

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390924** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.10.31**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 11/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.09.28**

---

(54) **АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ НИЗКОЙ  
ВЯЗКОСТЬЮ, И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

---

(31) **62/401,770; 62/430,773; 62/546,469**

(32) **2016.09.29; 2016.12.06; 2017.08.16**

(33) **US**

(62) **201990837; 2017.09.28**

(71) Заявитель:  
**ЭМДЖЕН ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Хух Джун, Стивенсон Рики,  
Бондаренко Павел, Николс Эндрю,  
Рен Да, Агравал Неерай Джагдиш,  
Смит Ричард (US)**

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

---

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающих белков, характеризующихся пониженной вязкостью. Способ осуществляют с помощью замещения остатков в подсемействах варибельных доменов, характеризующихся высокой вязкостью, остатками из подсемейств, коррелирующих с низкой вязкостью. Способ дополнительно включает осуществление замены остатков в Fc-домеи остатками, ассоциированными с низкой вязкостью, и добавление заряженных остатков к С-концу Fc-домеи. Настоящее изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающим белкам, получаемым с помощью данного способа.

---

**A1**

**202390924**

**202390924**

**A1**

**АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ НИЗКОЙ  
ВЯЗКОСТЬЮ, И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

## ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/546469, поданной 16 августа 2017 г.; предварительной заявки на патент США № 62/430773, поданной 06 декабря 2016 г.; и предварительной заявки на патент США № 62/401770, поданной 29 сентября 2016 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

**[0001]** Данное изобретение относится к биофармацевтическим препаратам, в частности, к терапевтическим антигенсвязывающим белкам, способам их применения, фармацевтическим композициям на их основе и способам их получения. В частности, данное изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, в частности, к антителам, мутированным для снижения вязкости.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0002]** В данный документ включен посредством ссылки во всей своей полноте перечень последовательностей под названием "A-2063-WO-PCST\_ST25", содержащий от SEQ ID NO:1 до SEQ ID NO:383, которые включают последовательности нуклеиновых кислот и/или аминокислотные последовательности, раскрытые в данном документе. Перечень последовательностей подан согласно данному документу в текстовом формате ASCII через файловую систему EFS и, таким образом, составляет как бумажную, так и его машиночитаемую форму. Перечень последовательностей был впервые создан с применением PatentIn 16 августа 2017 г. и имеет размер 4,32 МБ.

## ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0003]** В настоящее время моноклональные антитела (mAb) представляют собой наиболее популярный вид современных терапевтических белков на рынке и в стадии разработки. Различия между антителами преимущественно заключаются в антигенсвязывающих доменах или участках, определяющих

комплементарность (CDR). Считается, что эти различия в CDR приводят к различиям в склонности к временным белок-белковым взаимодействиям, которые проявляются как объемная вязкость раствора. Несколько групп описали присутствие обратимых кластеров антител в вязких растворах антител (преимущественно димеров). Было предложено несколько теоретических описаний вязкости полимеров для объяснения взаимодействий этих кластеров в качестве механизма поведения объемной вязкости раствора.

[0004] Антитела обычно действуют как антагонисты, и поэтому для блокирования нежелательных взаимодействий требуются большие количества, часто превышающие 100 мг на дозу. Для удобства пациента однократная подкожная инъекция объемом 1 мл является наиболее предпочтительным способом введения. Необходимость введения больших количеств mAb в относительно небольшом объеме требует составов с высокой концентрацией, равной или превышающей 100 мг/мл. Антитела представляют собой крупные биополимеры со значениями молекулярной массы приблизительно 150 кДа, и их высокие концентрации приводят к высокому напряжению сдвига и высокой вязкости из-за белок-белковых взаимодействий и взаимодействий белок-стенка во время фильтрации и прохождения через инъекционные иглы и в подкожном пространстве. Высокая вязкость создает проблемы при производстве терапевтических антигенсвязывающих белков, а также при их введении пациентам, включая чрезмерно высокое противодействие во время инъекций, приводящее к неисправности инъекционных устройств, затруднение ручного введения, снижение биодоступности и дискомфорт пациента.

[0005] Разработка и применение растворов терапевтических моноклональных антител с высокой концентрацией ускорились, поскольку стоимость производства биофармацевтических препаратов снизилась. В некоторых случаях эти растворы антител обладают характеристиками вязких растворов, которые могут затруднять производство и введение предполагаемой дозы. Различия в CDR, которые, по-видимому, определяют, является ли антитело "вязким" или "не вязким", вероятно, связаны со склонностью CDR обеспечивать управление белок-белковым взаимодействием.

[0006] В отрасли предпринимаются значительные усилия, чтобы

понять природу взаимодействий, ведущих к высокой вязкости, и снизить вязкость составов антител, характеризующихся высокой вязкостью. Наиболее важные параметры, влияющие на вязкость составов антител, включают следующее.

Межмолекулярные взаимодействия, определяемые pI белка и pH раствора. Cheng et al. (2013), "Linking the solution viscosity of an IgG2 monoclonal antibody to its structure as a function of pH and temperature", J. Pharm Sci. 102: 4291-4304.

Взаимодействия зарядов. Yadav et al. (2012), "Viscosity behavior of high-concentration monoclonal antibody solutions: correlation with interaction parameter and electroviscous effects", J. Pharm Sci. 101: 998-1011; Yadav et al. (2012), "The influence of charge distribution on self-association and viscosity behavior of monoclonal antibody solutions". Mol Pharm 9(4): 791-802; Singh et al. (2014), "Dipole-Dipole Interaction in Antibody Solutions: Correlation with Viscosity Behavior at High Concentration", Pharm Res. 31(9): 2549-2558; Chaudhri et al. (2013), "The role of amino acid sequence in the self-association of therapeutic monoclonal antibodies: insights from coarse-grained modeling", J. Phys. Chem. B 117: 1269-1279.

Гидрофобные взаимодействия. Guo et al. (2012), "Structure-activity relationship for hydrophobic salts as viscosity-lowering excipients for concentrated solutions of monoclonal antibodies", Pharm Res 29: 3102-3109.

[0007] Наибольшая вязкость раствора наблюдалась в условиях с наиболее отрицательным параметром диффузионного взаимодействия  $kD$ , наибольшим кажущимся радиусом и наименьшим суммарным зарядом. Neergaard et al. (2013), "Viscosity of high concentration protein formulations of monoclonal antibodies of the IgG1 and IgG4 subclass - prediction of viscosity through protein-protein interaction measurements", Eur. J. Pharm Sci. 49: 400-410. Параметр диффузионного взаимодействия ( $kD$ ), компонент второго вириального осмотического коэффициента ( $B(2)$ ), хорошо коррелирует ( $R > 0,9$ ) с вязкостью концентрированных растворов mAb, в то время как суммарный заряд mAb коррелирует слабо ( $R < 0,6$ ), указывая на то, что слабые межмолекулярные

взаимодействия важны для управления вязкоупругим поведением концентрированных растворов mAb. Connolly, et al. (2012), "Weak interactions govern the viscosity of concentrated antibody solutions: high-throughput analysis using the diffusion interaction parameter", Biophys. J. 103: 69-78. В исследовании, о котором сообщается в данном описании, использовали первичные последовательности, связанные с 3D-структурой. См. Honegger et al. (2001), "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J. Mol. Biol. 309: 657-670. Значения вязкости некоторых молекул mAb измеряли для разработки модели прогнозирования вязкости mAb с помощью алгоритмов машинного обучения. Расположение в структуре, заряд и гидрофобность были основными параметрами аминокислот, применяемыми для модели.

[0008] Вязкость моноклональных антител оценивали с использованием молекулярной информации из следующих статей: Li, L. et al. (2014), "Concentration dependent viscosity of monoclonal antibody solutions: explaining experimental behavior in terms of molecular properties", Pharm. Res. 31: 3161-3178; и Sharma et al. (2014), "In silico selection of therapeutic antibodies for development: viscosity, clearance, and chemical stability", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 111: 18601-6.

[0009] Конечным результатом взаимодействий между антителами является либо расширенная временная сеть взаимодействий (перколирующая сеть), которая приводит к образованию вязкого раствора, либо образование более крупных олигомеров, которые затем каким-то образом влияют на реологию раствора в виде более крупных структур. В исследованиях, представленных в данном описании, небольшое количество вязких антител применяли в качестве объекта для биохимического и биофизического анализа в попытке определить специфические белок-белковые взаимодействия, которые могут привести к получению вязкого раствора антител.

[0010] Подход нумерации Aho применяли в прошлом для улучшения стабильности и других биофизических свойств. Ewert et al. (2003), "Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable

approach", Biochemistry 42: 1517-1528; Ewert et al. (2003), "Biophysical properties of human antibody variable domains", J. Mol. Biol. 325: 531-553; Ewert et al. (2004), "Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering", Methods 34: 184-199; и Rothlisberger et al. (2005), "Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability", J Mol. Biol. 347: 773-789. Систему нумерации Aho также применяли в прошлом для снижения склонности к агрегации. Borrás et al. (2013), патент США № 8545849.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0011] Данное изобретение относится к способам снижения вязкости антигенсвязывающих белков путем модификации последовательностей в каркасных областях и/или Fc-домене, которые, как показано, ассоциированы с высокой вязкостью.

[0012] В следующем подробном описании способа все аминокислоты вариабельной области идентифицированы согласно нумерации Aho, все аминокислоты из консервативных областей идентифицированы согласно нумерации EU. Нумерация Aho выровнена и коррелирует с другими основными схемами нумерации, включая EU (Edelman et al. (1969), "The covalent structure of an entire gamma immunoglobulin molecule", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 63, 78-85), Kabat (Kabat et al. (1991), Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242), Chothia (Chothia et al., (1992), "Structural repertoire of the human VH segments", J.Mol.Biol. 227: 799-817); (Tomlinson et al., (1995), "The structural repertoire of the human V kappa domain", EMBO J 14: 4628-4638). Любую из четырех систем нумерации можно взаимозаменяемо применять для идентификации предпочтительных аминокислотных замен, описанных в данном описании.

[0013] Если антигенсвязывающий белок предусматривает подсемейство VH1|1-18 зародышевого типа, способ включает модификацию последовательности VH1 с включением одной или

нескольких замен, выбранных из  $82X^1$ ,  $94X^2$  и  $95X^3$ , где  $X^1$  представляет собой основные остатки (R, K или H),  $X^2$  представляет собой полярный незаряженный остаток (S, T, N или Q), и  $X^3$  представляет собой основной остаток (R, K или H). Все остатки идентифицированы согласно системе нумерации Aho. Предпочтительными мутациями для подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа являются 82R, 94S и 95R. Способ, применяемый в отношении подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа, может дополнительно включать замену  $59X^{20}$ , где  $X^{20}$  представляет собой основной остаток (R, K или H), с предпочтительной мутацией 59K.

**[0014]** Если антигенсвязывающий белок предусматривает подсемейство VH3|3-33 зародышевого типа, способ включает модификацию последовательности VH3 с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $1X^4$ ,  $17X^5$  и  $85X^6$ , где  $X^4$  представляет собой отрицательно заряженный остаток (D или E),  $X^5$  представляет собой малый гидрофобный остаток (G, A, V, I, L или M), и  $X^6$  представляет собой малый гидрофобный остаток (G, A, V, I, L или M). Все остатки идентифицированы согласно системе нумерации Aho. Предпочтительными мутациями для подсемейства VH3|3-33 зародышевого типа являются 1E, 17G и 85A.

**[0015]** Если антигенсвязывающий белок предусматривает подсемейство VK3|L16 зародышевого типа, способ включает модификацию последовательности VK3 с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $4X^{10}$ ,  $13X^{11}$ ,  $76X^{12}$ , 78F,  $95X^{13}$ ,  $97X^{14}$  и 98P, где  $X^{10}$  выбран из G, A, V, I, L и M,  $X^{11}$  выбран из G, A, V, I, L и M,  $X^{12}$  выбран из D и E,  $X^{13}$  выбран из R, K и H, и  $X^{14}$  выбран из D и E. Все остатки идентифицированы согласно системе нумерации Aho. Предпочтительными мутациями для подсемейства VK3|L16 зародышевого типа являются 4L, 13L, 76D, 95R, 97E и 98P.

**[0016]** Если антигенсвязывающий белок предусматривает подсемейство VK3|L6 зародышевого типа, способ включает модификацию последовательности VK3 с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $76X^{12}$  и  $95X^{13}$ . Предпочтительными мутациями для подсемейства VK3|L6 зародышевого типа являются 76D и 95R.

