-Prot entrada P16510 [baixo]	
Nome	SEQ ID	Nome	SEQ ID
Tipo Selvagem CTLA-4			
variante -1	35	IgG1_Fc	56
variante -1.1	36	Fc variante -1	57
variante -1.2	37	Fc variante -2	58
variante -1.3	38	Fc variante -3	59
variante -1.4	39	Fc variante -4	60
variante -1.5	40		
variante -1.6	41		
variante -1.7	42		
variante -1.8	43		
variante -1.9	44		
variante -1.10	45		
variante -1.11	46		
variante -1.12	47		
variante -1.13	48		
variante -1.14	49		
variante -1.15	50		
variante -1.16	51		
variante -1.17	52		
variante -1.18	53		
variante -1.19	54		
variante -1.20	55		

Figura 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
M	H	V	A	Q	P	A	V	V	L	A	S	S	R	G	R ₁₆	A	S	F	V
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	E	Y	R ₂₄	N	P	R ₂₇	K	A	T	E	V	R	V	T	V	L	R	Q	A
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M	R ₅₄	G	R ₅₆	E	R ₅₈	R ₅₉	R ₆₀
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
R ₆₁	D	R ₆₃	R ₆₄	R ₆₅	C	T	G	T	R ₇₀	S	G	N	Q	V	N	L	T	I	R ₈₀
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
G	L	R	A	R ₈₅	D	T	G	L	Y	I	C	R ₉₃	V	E	L	M	Y	P	P
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
P	Y	Y	L	G	I	G	N	G	T	Q	I	Y	V	I	D	P	E	P	C
121	122	123	124																
P	D	S	D																

R₁₆ = R, I, S ou V
 R₂₄ = T ou A
 R₂₇ = S ou G
 R₅₄ = M ou K
 R₅₆ = N ou S
 R₅₈ = A, L ou G
 R₅₉ = T ou S
 R₆₀ = F ou T

R₆₁ = L ou Q
 R₆₃ = D ou Y
 R₆₄ = S ou P
 R₆₅ = I, N ou D
 R₇₀ = A ou S
 R₈₀ = Q ou R
 R₈₅ = Q, M ou S
 R₉₃ = Q ou H