**[0017]** Способы по настоящему изобретению дополнительно

включают модификацию Fc-домена с включением одной или нескольких замен, выбранных из 253X<sup>15</sup>, 440X<sup>16</sup> и 439X<sup>17</sup>, где X<sup>15</sup> представляет собой малый гидрофобный остаток (G, A, V, I, L или M), X<sup>16</sup> представляет собой основной остаток (R, K или H), и X<sup>17</sup> представляет собой отрицательно заряженный остаток (D или E), где последовательность Fc-домена включает только одну из 440X<sup>16</sup> и 439X<sup>17</sup>. Все остатки идентифицированы согласно системе нумерации EU. Предпочтительными мутациями Fc-домена являются 253A, 440K и 439E.

**[0018]** Способы по настоящему изобретению дополнительно включают модификацию C-конца последовательности Fc-домена с включением X<sup>18</sup>X<sup>19</sup>, где X<sup>18</sup> представляет собой от одной до четырех аминокислот, выбранных из D и E или из H, K и R, и X<sup>19</sup> выбран из P, M, G, A, V, I, L, S, T, N, Q, F, Y и W и отсутствует, если X<sup>18</sup> содержит D или E, присутствует, если X<sup>18</sup> содержит K или R в своем C-концевом участке, и присутствует или отсутствует, если X<sup>18</sup> содержит H в своем C-концевом участке. Предпочтительные C-концевые модификации Fc включают KP, KKP, KKKP (SEQ ID NO:380), E или EE на C-конце.

**[0019]** Вышеуказанные способы предпочтительно применяют в отношении антител, характеризующихся высокой вязкостью, показанных на фигурах 1A и 1B ниже. Часть способа, в которой используется последовательность VH1|1-18, предпочтительно применяют в отношении антител AF, AK, AL, AN и AO, представленных на фигуре 1B. Часть способа, в которой используется последовательность VH3|3-33, предпочтительно применяют в отношении антител AQ, AM, AI и AG, представленных на фигуре 1B. Часть способа, в которой используется последовательность VK3|L16, предпочтительно применяют в отношении антител AF и AQ, представленных на фигуре 1B. Часть способа, в которой используется последовательность VK3|L6, предпочтительно применяют в отношении антитела AJ.

**[0020]** Способы по настоящему изобретению дополнительно включают способ получения антигенсвязывающего белка, который достигает максимальной концентрации в сыворотке быстрее, чем исходное антитело, если антигенсвязывающий белок и исходное

антитело вводят в одной и той же концентрации, при этом включает введение модификации последовательности 440X<sup>16</sup> в исходное антитело, где X<sup>16</sup> выбран из R, K и H. В предпочтительном способе антигенсвязывающий белок с модифицированной последовательностью достигает максимальной концентрации в сыворотке после подкожной инъекции по меньшей мере в два раза быстрее, чем исходное антитело. Также в объем настоящего изобретения входит способ получения антигенсвязывающего белка, который достигает максимальной концентрации в сыворотке после подкожной инъекции, которая выше, чем концентрация исходного антитела, если антигенсвязывающий белок и исходное антитело вводят в одной и той же концентрации, который включает введение модификации последовательности 440X<sup>16</sup> в исходное антитело, где X<sup>16</sup> выбран из R, K и H. В предпочтительном способе антигенсвязывающий белок с модифицированной последовательностью достигает максимальной концентрации в сыворотке, которая на по меньшей мере приблизительно 25% выше, чем концентрация исходного антитела. В каждом из этих способов предпочтительным X<sup>16</sup> является K, а предпочтительным исходным антителом является полипептид PCSK9 (антитело АК наиболее предпочтительно).

**[0021]** Настоящее изобретение дополнительно относится к мутантному антигенсвязывающему белку, который содержит одну или несколько последовательностей, выбранных из:

а. последовательности подсемейства зародышевого типа VH1|1-18, содержащей одну или несколько замен, выбранных из 82X<sup>1</sup>, 94X<sup>2</sup> и 95X<sup>3</sup>, где X<sup>1</sup> выбран из R, K и H, X<sup>2</sup> выбран из S, T, N и Q, и X<sup>3</sup> выбран из R, K и H;

б. последовательности подсемейства VH3|3-33 зародышевого типа, содержащей одну или несколько замен, выбранных из 1X<sup>4</sup>, 17X<sup>5</sup> и 85X<sup>6</sup>, где X<sup>4</sup> выбран из D и E, X<sup>5</sup> выбран из G, A, V, I, L и M, и X<sup>6</sup> выбран из G, A, V, I, L и M;

с. подсемейства VK3|L16 зародышевого типа, содержащего одну или несколько замен, выбранных из 4X<sup>10</sup>, 13X<sup>11</sup>, 76X<sup>12</sup>, 78F, 95X<sup>13</sup>, 97X<sup>14</sup> и 98P, где X<sup>10</sup> выбран из G, A, V, I, L и M, X<sup>11</sup> выбран из G, A, V, I, L и M, X<sup>12</sup> выбран из D и E, X<sup>13</sup> выбран из R, K и H, и X<sup>14</sup> выбран из D и E, где мутантный антигенсвязывающий белок не

содержит только замену 78F;

d. подсемейства VK3|IL6 зародышевого типа, содержащего одну или несколько замен, выбранных из 76X<sup>12</sup> и 95X<sup>13</sup>;

e. последовательности Fc-домена, содержащей одну или несколько замен, выбранных из 253X<sup>10</sup>, 440X<sup>11</sup> и 439X<sup>12</sup>, где X<sup>10</sup> выбран из G, A, V, I, L и M, X<sup>11</sup> выбран из R, K и H, и X<sup>12</sup> выбран из D и E, где антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере одно из 253X<sup>15</sup> или модификаций, выбранных из подпунктов a, b, c, d и f, если X<sup>16</sup> представляет собой K, и X<sup>17</sup> представляет собой E и антигенсвязывающий белок специфически связывает CD20; и

f. последовательности Fc-домена, содержащей на С-конце X<sup>18</sup>X<sup>19</sup>, где X<sup>18</sup> представляет собой от одной до четырех аминокислот, выбранных из D и E или из H, K и R, и X<sup>19</sup> выбран из P, M, G, A, V, I, L, S, T, N, Q, F, Y и W и отсутствует, если X<sup>18</sup> содержит D или E, присутствует, если X<sup>18</sup> содержит K или R в своем С-концевом участке, и присутствует или отсутствует, если X<sup>18</sup> содержит H в своем С-концевом участке, и где антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере одно из 253X<sup>15</sup> или замен, выбранных из подпунктов от a до e, если на С-конце появляется PGKP (SEQ ID NO:381), PGKKP (SEQ ID NO:382), PGKKKP (SEQ ID NO:383) или PGE, и антигенсвязывающий белок специфически связывает CD20 или CD38. Предпочтительные С-концевые модификации Fc включают KP, KKP, KKKP (SEQ ID NO:380), E или EE на С-конце;

где аминокислоты вариабельной области пронумерованы в соответствии с системой нумерации Aho, а все аминокислоты из консервативных областей, включая Fc, соответствуют нумерации EU.

**[0022]** Предпочтительными антигенсвязывающими белками в соответствии с настоящим изобретением являются те, в которых указанные выше модификации применяют в отношении антител, представленных на фигурах 1A и 1B, приведенных ниже. Также предпочтительными являются антигенсвязывающие белки, в которых:

**[0023]** последовательность подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа содержит одну или несколько замен, выбранных из 82R, 94S и 95R, при этом антигенсвязывающие белки, имеющие все данные замены, наиболее предпочтительны;

**[0024]** последовательность подсемейства VH3|3-33

зародышевого типа содержит одну или несколько из замен 1E, 17G и 85A, при этом антигенсвязывающие белки, имеющие все данные замены, наиболее предпочтительны;

[0025] последовательность подсемейства VK3|L16 зародышевого типа содержит одну или несколько замен, выбранных из 4L, 13L, 76D, 95R, 97E и 98P, при этом антигенсвязывающие белки, имеющие все данные замены, наиболее предпочтительны;

[0026] последовательность подсемейства VK3|L6 зародышевого типа содержит одну или несколько замен, выбранных из 76D и 95R, при этом антигенсвязывающие белки, имеющие все данные замены, наиболее предпочтительны;

[0027] последовательность Fc-домена содержит одну или несколько замен, выбранных из 253A, 440K и 439E, при этом антигенсвязывающие белки, имеющие все данные замены, наиболее предпочтительны; и

[0028] C-конец Fc-домена содержит последовательность, выбранную из KP, KKP, KKKP (SEQ ID NO:380) и E.

[0029] Все вышеуказанные предпочтительные аминокислотные замены в переменных областях идентифицированы согласно системе нумерации Aho. Все остатки в консервативных областях, включая Fc, идентифицированы согласно системе нумерации EU.

[0030] Предпочтительные антигенсвязывающие белки в соответствии с настоящим изобретением включают антитела AF, AK, AL, AN и AO, представленные на фигуре 1B, имеющие одну или несколько, наиболее предпочтительно все, из вышеупомянутых замен подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа; антитела AQ, AM, AI и AG, представленные на фигуре 1B, имеющие одну или несколько, наиболее предпочтительно все, из замен подсемейства VH3|3-33 зародышевого типа; антитела AF и AQ, имеющие одну или несколько, наиболее предпочтительно все, из замен подсемейства VK3|L16 зародышевого типа; антитело AJ, представленное на фигуре 1B, имеющее одну или несколько, наиболее предпочтительно все, из замен подсемейства VK3|L6 зародышевого типа; и антитела BA, AN и AN, представленные на фигуре 1B, имеющие одну или несколько, предпочтительно все, из замен Fc, указанных выше.

[0031] Из-за вышеизложенных модификаций последовательности

настоящее изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающим белкам, которые специфически связываются с PCSK9, содержащим последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 352, 353, 354, 366 и 368, предпочтительно также содержащим последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 351.

[0032] Из-за вышеизложенных модификаций последовательности настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, которые специфически связывают c-fms, содержащим последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 356, 357 и 358, предпочтительно дополнительно содержащим последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 355.

[0033] Из-за вышеизложенных модификаций последовательности настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, которые специфически связывают GIPR, содержащим последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 359, 361, 362, 364 и 368, предпочтительно дополнительно содержащим последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 360, 363, 365 и 367.

[0034] Все модифицированные антигенсвязывающие белки применимы по тем же показаниям, которые описаны ранее для немодифицированных антител.

[0035] Каждый из антигенсвязывающих белков на фигурах 1A и 1B, характеризующийся мутированными тяжелыми цепями, предпочтителен для дополнительного включения последовательности легкой цепи, как указано в немодифицированном исходном антителе на фигурах 1A и 1B. Каждый из вышеупомянутых антигенсвязывающих белков, характеризующийся мутированной легкой цепью, предпочтителен для дополнительного включения последовательности тяжелой цепи, как указано выше или как наблюдается в немодифицированном исходном антителе на фигурах 1A и 1B.

[0036] Настоящее изобретение дополнительно включает антигенсвязывающие белки, описанные выше, которые обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами. Настоящее изобретение включает антигенсвязывающий белок, факультативно характеризующийся любой из вышеупомянутых модификаций последовательности, где:

а. антигенсвязывающий белок содержит модификацию последовательности 440X<sup>16</sup> по сравнению с исходным антителом, в котором отсутствует модификация последовательности 440X<sup>16</sup>,

б. антигенсвязывающий белок достигает максимальной концентрации в сыворотке после подкожной инъекции быстрее, чем исходное антитело, если антигенсвязывающий белок и исходное антитело вводят в одной и той же концентрации, и

с. антигенсвязывающий белок достигает максимальной концентрации в сыворотке после подкожной инъекции, которая выше, чем концентрация исходного антитела, если антигенсвязывающий белок и исходное антитело вводят в одной и той же концентрации.

Предпочтительным исходным антителом для такого антигенсвязывающего белка является PCSK9-связывающий полипептид, причем антитело АК является наиболее предпочтительным. Предпочтительным заместителем X<sup>16</sup> в таком антигенсвязывающем белке является К. Дополнительно в объем настоящего изобретения входит способ лечения гиперхолестеринемии с помощью такого антигенсвязывающего белка.

**[0037]** Настоящее изобретение также относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению, а также к векторам, содержащим данные нуклеиновые кислоты, к клеткам-хозяевам, содержащим данные векторы, и к способам получения и применения антигенсвязывающих белков.

**[0038]** В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции, содержащие антигенсвязывающие белки, и наборы, содержащие антигенсвязывающие белки, а также изделия, содержащие антигенсвязывающие белки.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[0039]** На фигурах 1А и 1В показана таблица значений вязкости, измеренных для моноклональных антител IgG1 и IgG2, составленных в концентрации 150 мг/мл в буфере для составления, содержащем 20 мМ ацетата и 9% сахарозы при рН 5,2 (без полисорбата). На фигурах 1А и 1В показаны мишени исследуемых антител, а также типы их легких и тяжелых цепей, подсемейства

зародышевого типа, концентрация,  $pI$  и вязкость. Каждое антитело на фигурах 1А и 1В имеет аминокислотные последовательности, указанные на фигурах и в перечне последовательностей. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей кодируются нуклеиновыми кислотами, имеющими SEQ ID NO, непосредственно предшествующие им в перечне последовательностей.

[0040] На фигурах 1С и 1D показаны идентификационные номера последовательностей (SEQ ID NO) для каркасных областей и областей Fc антител на фигурах 1А и 1В. На фигуре 1D также показано антитело ВА, которое обсуждается на фигуре 17.

[0041] На фигуре 2 показаны пары подтипов с высокой вязкостью и низкой вязкостью, определенные в данном описании.

[0042] На фигуре 3 показаны результаты экспрессии для молекул антител АК и АО и их мутантов, включая относительные значения титра, конечной плотности жизнеспособных клеток (VCD) и жизнеспособности при сборе через 7 дней культивирования клеток. Значения АК составляют 100%.

[0043] На фигуре 4 показана эффективность исходных антител АК (контроль АК, АК) и их мутантов.

[0044] На фигуре 5 показана вязкость мутантов относительно исходных антител АК и АО. Средние значения вязкости для VH1|1-18 с высокой вязкостью и VH1|1-02 с низкой вязкостью из группы из 43 антител также показаны для сравнения.

[0045] На фигуре 6 показаны измеренные значения вязкости mAb для подтипов VH1|1-18 с высокой вязкостью и VH1|1-02 с низкой вязкостью по сравнению с рассчитанными значениями  $pI$  для всей молекулы. Мутанты антител АК и АО с низкой вязкостью также показаны.

[0046] На фигуре 7 показаны измеренные значения вязкости mAb для подтипов VH3|3-33 с высокой вязкостью и VH3|3-07 с низкой вязкостью по сравнению с рассчитанными значениями  $pI$  для всей молекулы. Мутант AQ с низкой вязкостью (1, 17, 85) также показан.

[0047] На фигуре 8 показаны измеренные значения вязкости mAb с подсемействами VK3|L16 и VK3|L6 с высокой вязкостью и подсемейством VK3|A27 с низкой вязкостью по сравнению с

рассчитанными значениями  $rI$  для всей молекулы. Мутант AQ с низкой вязкостью (4 13 76 95 97 98) также показан.

[0048] Фигура 9 представляет собой таблицу, демонстрирующую общие параметры последовательностей mAb подтипов VH1|1-18 с высокой вязкостью и VH1|1-02 с низкой вязкостью (зародышевые линии). На фигуре 9 mAb рассортированы по вязкости. Таблица включает их символы mAb, измеренные значения вязкости, рассчитанные значения  $rI$  и зародышевые линии VL и VH. Для зародышевых линий VH VH1|1-18 с более высокой вязкостью показаны жирным шрифтом и подчеркнуты. Показаны последовательности каркаса 3 тяжелой цепи. Остатки, коррелирующие с высокой вязкостью, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Последовательности VBase добавлены к подсемействам VH1|1-18 и VH1|1-02 зародышевого типа для сравнения, чтобы проиллюстрировать, что различные остатки являются типичными остатками для данных подсемейств.

[0049] Фигура 10 представляет собой таблицу, на которой показаны полученные и охарактеризованные мутанты антител AK и AO.

[0050] Фигура 11 представляет собой таблицу, на которой показаны общие параметры последовательностей тринадцати mAb с тяжелыми цепями VH3. На фигуре 11 представлены символы mAb, измеренные значения вязкости, рассчитанные значения  $rI$ , типы HC и LC, а также подтипы VL и VH (зародышевые типы). Подсемейство VH3|3-33 с более высокой вязкостью показано жирным шрифтом и подчеркнуто. Остатки, коррелирующие с высокой вязкостью, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Последовательности VBase добавлены к подсемействам VH3|3-33 и VH3|3-07 зародышевого типа для сравнения, чтобы проиллюстрировать, что различные остатки являются типичными остатками для этих подсемейств.

[0051] Фигура 12 представляет собой таблицу, на которой показаны общие параметры последовательностей четырнадцати mAb с легкими цепями VK3. На фигуре 12 mAb рассортированы по вязкости, включают их символы mAb, измеренные значения вязкости, рассчитанные значения  $rI$ , типы HC и LC и подтипы VL и VH (зародышевые типы). Подсемейства VK3|L16 и VK3|L6 с более

высокой вязкостью выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Остатки легкой цепи, которые стабильно отличаются у подсемейств VK3|L16 и VK3|L6 по сравнению с подсемейством VK3|A27, показаны на правой стороне. Остатки, коррелирующие с высокой вязкостью в подсемействах VK3|L16 и VK3|L6, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Последовательности VBase добавлены к подсемействам VK3|L16 и VK3|A27 зародышевого типа для сравнения, чтобы проиллюстрировать, что различные остатки являются типичными остатками для данных подсемейств.

[0052] На фигурах 13А и 13В показаны средние значения для измеренной вязкости и рассчитанные значения  $rI$  для интактных молекул антител, предусматривающих указанные семейства зародышевых линий тяжелых и легких цепей и подсемейства VH1, VH3 и VK3 зародышевых типов. Ось X включает семейства и количество членов в каждом семействе и подсемействе.

[0053] На фигуре 14А показано, что мутации на поверхности взаимодействия Fc-Fc могут обеспечивать снижение вязкости раствора. Показана зависимость вязкости от концентрации антитела АК и мутантов I253А и S440K антитела АК.

[0054] На фигуре 14В показано, что двойной мутант, у которого восстанавливается активность комплемента дикого типа, также восстанавливается вязкость дикого типа. На фигуре показана зависимость вязкости от концентрации антитела АК, мутанта I253А антитела АК, мутанта S440K антитела АК и двойного мутанта K439E/S440K антитела АК. На фигуре также показана вязкость мутанта K439E антитела АК, мутанта H433А антитела АК и мутанта N434А антитела АК, у которых не снижена вязкость относительно исходного антитела АК.

[0055] Фигура 15 представляет собой таблицу, на которой показаны абсолютные и относительные значения вязкости исходного антитела АК и различных мутантов. Исходное антитело АК и мутантов используют в исследованиях фармакокинетики и фармакодинамики антител АК и мутантов, характеризующихся низкой вязкостью, на приматах, отличных от человека.

[0056] Фигура 16 представляет собой схему химического поперечного сшивания с помощью EDC (см. пример 2).

[0057] Фигура 17 представляет собой таблицу, на которой показаны вязкость белков, выбранных для мутаций Fc, с получением вариантов, характеризующихся более низкой вязкостью.

[0058] На фигуре 18 показано зависимое от концентрации образование олигомеров системы антител путем химического поперечного сшивания с помощью EDC антитела АН.

[0059] На фигуре 19А показано, что мутация S440K в области Fc обеспечивает снижение вязкости антитела АQ. (Следует обратить внимание, что концентрация мутанта в действительности составляет 150 мг/мл.) Фигура 19В представляет собой график рассеяния тех же данных с экспоненциальной аппроксимацией. Ромбы на фигуре 19В обозначают немодифицированное антитело АQ в указанных концентрациях, а квадрат отмечает мутант S440K при 150 мг/мл.

[0060] Фигура 20А представляет собой таблицу, на которой показаны полученные и охарактеризованные мутанты антитела АQ, включая измеренную концентрацию и вязкость.

[0061] На фигуре 20В показан ответ cAMP клеток 293/huGIPR, экспрессирующих рецепторы GIP человека, активированных GIP и заблокированных антителами к GIPR. На активность cAMP *in vitro* мутации вязкости одинаково не влияли. Активность оставалась неизменной в пределах погрешности анализа.

[0062] На фигуре 21 показано краткое изложение экспериментальной схемы для фармакокинетического исследования однократной дозы подкожного болюса на самцах яванских макаков, как более подробно описано в рабочем примере ниже.

[0063] На фигуре 22 показаны средние оценки фармакокинетических параметров антитела АК или мутантных гомологов с низкой вязкостью после подкожного введения 10 мг/кг самцам яванских макаков (N=4 самца). Введение мутации в область Fc, которая обеспечивает снижение вязкости, уменьшает T<sub>max</sub> и увеличивает C<sub>max</sub>.

[0064] На фигуре 23 показан процент LDL-C по сравнению с предварительным тестированием (день CLAB). \* Процентное изменение выражено как значение для отдельного животного после введения дозы, деленное на значение при предварительном тестировании в день 1. Все четыре антитела (исходное антитело

АК, Fc-мутант АК, Fab-мутант АК и двойной Fc/Fab-мутант АК) индуцируют снижение уровня LDL-C.

[0065] На фигурах 24А и 24В показан фармакокинетический профиль (мкг/мл) с соответствующим профилем концентрации (мг/дл) липопротеинов низкой плотности (LDL) в плазме. Концентрации LDL и концентрации тестируемого объекта в сыворотке представлены в виде средних значений для четырех животных. Закрашенные кружки со сплошной линией указывают концентрации в сыворотке исходного антитела АК. Незакрашенные квадраты с пунктирной линией указывают концентрации в сыворотке антитела, несущего мутацию Fab. Закрашенные треугольники со сплошной линией указывают концентрации в сыворотке антитела, несущего мутацию Fc. Незакрашенные ромбы с пунктирной линией указывают концентрации в сыворотке антитела, одновременно несущего мутации Fab и Fc. Эти данные указывают на то, что присутствие мутации в области Fc, которая обеспечивает снижение вязкости состава антитела, приводит к уменьшению времени для достижения T<sub>max</sub> и к более высокой C<sub>max</sub>. Все мутантные формы исходного антитела сохраняют способность обеспечивать снижение уровня LDL-C в сыворотке (нижняя панель).

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **Определение терминов**

[0066] В последующем описании широко используется ряд терминов. Для облегчения понимания изобретения приведены следующие определения.

[0067] Если в тексте прямо не указано обратное, то форма единственного числа и выражение "по меньшей мере один" используются взаимозаменяемым образом и означают один или больше чем один.

[0068] Выражение "антигенсвязывающий белок" относится к белку или полипептиду, который содержит антигенсвязывающую область или антигенсвязывающую часть, которая характеризуется сильным сродством к другой молекуле, с которой он связывается (антиген). Антигенсвязывающие белки охватывают антитела, пептитела, фрагменты антител (например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, однодоменное антитело), производные антител, аналоги антител,

слитые белки и антигенные рецепторы, включая химерные антигенные рецепторы (CAR).

[0069] "Антитела" (Ab) и "иммуноглобулины" (Ig) представляют собой гликопротеины с одинаковыми структурными характеристиками. Хотя антитела проявляют специфичность связывания с конкретным антигеном, иммуноглобулины включают как антитела, так и другие антителоподобные молекулы, которые не обладают антигенной специфичностью. Полипептиды последнего типа, например, вырабатываются при низких уровнях лимфатической системой и при повышенных уровнях при миеломе. Таким образом, используемый в данном документе термин "антитело" или "пептид(ы) антитела" относится к интактному антителу, антителу, которое конкурирует за специфическое связывание с антителом, раскрытым в данном описании, или его антигенсвязывающему фрагменту (например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, однодоменному антителу), которое конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание и включает в себя химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты получают, например, с помощью методик рекомбинантной ДНК. В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты получают путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антигенсвязывающие фрагменты включают без ограничения Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fv и одноцепочечные антитела. Примеры антител, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения антитела, перечисленные на фигурах 1A и 1B, а также абаговомаб, абциксимаб, актоксумаб, адалимумаб, афелимомаб, афутузумаб, алацизумаб, алацизумаб пегол, ALD518, алемтузумаб, алирокумаб, алемтузумаб, алтумомаб, аматуксимаб, анатумомаб мафенатокс, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумомаб, азелизумаб, алтинумаб, атлизумаб, аторолимиумаб, тоцилизумаб, бапинеизумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, базилесомаб, бевацизумаб, безлотоксумаб, бициромаб, биватузумаб, биватузумаб мертанзин, блинатумомаб, блосозумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб,

канакинумаб, кантузумаб мертанзин, кантузумаб мертанзин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, катумаксумаб, СС49, цеделизумаб, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, конатумумаб, кренезумаб, СR6261, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, даратумумаб, демцизумаб, деносумаб, детумомаб, дорлимомаб аритокс, дроцитумаб, дулиготумаб, дупилумаб, экроексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элотузумаб, элсилимомаб, энаватузумаб, энлимомаб пегол, энокизумаб, энокизумаб, энотикумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эренумаб, эрлизумаб, эртумаксумаб, этарацизумаб, этролизумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, эксбивирумаб, фанолесумаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фланвотумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форапирумаб, фресолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантинерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, голимумаб, гомиликсимаб, GS6624, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, иговомаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтанзин, инфликсимаб, интетумумаб, инолимомаб, инотузумаб озогамидин, ипилимумаб, иратумумаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, лебрикизумаб, лемалезомаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лигелизумаб, линтузумаб, лирилумаб, лорвотузумаб мертанзин, лукатумумаб, люмиликсимаб, мапатумумаб, маслимомаб, маврилимумаб, матузумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, митумомаб, могамулизумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, онартузумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панитумумаб, панобакумаб,

парсатузумаб, пасколизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинтумомаб, плакулумаб, понезумаб, презалумаб, приликсимаб, притумумаб, PRO 140, квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, самализумаб, сарилумаб, сатумомаб пандетид, секукинумаб, севирумаб, сибротузумаб, сифалимумаб, сильтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тезепелумаб, TGN1412, тремелимумаб, тицилимумаб, тилдракизумаб, тигатузумаб, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тозитумомаб, тралокинумаб, трастузумаб, TRBS07, трегализумаб, тремелимумаб, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, ублитуксимаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вапаликсимаб, вателизумаб, ведолизумаб, вельтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, визилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб и золимомаб аритокс.