Figura 2

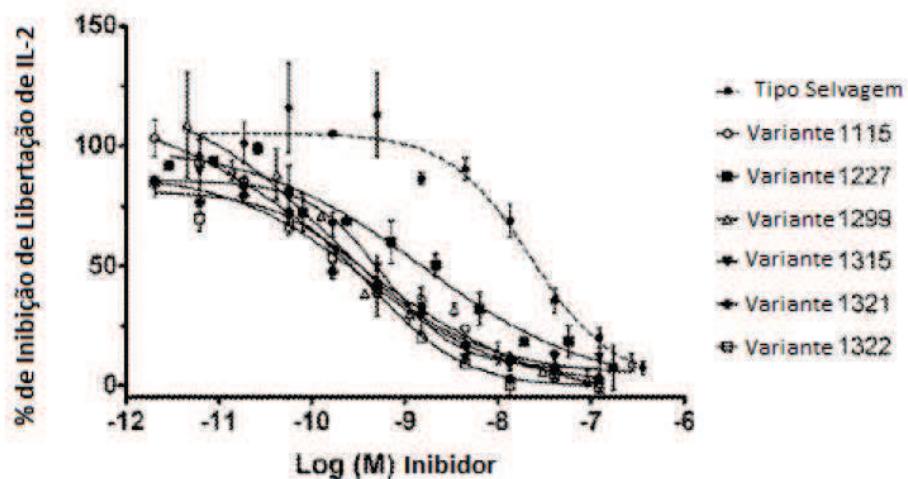
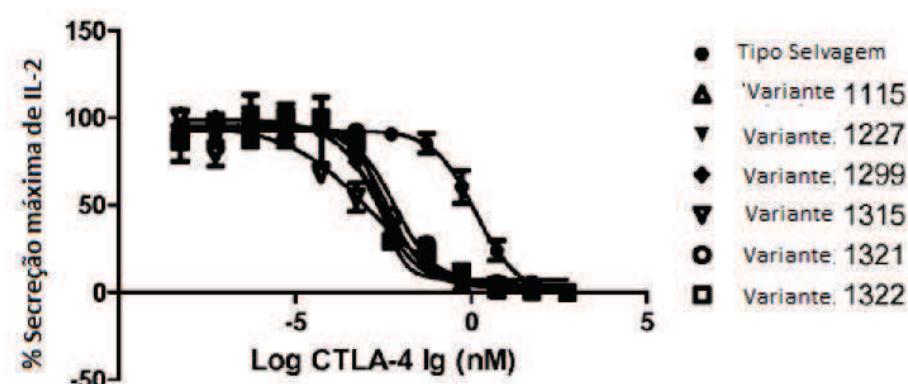
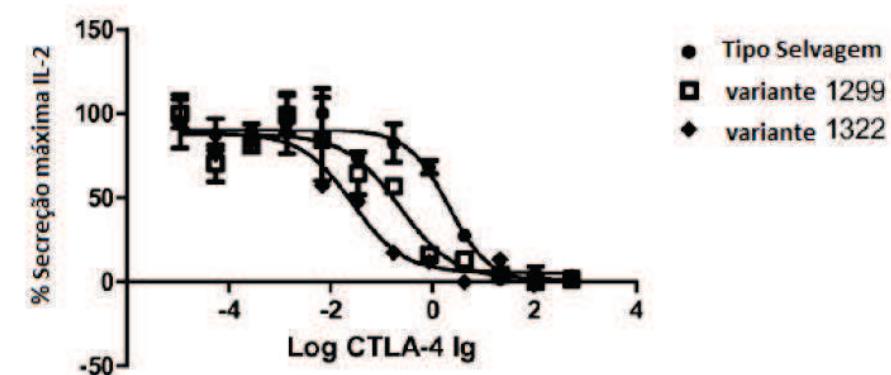
A**B****C**