**[0070]** Используемый в данном документе термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое было идентифицировано, отделено и/или выделено из компонента его природной среды. Загрязняющими компонентами его природной среды являются материалы, которые будут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до более чем 95% по весу антитела, как определено по способу Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся

стаканом, или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE при восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением окрашивания кумасси синим или, предпочтительно, серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не будет присутствовать. Обычно, однако, выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

[0071] Термин "связывать (связывание)" антигена или другого полипептида включает без ограничения связывание полипептида лиганда по настоящему изобретению с рецептором; связывание рецепторного полипептида по настоящему изобретению с лигандом; связывание антитела по настоящему изобретению с антигеном или эпитопом; связывание антигена или эпитопа по настоящему изобретению с антителом; связывание антитела по настоящему изобретению с антиидиотипическим антителом; связывание антиидиотипического антитела по настоящему изобретению с лигандом; связывание антиидиотипического антитела по настоящему изобретению с рецептором; связывание антитела против антиидиотипического антитела по настоящему изобретению с лигандом, рецептором или антителом и т. д.

[0072] Термин "иммуноглобулин" относится к белку, состоящему из одного или нескольких полипептидов, по существу кодируемых генами иммуноглобулина. Одна из форм иммуноглобулина составляет основную структурную единицу антитела. Эта форма представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая из которых содержит одну легкую и одну тяжелую цепь. В каждой паре переменные области легкой и тяжелой цепей совместно ответственны за связывание с антигеном, а константные области ответственны за эффекторные функции антитела.

[0073] Полноразмерные "легкие цепи" иммуноглобулина (приблизительно 25 кДа или приблизительно 214 аминокислот) кодируются геном переменной области на NH<sub>2</sub>-конце (приблизительно 110 аминокислот) и геном константной области каппа или лямбда на COOH-конце. Полноразмерные "тяжелые цепи"

иммуноглобулина (приблизительно 50 кДа или приблизительно 446 аминокислот) аналогичным образом кодируются геном вариабельной области (приблизительно 116 аминокислот) и одним из других вышеупомянутых генов константной области (приблизительно 330 аминокислот). Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон и определяют изотип антитела как IgG (такой как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные области соединены участком "J" размером приблизительно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит участок "D", состоящий из приблизительно 10 или более аминокислот. (См. в общих чертах Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd Edition, Raven Press, NY (1989)), Chapter 7 (включено посредством ссылки во всей полноте для всех целей).

[0074] Вариабельный домен или область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина содержит "каркасные области" (FR), прерываемые "участками, определяющими комплементарность" (CDR). Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Chothia et al. (1987), J. Mol. Biol. 196: 901-917 (обе из которых включены в данный документ посредством ссылки). Остатки FR представляют собой те остатки вариабельного домена, которые не являются остатками области CDR, определенными в данном документе. Последовательности каркасных областей различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны внутри вида. Таким образом, "каркасная область человека" представляет собой каркасную область, которая по существу идентична (на приблизительно 85% или больше, обычно на 90-95% или больше) каркасной области встречающегося в природе иммуноглобулина человека. Каркасная область антитела, то есть комбинированные каркасные области, входящие в состав легкой и тяжелой цепей, служит для позиционирования и выравнивания CDR. В первую очередь CDR ответственны за связывание с эпитопом антигена. Соответственно, термин "гуманизированный" иммуноглобулин относится к иммуноглобулину, содержащему каркасную область

человека и один или несколько CDR иммуноглобулина, отличного от человеческого (обычно мыши или крысы). Иммуноглобулин, отличный от человеческого, обеспечивающий CDR, называется "донором", а иммуноглобулин человека, обеспечивающий каркас, называется "акцептором". Константные области не обязательно должны присутствовать, но если они есть, они должны быть по существу идентичны константным областям иммуноглобулина человека, то есть идентичны на по меньшей мере приблизительно 85-90%, предпочтительно приблизительно 95% или больше. Следовательно, все части гуманизированного иммуноглобулина, за исключением, возможно, CDR, по существу идентичны соответствующим частям последовательностей природного иммуноглобулина человека. Кроме того, один или несколько остатков в каркасной области человека могут быть обратно мутированы в исходную последовательность для сохранения оптимальной антигенсвязывающей аффинности и специфичности. Таким образом, определенные каркасные остатки из исходных отличных от человеческих антител сохраняют в гуманизированном антителе, чтобы сохранить связывающие свойства исходного антитела при сведении к минимуму его иммуногенности. Используемый в данном документе термин "каркасная область человека" включает области с такими обратными мутациями. "Гуманизированное антитело" представляет собой антитело, содержащее гуманизированную легкую цепь и гуманизированную тяжелую цепь иммуноглобулина. Например, гуманизированное антитело не будет включать типичное химерное антитело, как определено ниже, например, поскольку вся переменная область химерного антитела отлична от человеческой.

[0075] Моноклональные антитела и конструкции антител по настоящему изобретению конкретно включают в себя "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от определенного вида, или принадлежит к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида, или относится к другому классу или

подклассу антител, а также фрагменты таких антител до тех пор, пока они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison *et al.* (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855). Представляющие интерес химерные антитела в данном документе включают "примитивизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменного домена, полученные от приматов, отличных от человека (например, мартышковые, человекообразные обезьяны и т. д.), и последовательности константных областей человека. Было описано множество подходов для создания химерных антител. См., например, Morrison *et al.* (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851; Takeda *et al.* (1985), Nature 314:452, Cabilly *et al.*, патент США № 4816567; Boss *et al.*, патент США № 4816397; Tanaguchi *et al.*, EP 0171496; EP 0173494 и GB 2177096.

[0076] Каждый из терминов "человеческое антитело" и "полностью человеческое антитело" относятся к антителу, которое имеет аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, включая антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или у животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины; например, антитела Xenomouse® и антитела, описанные Kucherlapati *et al.* в патенте США № 5939598.

[0077] Термин "генетически модифицированные антитела" означает антитела, в которых аминокислотная последовательность была изменена относительно аминокислотной последовательности нативного антитела. Из-за востребованности методик рекомбинантной ДНК при создании антител не следует ограничиваться аминокислотными последовательностями, обнаруженными в природных антителах; поскольку антитела можно реконструировать с получением желаемых характеристик. Возможных вариаций множество, и они варьируются от изменений одной или нескольких аминокислот до полной реконструкции, например, переменной и/или константной области. Изменения константной области, как правило, будут осуществляться с целью улучшения или

изменения характеристик, таких как фиксация комплемента, взаимодействие с мембранами и другие эффекторные функции, а также технологичность и вязкость. Изменения вариабельной области будут осуществляться с целью улучшения характеристик связывания с антигеном.

[0078] "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи и  $C_{H1}$  и вариабельных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

[0079] "Fab'-фрагмент" содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь, которая содержит больше константной области между доменами  $C_{H1}$  и  $C_{H2}$ , так что между двумя тяжелыми цепями может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы  $F(ab')_2$ .

[0080] " $F(ab')_2$ -фрагмент" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами  $C_{H1}$  и  $C_{H2}$ , так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь.

[0081] Термины "Fv-фрагмент" и "одноцепочечное антитело" относятся к полипептидам, содержащим вариабельные области антитела как из тяжелой, так и из легкой цепей, но в которых отсутствуют константные области. Как и целое антитело, оно способно селективно связываться со специфическим антигеном. При молекулярной массе только приблизительно 25 кДа Fv-фрагменты намного меньше обычных антител (150-160 кДа), которые состоят из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньше, чем Fab-фрагменты (приблизительно 50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи).

[0082] "Однодоменное антитело" представляет собой фрагмент антитела, состоящий из Fv-звена с одним доменом, например,  $V_H$  или  $V_L$ . Как и целое антитело, оно способно селективно связываться со специфическим антигеном. При молекулярной массе всего лишь 12-15 кДа однодоменные антитела намного меньше обычных антител (150-160 кДа), которые состоят из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньше, чем Fab-фрагменты (приблизительно 50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и

одноцепочечные переменные фрагменты (приблизительно 25 кДа, два переменных домена, один из легкой и один из тяжелой цепи). Первые однодоменные антитела были сконструированы из антител, содержащих только тяжелые цепи, которые обнаружены у верблюдовых. Хотя большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основано на переменных доменах тяжелой цепи, также показано, что переменные домены легкой цепи и наночастицы, полученные из легких цепей, специфически связываются с целевыми эпитопами.

**[0083]** Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью технологии гибридом. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не к способу его получения.

**[0084]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению селективно подавляет человеческий антиген для антитела, из которого он получен. Например, антигенсвязывающий белок, имеющий последовательность антитела АГ, замещенную, как описано в данном документе, будет селективно подавлять антиген на фигуре 1В для антитела АГ. Антитело или его функциональный фрагмент "селективно подавляет" конкретный рецептор или лиганд по сравнению с другими рецепторами или лигандами, когда IC50 антитела в анализе подавления специфического рецептора в по меньшей мере 50 раз ниже, чем IC50 в анализе подавления другого "эталонного" лиганда или рецептора. "IC50" представляет собой дозу/концентрацию, необходимую для достижения 50% подавления биологической или биохимической функции. В случае радиоактивных лигандов IC50 представляет собой концентрацию конкурирующего лиганда, который вытесняет 50% специфического связывания радиоактивного лиганда. IC50 любого конкретного вещества или антагониста можно определить, построив кривую дозы-ответа и исследуя влияние различных концентраций лекарственного средства или антагониста в отношении обратимой активности агониста в конкретном функциональном анализе. Значения IC50 могут быть

вычислены для данного антагониста или лекарственного средства путем определения концентрации, необходимой для подавления половины максимального биологического ответа агониста. Таким образом, значение IC50 для любого антитела против PCSK9 или его функционального фрагмента, например, можно рассчитать путем определения концентрации антитела или фрагмента, необходимой для подавления половины максимального биологического ответа PCSK9 при активации рецептора PCSK9 человека в любом функциональном анализе. Под антителом или его функциональным фрагментом, который селективно подавляет конкретный лиганд или рецептор, подразумевается нейтрализующее антитело или нейтрализующий фрагмент относительно этого лиганда или рецептора. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 или его функциональный фрагмент представляют собой нейтрализующее антитело или фрагмент в отношении PCSK9 человека.

[0085] Замещенные антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут перекрестно блокировать незамещенные антитела, из которых они получены. Термины "перекрестное блокирование", "перекрестно блокированный" и "перекрестно блокирующий" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения способности антигенсвязывающего белка препятствовать связыванию других антигенсвязывающих белков (например, антител или связывающих фрагментов) с мишенью (например, PCSK9 человека). Степень, с которой антитело или связывающий фрагмент способны мешать связыванию другого антитела с мишенью и, следовательно, можно ли сказать, что оно перекрестно блокирует, можно определить с применением анализов конкурентного связывания. В некоторых вариантах осуществления перекрестно блокирующий антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению снижает связывание эталонного антитела с антигеном-мишенью на приблизительно 40%-100%, например, от приблизительно 60% до приблизительно 100%, особенно предпочтительно на приблизительно 70%-100% и более конкретно предпочтительно на приблизительно 80%-100%. В особенно подходящем количественном анализе для обнаружения перекрестного блокирования применяют аппарат Viacore, который измеряет степень взаимодействия с применением

технологии поверхностного плазмонного резонанса. В другом подходящем количественном анализе перекрестного блокирования применяют основанный на FACS подход для измерения конкуренции между антителами с точки зрения их связывания с антиген-мишенью.

[0086] Термин "нуклеиновая кислота" или "молекула нуклеиновой кислоты" относится к полинуклеотидам, таким как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК), олигонуклеотидам, фрагментам, полученным в полимеразной цепной реакции (ПЦР), и фрагментам, полученным с помощью любого из лигирования, расщепления, воздействия эндонуклеазы и воздействия экзонуклеазы. Молекулы нуклеиновых кислот могут состоять из мономеров, которые являются встречающимися в природе нуклеотидами (такие как ДНК и РНК) или аналогами встречающихся в природе нуклеотидов (например,  $\alpha$ -энантиомерные формы природных нуклеотидов), или комбинацией обоих. Модифицированные нуклеотиды могут содержать модификации во фрагментах сахаров и/или во фрагментах пиримидиновых или пуриновых оснований. Модификации сахаров включают, например, замену одной или нескольких гидроксильных групп галогенами, алкильными группами, аминами и азидогруппами, или сахара могут быть функционализированы с образованием простых эфиров или сложных эфиров. Более того, весь фрагмент сахара может быть заменен стереически и с электронной точки зрения подобными структурами, такими как азасахара и карбоциклические аналоги сахаров. Примеры модификаций во фрагменте основания включают алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины или другие хорошо известные гетероциклические заместители. Молекулы нуклеиновых кислот могут быть соединены фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают фосфотриат, фосфородитриат, фосфороселенат, фосфородиселенат, фосфороанилотриат, фосфоранилидат, фосфорамидат и тому подобное. Термин "молекула нуклеиновой кислоты" также включает в себя так называемые "пептидные нуклеиновые кислоты", которые содержат встречающиеся в природе или модифицированные основания

нуклеиновых кислот, присоединенные к полиамидному остову. Нуклеиновые кислоты могут быть либо однонитевыми, либо двухнитевыми.

**[0087]** Термин "молекула, комплементарная молекуле нуклеиновой кислоты" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, имеющей комплементарную нуклеотидную последовательность и обратную ориентацию по сравнению с эталонной нуклеотидной последовательностью.

**[0088]** Термин "вырожденная нуклеотидная последовательность" обозначает последовательность нуклеотидов, которая содержит один или несколько вырожденных кодонов по сравнению с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Вырожденные кодоны содержат другие триплеты нуклеотидов, но кодируют один и тот же аминокислотный остаток (т.е. каждый из триплетов GAU и GAC кодирует Asp).

**[0089]** "Выделенная молекула нуклеиновой кислоты" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая не интегрирована в геномную ДНК организма. Например, молекула ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела, которая была отделена от геномной ДНК клетки, представляет собой выделенную молекулу ДНК. Другим примером выделенной молекулы нуклеиновой кислоты является химически синтезированная молекула нуклеиновой кислоты, которая не интегрирована в геном организма. Молекула нуклеиновой кислоты, которая была выделена из определенного вида, меньше, чем полная молекула ДНК хромосомы из этого вида.

**[0090]** "Конструкция молекулы нуклеиновой кислоты" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, однонитевую или двухнитевую, которая была модифицирована посредством вмешательства человека с содержанием сегментов нуклеиновой кислоты, объединенных и расположенных рядом в порядке, не существующем в природе.

**[0091]** "Комплементарная ДНК (сDNA)" представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК, которая образована из матрицы mRNA ферментом обратной транскриптазой. Как правило, для иницирования обратной транскрипции применяют праймер, комплементарный частям mRNA. Специалисты в данной области

дополнительно используют термин "сDNA" для обозначения двухнитевой молекулы ДНК, состоящей из такой однонитевой молекулы ДНК и комплементарной ей нити ДНК. Кроме того, термин "сDNA" относится к клону молекулы сDNA, синтезированному с матрицы РНК.

[0092] "Промотор" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая направляет транскрипцию структурного гена. Как правило, промотор расположен в 5'-некодирующей области гена, проксимальной относительно участка старта транскрипции структурного гена. Элементы последовательности внутри промоторов, которые функционируют при иницировании транскрипции, часто характеризуются консенсусными последовательностями нуклеотидов. Эти промоторные элементы включают участки связывания РНК-полимеразы, последовательности TATA, последовательности CAAT, специфические в отношении дифференцировки элементы (DSE; McGehee *et al.* (1993), Mol. Endocrinol., 7:551), элементы ответа циклического АМФ (CRE), элементы сывороточного ответа (SRE; Treisman (1990), Seminars in Cancer Biol., 1:47), элементы ответа глюкокортикоидов (GRE) и участки связывания других транскрипционных факторов, таких как CRE/ATF (O'Reilly *et al.* (1992), J. Biol. Chem., 267:19938), AP2 (Ye *et al.* (1994), J. Biol. Chem., 269:25728), SP1, связывающий белок элемента ответа сАМР (CREB; Loeken (1993), Gene Expr., 3:253) и октамерные факторы (см. в общих чертах Watson *et al.* (1987), eds., Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., и Lemaigre *et al.* (1994), Biochem. J., 303:1). Если промотор является индуцибельным промотором, то скорость транскрипции возрастает в ответ на индуцирующее средство. Напротив, скорость транскрипции не регулируется индуцирующим агентом, если промотор является конститутивным промотором. Известны также репресслируемые промоторы.

[0093] "Регуляторный элемент" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая модулирует активность основного промотора. Например, регуляторный элемент может содержать нуклеотидную последовательность, которая связывается с

клеточными факторами, обеспечивающими транскрипцию исключительно или преимущественно в определенных клетках, тканях или органеллах. Эти типы регуляторных элементов обычно связаны с генами, которые экспрессируются "клеточноспецифическим", "тканеспецифическим" или "органеллоспецифическим" образом.

[0094] "Энхансер" представляет собой тип регуляторного элемента, который может повысить эффективность транскрипции, независимо от расстояния или ориентации энхансера относительно участка начала транскрипции.

[0095] "Гетерологичная ДНК" относится к молекуле ДНК или популяции молекул ДНК, которая от природы не существует в данной клетке-хозяине. Молекулы ДНК, гетерологичные в отношении конкретной клетки-хозяина, могут содержать ДНК, полученную из вида клетки-хозяина (т.е. эндогенную ДНК), до тех пор, пока такая ДНК хозяина сочетается с ДНК, не относящейся к хозяину (т.е. экзогенной ДНК). Например, молекула ДНК, содержащая сегмент ДНК, не относящейся к хозяину, который кодирует полипептид, функционально связанный с сегментом ДНК хозяина, содержащим транскрипционный промотор, считается гетерологичной молекулой ДНК. И наоборот, гетерологичная молекула ДНК может содержать эндогенный ген, функционально связанный с экзогенным промотором. В качестве еще одной иллюстрации молекула ДНК, содержащая ген, полученный из клетки дикого типа, считается гетерологичной ДНК, если указанную молекулу ДНК вводят в мутантную клетку, в которой отсутствует ген дикого типа.

[0096] "Вектор экспрессии" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую ген, который экспрессируется в клетке-хозяине. Обычно вектор экспрессии содержит промотор транскрипции, ген и терминатор транскрипции. Экспрессия гена обычно осуществляется под контролем промотора, и такой ген называется "функционально связанным с" промотором. Подобным образом, регуляторный элемент и основной промотор функционально связаны, если регуляторный элемент модулирует активность основного промотора.

[0097] "Рекомбинантный хозяин" представляет собой клетку, которая содержит молекулу гетерологичной нуклеиновой кислоты,

такую как вектор клонирования или вектор экспрессии. В данном контексте примером рекомбинантного хозяина является клетка, которая продуцирует антагонист по настоящему изобретению из вектора экспрессии. Напротив, такой антагонист может быть продуцирован клеткой, которая является "природным источником" указанного антагониста и которая не содержит вектора экспрессии.

[0098] Термины "аминоконцевой" и "карбоксиконцевой" используются в данном документе для обозначения положений внутри полипептидов. Если контекст позволяет, эти термины используются со ссылкой на конкретную последовательность или часть полипептида для обозначения близости или относительного положения. Например, определенная последовательность, размещенная в направлении карбоксиконца относительно эталонной последовательности внутри полипептида, расположена ближе к карбоксильному концу эталонной последовательности, но необязательно находится на карбоксильном конце полноразмерного полипептида.

[0099] "Слитый белок" представляет собой гибридный белок, экспрессируемый молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидные последовательности из по меньшей мере двух генов. Например, слитый белок может содержать по меньшей мере часть тяжелой цепи антитела, слитую с полипептидом, который связывает аффинную матрицу или другую представляющую интерес мишень.

[00100] Термин "рецептор" обозначает связанный с клеткой белок, который связывается с биоактивной молекулой, называемой "лигандом". Это взаимодействие опосредует влияние лиганда на клетку. Рецепторы могут быть мембраносвязанными, цитозольными или ядерными; мономерными (например, рецептор тиреотропного гормона, бета-адренергический рецептор) или мультимерными (например, рецептор PDGF, рецептор гормона роста, рецептор IL-3, рецептор GM-CSF, рецептор G-CSF, рецептор эритропоэтина и рецептор IL-6). Мембраносвязанные рецепторы характеризуются многодоменной структурой, включающей внеклеточный лигандсвязывающий домен и внутриклеточный эффекторный домен, который обычно участвует в передаче сигнала. В определенных мембраносвязанных рецепторах внеклеточный лигандсвязывающий

домен и внутриклеточный эффекторный домен расположены в отдельных полипептидах, которые составляют полнофункциональный рецептор. В общем, связывание лиганда с рецептором приводит к конформационному изменению рецептора, которое вызывает взаимодействие между эффекторным доменом и другой (-ими) молекулой (-ами) в клетке, что, в свою очередь, приводит к изменению метаболизма клетки. Метаболические события, которые часто связаны с взаимодействиями рецептор-лиганд, включают транскрипцию генов, фосфорилирование, дефосфорилирование, увеличение продукции циклического АМФ, мобилизацию клеточного кальция, мобилизацию липидов мембран, клеточную адгезию, гидролиз инозитсодержащих липидов и гидролиз фосфолипидов.

**[00101]** Термин "экспрессия" относится к биосинтезу генного продукта. Например, в случае структурного гена экспрессия включает транскрипцию структурного гена с получением mRNA и трансляцию mRNA с получением одного или нескольких полипептидов.

**[00102]** Термин "пара комплементарный/антикомплеметарный" обозначает неидентичные фрагменты, которые в соответствующих условиях образуют нековалентно соединенную устойчивую пару. Например, биотин и авидин (или стрептавидин) являются прототипическими членами пары комплементарный/антикомплеметарный. Другие типичные пары комплементарный/антикомплеметарный включают пары рецептор/лиганд, пары антитело/антиген (или гаптен или эпитоп), пары смысловой/антисмысловой полинуклеотид и тому подобное. Когда желательна последующая диссоциация пары комплементарный/антикомплеметарный, пара комплементарный/антикомплеметарный предпочтительно характеризуется аффинностью связывания менее чем  $10^9 \text{ M}^{-1}$ .

**[00103]** "Выявляемая метка" представляет собой молекулу или атом, которые могут быть конъюгированы с фрагментом антитела для получения молекулы, пригодной для диагностики. Примеры выявляемых меток включают хелаторы, фотоактивные средства, радиоизотопы, флуоресцентные средства, парамагнитные ионы или другие маркерные фрагменты.

**[00104]** Термин "аффинная метка" используется в данном

документе для обозначения сегмента полипептида, который может быть присоединен ко второму полипептиду, чтобы обеспечить очистку или выявление второго полипептида или предоставить участки для присоединения второго полипептида к субстрату. В принципе, любой пептид или белок, для которого доступно антитело или другое специфическое связывающее средство, можно применять в качестве аффинной метки. Аффинные метки включают полигистидиновый участок, белок А (Nilsson *et al.* (1985), *EMBO J.* 4:1075; Nilsson *et al.* (1991), *Methods Enzymol.*, 198:3), глутатион-S-трансферазу (Smith *et al.* (1988), *Gene*, 67:31), аффинную метку Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.* (1985)., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952), субстанцию Р, пептид FLAG® (Hopp *et al.* (1988), *Biotechnology* 6:1204), стрептавидинсвязывающий пептид или другой антигенный эпитоп или связывающий домен. См. в общих чертах Ford *et al.* (1991), *Protein Expression and Purification*, 2:95. Молекулы ДНК, кодирующие аффинные метки, доступны от коммерческих поставщиков (например, Pharmacia Biotech, Пискатауэй, Нью-Джерси).

**[00105]** Термины "кислотный остаток" и "отрицательно заряженный остаток" относятся к аминокислотным остаткам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие кислотные группы. Иллюстративные кислотные или отрицательно заряженные остатки включают D и E.

**[00106]** Термин "амидный остаток" относится к аминокислотам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие амидные производные кислотных групп. Иллюстративные амидные остатки включают N и Q.