Figura 3

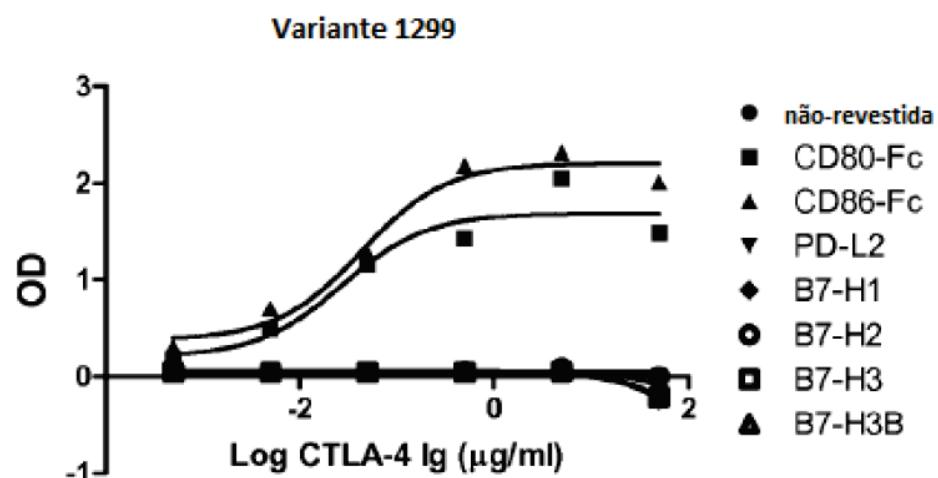
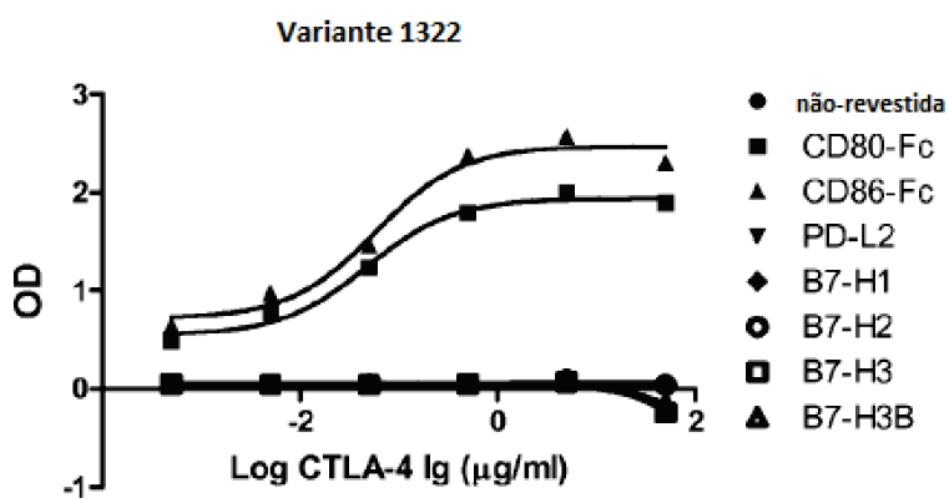
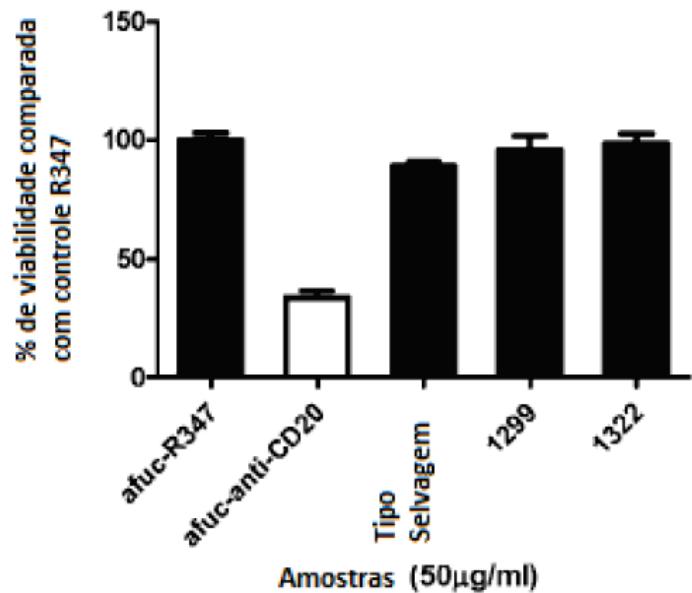
A**B**