**[00107]** Термин "ароматический остаток" относится к аминокислотным остаткам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие ароматические группы. Иллюстративные ароматические остатки включают F, Y и W.

**[00108]** Термины "основной остаток" и "положительно заряженный остаток" относятся к аминокислотным остаткам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие основные группы. Иллюстративные основные или положительно заряженные остатки

включают H, K и R.

[00109] Термины "гидрофильный остаток" и "полярный незаряженный остаток" относятся к аминокислотным остаткам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие полярные группы. Иллюстративные гидрофильные или полярные незаряженные остатки включают C, S, T, N и Q.

[00110] Термины "нефункциональный остаток" и "малый гидрофобный остаток" относятся к аминокислотным остаткам, характеризующимся боковыми цепями, в которых отсутствуют кислотные, основные или ароматические группы. Иллюстративные нефункциональные малые гидрофобные остатки включают M, G, A, V, I, L и норлейцин (Nle).

[00111] Один аспект настоящего изобретения касается PCSK9-связывающих полипептидов. "PCSK9-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ПОЛИПЕПТИД" означает полипептид, который связывает белок пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9). В некоторых случаях PCSK9-связывающий полипептид блокирует связывание PCSK9 с рецепторами липидов низкой плотности (LDLR). Такие блокирующие PCSK9-связывающие полипептиды могут представлять собой моноклональные антитела (mAb) и могут представлять собой одно из следующего:

a. mAb, содержащее полипептид тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 136, и полипептид легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 134 (антитело АК, эволюкумаб), или его антигенсвязывающий фрагмент;

b. mAb, которое конкурирует с эволюкумабом за связывание с PCSK9;

c. mAb, содержащее:

i. полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность участки (CDR): CDR1 тяжелой цепи, который представляет собой CDR1 из SEQ ID NO: 376 или 378; CDR2 тяжелой цепи, который представляет собой CDR2 из SEQ ID NO: 376 или 378; CDR3 тяжелой цепи, который представляет собой CDR3 из SEQ ID NO: 376 или 378, и

ii. полипептид легкой цепи, содержащий следующие CDR: CDR1

легкой цепи, который представляет собой CDR1 из SEQ ID NO: 377 или 379; CDR2 легкой цепи, который представляет собой CDR2 из SEQ ID NO: 377 или 379; и CDR3 легкой цепи, который представляет собой CDR3 из SEQ ID NO: 377 или 379;

d. mAb, которое связывается с по меньшей мере одним из следующих остатков PCSK9, при этом PCSK9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 369: S153, D188, I189, Q190, S191, D192, R194, E197, G198, R199, V200, D224, R237 и D238, K243, S373, D374, S376, T377, F379, I154, T1897, H193, E195, I196, M201, V202, C223, T228, S235, G236, A239, G244, M247, I369, S372, C375, C378, R237 и D238;

e. mAb, которое связывается с PCSK9 по эпитопу на PCSK9, который перекрывается с эпитопом, связанным антителом, которое содержит:

i. переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 136, и

ii. переменную область легкой цепи, характеризующуюся аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 134, и

iii. где эпитоп для mAb дополнительно перекрывается с участком, с которым связывается домен подобного эпидермальному фактору роста повтора А (EGF-A) белка рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) (Horton, Cohen, & Hobbs (2007), Trends Biochem Sci, 32(2), 71-77. doi: 10.1016/j.tibs.2006.12.008; Seidah & Prat (2007), J Mol Med (Berl), 85(7), 685-696;

f. mAb, которое содержит полипептид тяжелой цепи, содержащий следующие определяющие комплементарность участки (CDR):

i. CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 373, 374 и 375, соответственно; и

ii. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 369, 370 и 371, соответственно; или

g. mAb, которое содержит последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 378 и последовательность переменной области легкой цепи под SEQ ID NO: 379.

### Предпочтительные варианты осуществления

Корреляция общих характеристик последовательности с вязкостью

[00112] Основная цель исследования, о котором сообщается в примере 1 данного описания, состояла в том, чтобы идентифицировать связь между вязкостью и аминокислотной последовательностью или общими характеристиками последовательности моноклональных антител IgG с целью снижения вязкости высококонцентрированных составов на основе моноклональных антител. Для этого значения вязкости 43 различных моноклональных антител измеряли при концентрации 150 мг/мл с получением широкого диапазона значений от 5 до 33 сП (фигуры 1А и 1В). Основные общие характеристики последовательностей моноклональных антител, такие как типы легких и тяжелых цепей, их подтипы (зародышевые линии) и рI, рассчитывали и сопоставляли с вязкостью, но не сразу выявили значимые корреляции (фигуры 1А и 1В). Полиморфизмы (известные как аллотипы) в изотипах IgG были описаны с применением серологических реагентов, полученных от человека (Ropartz, C., Schanfield, M. S., and Steinberg, A. G. (1976), "Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins", WHO meeting on human immunoglobulin allotypic markers, held 16-19 July 1974, Rouen, France; report amended June 1976, *J Immunogenet.* 3, 357-362), и коррелируют с определенными аминокислотными остатками в нескольких конкретных положениях в консервативных областях тяжелых и легких цепей (Jefferis and Lefranc (2009) Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity, *mAbs* 1, 332-338.) (Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, *Front Immunol.* 5, 1-17). В аллотипах введены несколько различных остатков (описанных ниже) в консервативные в других отношениях области легких и тяжелых цепей. Все легкие цепи каппа, применяемые в данном исследовании, имели одинаковый (3) аллотип (отличающийся остатками A153, V191 согласно нумерации EU). Все тяжелые цепи IgG2 имели одинаковый (n-) аллотип (отличающийся P189). Было описано четыре аллотипа

тяжелой цепи IgG1 (включая следующие родственные остатки согласно нумерации EU): *f* (R214); *z* (K214); *a* (D356, L358) и *x* (G431) (Jefferis & Lefranc, 2009) (Vidarsson *et al.*, 2014). Тяжелые цепи IgG1 с альтернативными остатками в положениях E356, M358 и A431 не составляют аллотипы, поскольку эти аминокислотные остатки присутствуют в других подклассах IgG. Аллотип IgG1 (*x*) не был представлен в исследовании; все тяжелые цепи IgG1 имели A431. Аллотипы тяжелой цепи IgG1 (*f*), (*z*), (*a*) и родственные остатки показаны на фигурах 1А и 1В.

**[00113]** Антитела на фигурах 1А и 1В рассортированы по вязкости. Таблица на фигурах 1А и 1В включает название моноклонального антитела, измеренные концентрации, измеренные значения вязкости и общие параметры последовательности, включая тип, подтип и рассчитанный  $\rho I$ . Тип IgG1, легкие цепи лямбда и подтип VH1 тяжелой цепи выделены жирным шрифтом.

**[00114]** Тяжелые цепи IgG1 и IgG2 и легкие цепи каппа и лямбда были довольно равномерно распределены по диапазону вязкости. Последовательная оценка подтипов выявила несколько пар подтипов, характеризующихся высокой вязкостью и низкой вязкостью: VH1|1-18 и VH1|1-02; VH3|3-33 и VH3|3-07 VK3|L16 и VK3|A27, с вероятностью случайной корреляции 0,0002; 0,076 и 0,031 соответственно, коррелирующие с остатками вязкости (фигура 2). В исследовании искали корреляции вязкости с последовательностями областей D и J, но не обнаружили значимой корреляции.

**[00115]** На фигуре 2 показаны значения  $\rho$ , которые указывают на вероятность случайной корреляции с вязкостью. На фигуре 2 также показаны остатки в подтипе с высокой вязкостью, положения в нумерации Aho и остатки в подтипах, характеризующихся низкой вязкостью.

**[00116]** Среди четырнадцати молекул IgG подтипа VH1 высокая вязкость была тесно связана с подтипом VH1|1-18, а низкая вязкость – с подтипом VH1|1-01 с очень низкой вероятностью того, что это случайное совпадение (фигура 9).

**[00117]** Чтобы оценить корреляцию между двумя подтипами и вязкостью, была рассчитана вероятность среднего значения для

одной и той же популяции по критерию Стьюдента для VH1|1-02 по сравнению с VH1|1-18, VH3|3-33 по сравнению с VH3|3-07 и VK3|L16 по сравнению с VK3|A27 с применением t-критерия равных вариантов с двумя выборками с двусторонним распределением.

[00118] Обнаружили ассоциацию (t-критерий,  $p=0,031$ ) легкой цепи VK3|L16 с высокой вязкостью и VK3|A27 с низкой вязкостью (фигура 2, фигура 12, слева). VK3|L16 по сравнению с VK3|A27 и VH3|3-33 по сравнению с VH3|3-07 обсуждаются дополнительно в данном описании. Из-за сильной корреляции с вязкостью VH1|1-18 и VH1|1-02 дополнительно оценивали следующим образом. На следующем этапе последовательности цепей 43 антител выравнивали и оценивали следующим образом.

#### Выравнивание последовательностей и система нумерации

[00119] Существует несколько систем нумерации IgG, в том числе:

EU--Edelman et al. (1969), "The covalent structure of an entire gamma immunoglobulin molecule", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 63, 78-85;

Kabat--Kabat et al. (1991), Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242;

Chothia--Chothia et al. (1992), "Structural repertoire of the human VH segments", J.Mol.Biol. 227: 799-817; Tomlinson et al., (1995), "The structural repertoire of the human V kappa domain. EMBO J. 14: 4628-4638;

Aho--Hoenegger et al. (2001), "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J. Mol. Biol. 309, 657-670;

и другие. Все четыре системы нумерации, упомянутые выше, проиллюстрированы на фигуре 9 справа в отношении каркасной области 3 тяжелой цепи подтипа VH1. Схема Aho была построена с применением пространственных положений аминокислотных остатков, полученных из более чем 400 кристаллических структур переменных доменов различных антител. Систему нумерации Aho, определенную А. Hoenegger (цитата выше), применяли в этой работе, поскольку это система нумерации является основанной на 3D-

структуре. Это создает преимущество именно для остатков в CDR: остатки с одинаковыми номерами расположены в одинаковых пространственных областях и сопоставимы по разным последовательностям IgG. Поскольку положения остатков в схеме нумерации Aho связаны с третичной структурой, они должны быть более ассоциированы с биофизическими и биохимическими свойствами и, возможно, вязкостью. Нумерация Aho выровнена и коррелирует с другими основными схемами нумерации, показанными в нескольких таблицах данного описания. Любую из четырех систем нумерации можно взаимозаменяемо применять для идентификации предпочтительных аминокислотных замен. Варибельная область тяжелой цепи заканчивается следующими остатками для различных систем нумерации: 149 Aho, 117 EU, 113 Kabat, 113 Chothia. Варибельная область легкой цепи заканчивается на 149 Aho, 107 EU, 107 Kabat, 107 Chothia. Нумерация Aho выделяет больше номеров для областей CDR вместо использования букв для остатков CDR, как в Kabat и Chothia (например, 82b для Kabat и Chothia). В результате номера Aho для тех же самых остатков часто больше. Каждая варибельная область включает три определяющих комплементарность участка (CDR) и четыре каркасные области (FR) в следующей последовательности: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Хотя CDR обеспечивают большое разнообразие последовательностей с целью связывания с антигенами (области CDR3 связываются чаще всего), последовательности FR более консервативны и содержат только несколько различий, некоторые из которых специфичны в отношении подтипа.

#### Корреляция последовательностей с вязкостью

[00120] В дополнение к оценке общих характеристик последовательности, последовательности варибельных областей выравнивали, чтобы идентифицировать остатки, ответственные за различия вязкости. В дополнение к визуальным наблюдениям разработали и применили программный алгоритм машинного обучения для идентификации остатков, наиболее влияющих на вязкость, и для прогнозирования значений вязкости антител по их последовательностям. Прогностическую модель строили с применением заряда и гидрофобности остатков в положениях,

выровненных в соответствии с Aho.

[00121] Выравнивание последовательностей тяжелой цепи VH1 и оценка молекул пяти последовательностей подтипа VH1 1-18, характеризующегося высокой вязкостью, и пяти последовательностей подтипа VH1 1-02, характеризующегося низкой вязкостью, показали, что только 4 остатка отличались между двумя подтипами в каркасах, все четыре расположены в каркасе 3 (фигура 9, справа). Больше число различий последовательностей наблюдалось в CDR, но они были оставлены за рамками исследования, поскольку CDR часто участвуют в связывании с антигенами, и сконструированные (мутирующие остатки в) CDR с целью снижения вязкости несут значительный риск потери активности. Связанные с подтипом различия в вязкости и остатках в FR3 указывают на то, что следующие аминокислотные замены могут потенциально обеспечивать уменьшение вязкости в соответствии с нумерацией Aho: T82R, T86I, R94S и S95R. Алгоритм программного обеспечения поддерживал четыре замены, а также обеспечивал предположение, что следующие две замены коррелировали со снижением вязкости: G13V/L легкой цепи в FR1 и S59R/K тяжелой цепи с края от CDR2, последняя корреляция наблюдалась в подтипе VH3 (фигура 9, справа).

Оценка in silico предлагаемых аминокислотных замен

[00122] VH T82R. R82 с высокой частотой происходит в VH1-02. Моделирование структуры IgG показало, что положение 82 тяжелой цепи согласно Aho является частью верхнего ядра глобулиновой складки и обычно не вступает в контакт с антигеном, но оно может непосредственно вступать в контакт с остовами CDR в соответствии с Ewert et al. (2003), "Biophysical properties of human antibody variable domains", J. Mol. Biol. 325: 531-553. H82 характеризуется очень консервативными взаимодействиями N-связи основной цепи - боковой цепи с амидами CDR1 и CDR2 остова (Honegger et al., выше). R82 также может обеспечивать координацию атомов кислорода остова петли CDR2.

[00123] VH R94S и S95R. S94 и R95 с высокой частотой происходят в VH1-02. Эти положения располагаются на поверхности, вдали от антигенсвязывающего домена, и считаются частью нижнего ядра.

[00124] T86I. I86 с высокой частотой встречается в VH1-02. Данные предполагают замену гидрофобного остатка (I) гидрофильным остатком (T) на поверхности, что потенциально может привести к агрегации.

[00125] VH S59R/K- в пределах VH1 и VH3, гидрофильное положение 59 ассоциировано с более низкой вязкостью. Положение VH S59R/K характеризуется высокой структурной вариабельностью и вариабельностью последовательности, достаточно подвержено воздействию растворителя и находится непосредственно между остатками 58 и 60, которые являются частью верхнего ядра и могут влиять на связывание. Структура, вероятно, будет напрямую зависеть от различий в остатках 58 и 60 (особенно 58, если он погружен). R/K59 имеет низкую частоту встречаемости (ниже 2%) и не наблюдался в VH1 согласно анализу частоты аминокислотных остатков. Все R/K59 находятся в наборе данных для VH3, кроме одного (VH4).

[00126] VL G13V/L - это положение структурно погружено и является частью нижнего ядра вариабельного домена в соответствии с Ewert *et al.*, выше. С этой точки зрения мутация G13V в более гидрофобный остаток должна сделать ядро более прочным.

[00127] Подводя итог, можно сказать, что анализ последовательности in silico показал, что предлагаемые мутации не обеспечивают введение никаких дополнительных участков гликозилирования или участков, чувствительных к быстрому разрушению в физиологических или слабокислых условиях состава (NG, NS, NT, DG, DH). Мутации VH T82R, T86I, R94S и S95R обеспечат переход от подтипа VH1-18 к VH1-02 в каркасной области 3, поэтому они не должны обеспечивать введение каких-либо необычных или редких мотивов. Добавление мутаций VH S59R и VL G13V было предположено при помощи программного обеспечения на основании подтипа VH3 вне VH1. Ни один из участков мутации не расположен близко к областям связывания, за исключением S59R, который находится с краю CDR2 HC и, следовательно, представляет умеренный риск нарушения активности/связывания. Аргинин является очень редко встречающимся остатком в положении 59 (R59), поэтому прогноз его воздействия затруднен. T86I идентифицировали как

характеризующуюся высоким риском агрегации и удалили из перечня мутаций.

Полученные мутанты и их экспрессия, активность, химические модификации, гликозилирование и вязкость.

[00128] Принимая во внимание вышеизложенные соображения, получили несколько мутантов для двух антител IgG2 АК и А0 подтипа VH1-18, характеризующегося высокой вязкостью, с целью снижения вязкости при сохранении активности (фигура 9В). Фигура 9В включает символы мутантов моноклональных антител и соответствующие мутации в тяжелой и легкой цепях.

[00129] Очень низкий уровень экспрессии наблюдали для обоих мутантов АК, содержащих замену S59R (отмечена \* на фигуре 3). Жизнеспособность и плотность жизнеспособных клеток также были низкими для одного из них, АК (59 82 94 95 13). С другой стороны, мутанты антитела А0, содержащие замену S59R, характеризовались продуцированием титра, сопоставимого с титром исходной молекулы А0. Хотя статистических данных было недостаточно, чтобы сделать общий вывод о положении 59 тяжелой цепи, случай показал, что одна аминокислотная замена может значительно изменить экспрессию. Химические модификации, включая окисление, дезамидирование, изомеризацию и характер гликозилирования, были одинаковыми среди двух исходных молекул и их мутантов, как было измерено с помощью пептидного картирования в анализе LC-MS.

[00130] Значения активности исходного антитела АК и двух хорошо экспрессируемых мутантов, измеренной посредством связывания с PCSK9, были сходными (фигура 4). Наконец, измеренные значения вязкости мутантов АК и А0 были значительно ниже, чем у исходных антител, как и предсказывалось (фигура 5). Например, мутант АК (82 94 95) обладал только 39% от вязкости исходного антитела. Вязкость обоих мутантов А0, содержащих замену S59R, была даже ниже, приблизительно 28% от вязкости исходного антитела (фигура 5). Мутанты S59R для антитела АК плохо экспрессировались, и вязкость измерить было нельзя. Средние значения вязкости для подсемейств VH1|1-18 и VH1|1-02 зародышевого типа добавили для сравнения. Всего выявили 12

стабильных различий последовательностей между подсемействами VH1|1-18 и VH1|1-02, в том числе 8 в CDR и 4 в каркасных областях (фигура 9). Три участка, все в каркасной области 3, выбрали для аминокислотных замен из VH1|1-18, характеризующегося высокой вязкостью, в VH1|1-02 с низкой вязкостью. Три точечные мутации в каркасах вводили в два mAb подсемейства VH1|1-18 (AK и AO) для преобразования только этих остатков в остатки, присутствующие в VH1|1-02. Хотя шансы достичь возможного 2-кратного снижения вязкости были теоретически низкими (3/12), эти замены довольно неожиданно дали желаемый результат: только при трех заменах вязкость снизилась приблизительно в два раза в отношении обеих молекул антител.

#### Вязкость по сравнению с pI

[00131] Хотя зависимость вязкости от pI не была четкой для всей группы из 43 mAb, подгруппа VH1 явно показала, что вязкость стабильно увеличивается, когда значения pI mAb снижаются с pI 8,5 до pI 6,5 в составе с pH 5,2 (фигура 6). Можно также наблюдать переход от mAb VH1|1-18, характеризующихся высокой вязкостью, к mAb VH1|1-02, характеризующихся низкой вязкостью. Как и предполагалось, мутанты T82R, R94S и S95R антител AK и AO переместились приблизительно в два раза ниже по шкале вязкости от области VH1|1-18 до VH1|1-02 на графике (фигура 6). Мутанты AO (59 82 94 95) и AO (59 82 94 95 13) переместились к еще более низкой вязкости и немного более высокому значению pI, указывая на то, что замена S59R, принятая извне группы VH1, была эффективной для дополнительного снижения вязкости. К сожалению, мутанты AK, содержащие R59, экспрессировались плохо, что позволяет предположить, что появление редко встречающегося остатка аргинина в положении 59 может влиять на экспрессию.

[00132] Увеличение pI в отношении антител в составах с pH < pI (например, в слабокислом составе, применяемом в данном исследовании) обычно приводит к снижению вязкости. Этот результат можно объяснить кулоновским отталкиванием положительно заряженных молекул антител. Известно, что белки, включая антитела, демонстрируют плохую растворимость и высокую степень осаждения, что влияет на вязкость при высоких концентрациях.

Интересно, что замены VH1|1-18 на VH1|1-02 в каркасной области 3 приводили к двукратному снижению вязкости и лишь к незначительному увеличению значений  $rI$  антител, что дает основание предполагать, что не увеличение заряда, а некоторые структурные изменения могут быть причиной резкого снижения вязкости.

[00133] После наложения кристаллографических структур сотен Fab-доменов идентифицировали взаимодействия водородных связей в отношении каждого положения VH и VL (Honegger et al. (2001), "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J. Mol. Biol. 309: 657-670). Данные указывают на то, что идентифицированные положения могут быть связаны с другими остатками посредством взаимодействий водородных связей основной цепи и боковой цепи (для молекул антител АК и АО типа III). Например, 94 было связано с 77 в некоторых структурах иммуноглобулина VH типа III; 95 с 18; 59 с 67, 66, 65, 61, 60 и VL13 с 146, 148. Следовательно, замены остатков в этих положениях могут обеспечивать изменение взаимодействий и укладку иммуноглобулина. Кристаллическая структура антитела АК (Jackson et al., 2007), "The Crystal Structure of PCSK9: a Regulator of Plasma LDL-Cholesterol", Structure 15: 545-52) предполагает, что все три положения 82, 94 и 95 находятся на самой периферии Fab-областей и подвержены воздействию растворителя и других молекул антител. Изменения в положениях FR3 в VH3 (фигура 11) и VK3 (фигура 12) также коррелируют с вязкостью. Одним из объяснений их роли в обеспечении вязкости является то, что эти положения в FR3 находятся на периферии молекулы и активно участвуют в межмолекулярных взаимодействиях во время напряжения сдвига, связанного с движением через инъекционные иглы и измерениями вязкости.

[00134] Более низкая вязкость антител VK3|A27 и более высокая вязкость антител VK3|L16 показали обратную корреляцию между вязкостью и  $rI$  (фигура 8, фигура 12).

[00135] Следует отметить, что  $rI$  был не очень эффективным, но в некоторых случаях полезным прогностическим маркером

вязкости. В целом, вязкость снижалась с увеличением  $rI$ , и  $rI$  следует принимать во внимание. Например, значения вязкости VH3|3-33 становятся более низкими и сходными со значениями VH3|3-07 для молекул антител с более высоким  $rI$  (фигура 7). Следовательно,  $rI$  следует принимать во внимание при прогнозировании вязкости VH3|3-33.

Предлагаемое снижение вязкости для семейств VH3 и VK3 зародышевого типа

**[00136]** Антитела VH3|3-33, характеризующиеся высокой вязкостью, и антитела VH3|3-07, характеризующиеся низкой вязкостью, в среднем имеют большую разницу в вязкости, при этом они находятся в диапазоне сходных значений  $rI$  (фигура 7). Неожиданно, в среднем VH3|3-07 обладали более низкой вязкостью, а также более низким  $rI$ , что противоречит типичному поведению, описанному в литературе. Можно обеспечивать уменьшение значений вязкости следующих молекул VH3|3-33 при помощи мутаций: AQ, AM, AI, AG.

**[00137]** Моноклональные антитела с легкими цепями VK3|L16, характеризующимися высокой вязкостью, и легкими цепями VK3|A27, характеризующимися низкой вязкостью, также показали большую разницу в вязкости, при этом демонстрируя относительно небольшую разницу в значениях  $rI$ , что снова указывает на структурные различия между подсемействами (фигура 8). Значения вязкости следующих молекул VK3|L16 можно уменьшать при помощи мутаций, описанных на фигуре 11: антитела AQ и AF.

**[00138]** Анализ общих характеристик последовательности выявил следующие пары, характеризующиеся высокой/низкой вязкостью: VH1|1-18/VH1|1-02; VK3|L16/VK3|A27 и VH3|3-33/VH3|3-07 со значениями  $r$  для корреляции 0,0002, 0,031 и 0,076 соответственно (фигура 2). Положения и остатки последовательностей, коррелирующие с различиями вязкости, идентифицировали, и их можно рассматривать в качестве кандидатов для точечных мутаций, обеспечивающих снижение вязкости (фигура 2). Представленная выше корреляция семейств VH и VL с вязкостью показывает, что теоретически антитела со следующими комбинациями VH и VL должны обладать самой низкой вязкостью (фигуры 13A и B):

VH2, VH3|3-07, VH1|1-02 в случае VH и VK3, VL1, VK3|A27 в случае VL. Три антитела конфигурации VH1|1-02 и VK3|A27 практически имели место в наборе авторов, и они действительно демонстрировали низкие значения вязкости: В (5,6 сП), J (8,2 сП), Y (12,1 сП).

Исследования химического перекрестного сшивания

**[00139]** Провели широкое исследование потенциальных белок-белковых взаимодействий в вязких растворах антител с применением химического перекрестного сшивания при высоких концентрациях белка. Химическое перекрестное сшивание – это классическая биохимическая методика, применяемая для демонстрации взаимодействия определенных частей белков друг с другом. В данном документе авторы описывают применение химического перекрестносшивающего реагента нулевой длины для идентификации потенциальных белок-белковых взаимодействий в вязких растворах антител с высокой концентрацией. Результаты химического перекрестного сшивания вязких и невязких антител применяют для построения модели потенциальных белок-белковых взаимодействий в растворе.