Figura 4

5/7

A



B

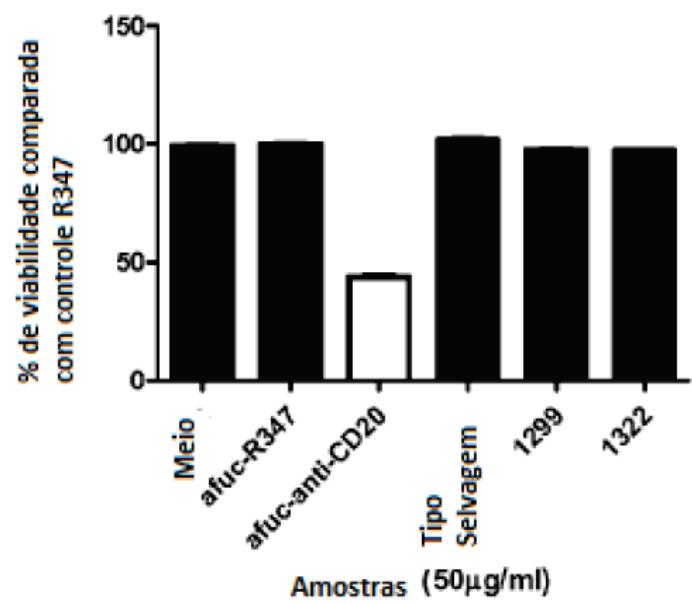


Figura 5

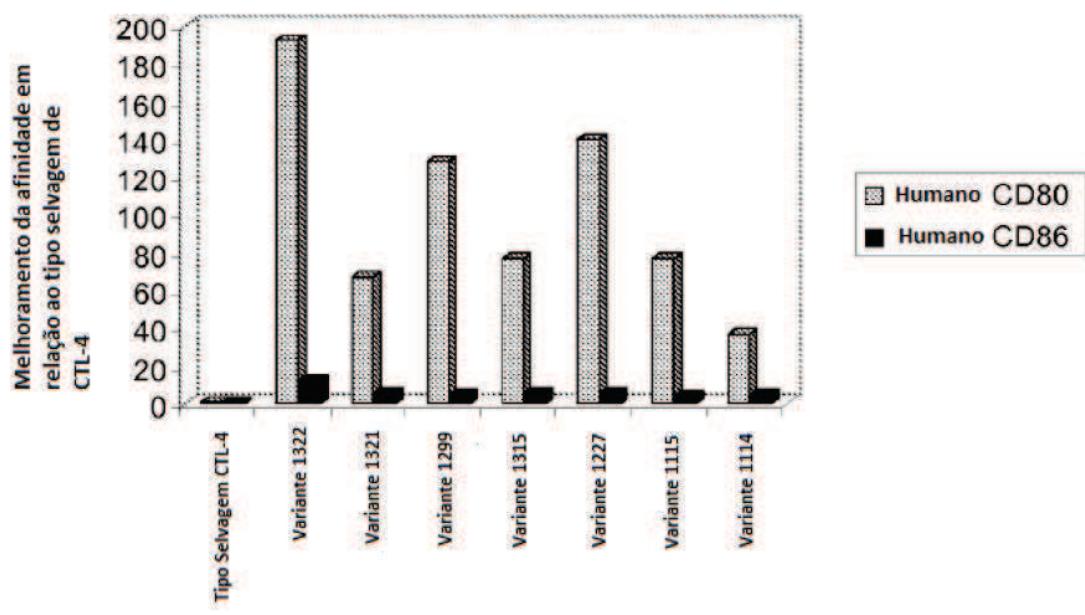


Figura 6

A

CTLA-4	NIP74 V _H	C _H 1	C _H 2	C _H 3
CTLA-4	NIP74 V _L	C _L		

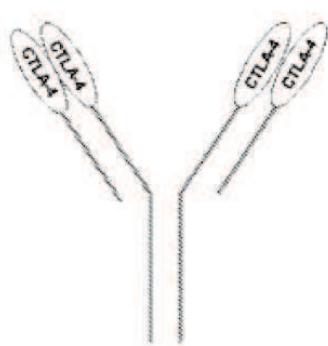
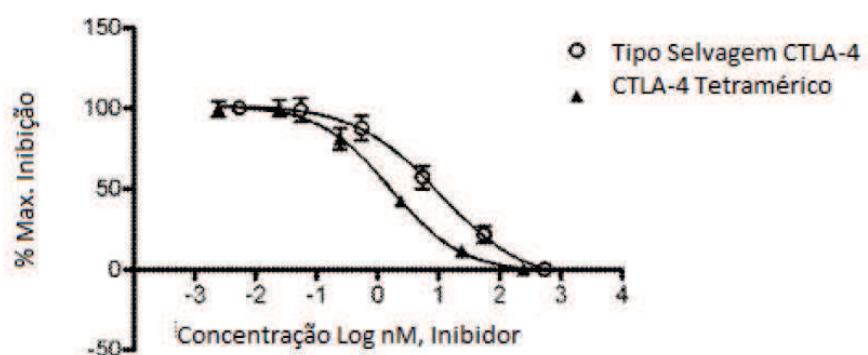
**B**

Figura 7