**[00140]** Химическое перекрестное сшивание при помощи EDC показывает наличие общего химически перекрестносшиваемого олигомерного распределения. Химическая перекрестная сшивка, которая приводит к олигомерной структуре, неожиданно является не межмолекулярной, а скорее внутримолекулярной сшивкой. Внутримолекулярная перекрестная сшивка между верхней частью Fc и нижней частью Fab приводит к конформации антитела, которая может способствовать образованию опосредованных Fc-Fc олигомеров антител. Кристаллическая структура антитела 1NZN содержит гексамер антитела, в асимметричном звене которого одно Fab-плечо прикреплено к Fc-домену для облегчения взаимодействия Fc-Fc, критического для образования гексамера IgG1. Появление этой конформации может иметь или не иметь решающее значение для образования гексамера в кристалле белка. Повышенная склонность к образованию гексамера в растворе, если присутствует внутримолекулярная химическая поперечная сшивка Fab-Fc, дает основание предполагать, что Fab-фрагмент, прикрепленный к Fc,

может характеризоваться повышенной склонностью к образованию олигомеров антител на основе Fc-Fc.

Уменьшение параметров взаимодействия Fc-Fc может обеспечивать уменьшение вязкости раствора

[00141] Научная литература включает исследования в отношении образования гексамеров антител, связанных с взаимодействием с Clq1 и активностью CDC. Diebolder et al. обнаружили, что антитела к CD20 с определенными точечными мутациями Fc, включая K439E и S440K, подавляли активность CDC, но у связанного двойного мутанта K439E/S440K восстанавливалась активность CDC. Мутация I253A также обеспечивала снижение активности CDC. Diebolder et al. (2014), "Complement is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface", Science **343**: 1260-3. Diebolder et al. не связывали мутанты, которые они раскрывают, с влиянием на вязкость антител. Точно так же van den Bremer et al. (2015) обнаружили, что заряженные остатки на C-конце антитела могут обеспечивать снижение взаимодействия с Clq1 по причине сниженной способности к образованию гексамерных структур IgG. Авторы не связывают присутствие заряженных остатков на C-конце IgG с влиянием на вязкость раствора антител.

[00142] Наблюдение гексамера антител в вязких растворах антител позволяет предположить, что взаимодействия Fc-Fc, которые присутствуют в кристаллической структуре гексамера антитела, а также структура, которая, как считается, формируется до привлечения Clq1 (комплемента), вероятно, присутствуют в вязких растворах антител в отсутствие химического поперечносшивающего средства EDC. Чтобы проверить, может ли взаимодействие Fc-Fc влиять на вязкость раствора, в Amgen получали Fc-мутанты на основе работы, сделанной Diebolder et al. Затем материалы оценивали в буфере для состава, направленного против PCSK9, при помощи конусно-пластинчатой реологии. Сравнение исходного антитела к PCSK9 АК и Fc-мутантных антител к PCSK9 показало, что снижение аффинности Fc к Fc действительно обеспечивает снижение вязкости раствора антитела. Точечные мутанты сохраняли способность связываться с FcRn, и не

было никаких изменений в биологической активности. Способность двойного мутанта, в котором восстанавливалась активность комплемента дикого типа, возвращаться к вязкости дикого типа демонстрирует, что снижение вязкости можно обратить вспять, если восстанавливать способность взаимодействий Fc-Fc до уровней дикого типа. Вместе с наблюдением Fc-Fc-опосредованных олигомерных частиц, обеспечивающих увеличение вязкости раствора, присутствует обычное Fc-опосредованное белок-белковое взаимодействие, которое вносит вклад в вязкость раствора антител. Следует отметить, что из пяти мутаций, S440K, I253A, K439E, N433A, N434A, определенных Diebolder et al. как снижающие активность CDC и протестированных в отношении вязкости в данной работе, только первые две показали снижение вязкости в составе антитела к PCSK9 с высокой концентрацией, в то время как K439E, N433A и N434A не обеспечивали снижения вязкости в составе антитела к PCSK9 с высокой концентрацией, что указывает на то, что не существует прямой корреляции, и что специалисты в данной области не могут правильно предсказать более низкую вязкость на основе информации, предоставленной Diebolder et al. Мутант K439E также оценили в составе на основе сахарозы и высокой концентрации белка и обнаружили, что он был менее вязким, чем исходный мутант антитела к PCSK9 при той же концентрации. Присутствие аргинина в составе антитела к PCSK9, возможно, способствовало экранированию заряда, что могло снизить эффективность отрицательного заряда, введенного в мутант K439E для уменьшения взаимодействий Fc-Fc. Мутанты N433A и N434A не имеют явной чувствительности к экранированию заряда, как мутант K439E.

**[00143]** Взаимодействие Fc-Fc может влиять на вязкость раствора с помощью увеличения количества потенциальных взаимодействий, возможных двумя потенциальными способами. Это может обеспечить увеличение количества взаимодействий на антитело от двух взаимодействий, опосредованных CDR, до двух взаимодействий, опосредованных CDR, плюс 2 опосредованных Fc взаимодействия на антитело, или изменение количества свободных концов CDR, доступных в олигомерах, которые присутствуют в

растворе. Учитывая тот факт, что Fc-домены антител IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 очень похожи, вполне вероятно, что опосредованные Fc-Fc взаимодействия присутствуют во всех антителах. Анализ невязких антител показывает, что внутримолекулярная перекрестная сшивка, которая указывает на наличие взаимодействия Fc-Fc, отсутствует, в отличие от вязкого антитела в той же концентрации. Это свидетельствует о том, что взаимодействие Fc-Fc, хотя и теоретически возможное, отсутствует в невязких антителах. Взаимодействие CDR со следующим ближайшим соседом может влиять на относительное расстояние между Fc, а также на относительную ориентацию с усилением взаимодействия Fc-Fc. Этим можно объяснить, почему вязкие антитела характеризуются взаимодействием Fc-Fc, а невязкие антитела - отсутствием взаимодействия, при комнатной температуре.

[00144] Наличие взаимодействия Fc-Fc также увеличивает вероятность того, что олигомер антител (димер, тример, тетрамер и т. д.) содержит максимальное количество свободных концов CDR. Большое количество свободных концов CDR увеличивает количество взаимодействий CDR со следующим ближайшим соседом. Это, в свою очередь, может увеличить склонность к образованию сети и увеличить вязкость раствора в результате более эффективной "инфильтрации".

С-концевые модификации для снижения вязкости

[00145] Определенные модификации на С-конце антитела препятствуют связыванию Clq и комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Van den Bremer *et al.* (2015), "Human IgG is produced in a pro-form that requires clipping of C-terminal lysines for maximal complement activation", *mAbs* 7(4): 672-80. Авторы обнаружили, что С-концевой лизин и С-концевая глутаминовая кислота, вероятно, обеспечивают уменьшение склонности к взаимодействиям Fc-Fc, приводящим к образованию гексамера антител, который может наиболее эффективно взаимодействовать с Clq1. Авторы сконструировали мутанты антитела к CD20 и антитела к CD38, имеющие PGKP (SEQ ID NO:381), PGKKP (SEQ ID NO:382), PGKKKP (SEQ ID NO:383) и PGE на С-конце. Они обнаружили, что данные мутанты демонстрировали в

значительной степени сниженную или полностью утраченную активность CDC. Таким образом, можно сделать вывод, что мутации блокировали гексамеризацию, ранее коррелировавшую у авторов с активностью CDC. С учетом имеющейся корреляции гексамеризации с вязкостью, такие мутации также должны обеспечивать снижение вязкости антигенсвязывающих белков. Таким образом, разумно сделать вывод, что размещение положительно заряженных или отрицательно заряженных аминокислот на С-конце, независимо от того, помещены ли они туда путем добавления или замены существующих С-концевых аминокислот, будет обеспечивать снижение вязкости антигенсвязывающего белка.

Модификация последовательности для улучшения фармакокинетических параметров

[00146] Настоящее изобретение также включает открытие улучшенных фармакокинетических свойств антигенсвязывающих белков, имеющих мутации, которые также могут обеспечивать снижение вязкости. В частности, было обнаружено, что мутации S440K обеспечивают улучшение как  $T_{max}$  (время после введения дозы, при котором наблюдалась максимальная концентрация), так и  $C_{max}$  (максимальная наблюдаемая концентрация, измеренная после введения дозы). Было обнаружено, что мутанты антитела АК, характеризующиеся S440K, независимо с другими мутациями, имеют  $T_{max}$ , уменьшенное более чем вдвое по сравнению с исходным антителом АК, после подкожной инъекции мутантов и исходного антитела в одной и той же концентрации. Также было обнаружено, что такие мутанты имеют  $C_{max}$ , которая на 28% или 42% выше после подкожной инъекции мутантов и исходного антитела. См. фигуру 22.

#### **Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева**

[00147] Настоящее изобретение дополнительно включает выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие биспецифические антитела по настоящему изобретению, которые содержат, например, легкую цепь, переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи, тяжелую цепь, переменную область тяжелой цепи, константную область тяжелой цепи, линкеры, и любые и все их компоненты и комбинации из биспецифических антител, описанных в данном документе. Нуклеиновые кислоты по настоящему

изобретению включают нуклеиновые кислоты, обладающие по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 98% гомологией с нуклеиновыми кислотами по настоящему изобретению. Термины "процент сходства", "процент идентичности" и "процент гомологии" при ссылке на конкретную последовательность используются, как изложено в программном обеспечении GCG® Университета Висконсина. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению также включают комплементарные нуклеиновые кислоты. В некоторых случаях последовательности будут полностью комплементарными (без ошибочных спариваний) при выравнивании. В других случаях в последовательностях может присутствовать до приблизительно 20% ошибочных спариваний. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела по настоящему изобретению.

**[00148]** Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть клонированы в вектор, такой как плаزمид, космида, бакмида, фаг, искусственная хромосома (BAC, YAC) или вирус, в которые могут быть вставлены другая генетическая последовательность или элемент (ДНК или РНК), таким образом, чтобы обеспечить репликацию присоединенной последовательности или элемента. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии содержит сегмент конститутивно активного промотора (такого как ограничения CMV, SV40, фактора элонгации или последовательности LTR) или последовательность индуцибельного промотора, такого как индуцируемый стероидом вектор pIND (Invitrogen), таким образом, что экспрессию нуклеиновой кислоты можно регулировать. Векторы экспрессии по настоящему изобретению могут дополнительно содержать регуляторные последовательности, например, внутренний участок связывания рибосомы. Например, вектор экспрессии можно вводить в клетку с помощью трансфекции.

**[00149]** В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему

следующие функционально связанные элементы; промотор транскрипции; первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь биспецифического антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению; вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь биспецифического антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению; и терминатор транскрипции. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему следующие функционально связанные элементы; первый промотор транскрипции; первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь биспецифического антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению; первый терминатор транскрипции; второй промотор транскрипции; вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь биспецифического антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению; и второй терминатор транскрипции.

[00150] Кроме того, последовательность секреторного сигнального пептида при желании может факультативно кодироваться вектором экспрессии, функционально связанным с представляющей интерес кодирующей последовательностью, таким образом, что экспрессируемый полипептид может секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином для более легкого выделения представляющего интерес полипептида из клетки.

[00151] Кроме того, предусмотрены рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие такие векторы и экспрессирующие тяжелую и легкую цепи.

#### **Очистка**

[00152] Способы очистки антител известны в данной области техники и могут применяться при получении антител и биспецифических антител по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способы очистки антител включают фильтрацию, аффинную колоночную хроматографию, катионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию и концентрацию. Стадия фильтрации предпочтительно включает ультрафильтрацию и

более предпочтительно ультрафильтрацию и диафильтрацию. Фильтрацию предпочтительно осуществляют по меньшей мере приблизительно 5-50 раз, более предпочтительно от 10 до 30 раз и наиболее предпочтительно 14-27 раз. Аффинную колоночную хроматографию можно осуществлять, например, как аффинную хроматографию PROSEP® (Millipore, Биллерика, Массачусетс). В предпочтительном варианте осуществления аффинная хроматография включает колоночную хроматографию PROSEP®-vA. Элюат можно промывать растворителем-детергентом. Катионообменная хроматография может включать, например, катионообменную хроматографию с применением SP-Sepharose. Анионообменная хроматография может включать, например, без ограничения анионный обмен с быстрым потоком с применением Q-Sepharose. Стадия анионного обмена предпочтительно является несвязывающей, что позволяет удалять загрязняющие вещества, включая ДНК и BSA. Продукт, представляющий собой антитело, предпочтительно нанофильтруют, например, с использованием нанофильтра Pall DV 20. Продукт, представляющий собой антитело, можно концентрировать, например, с применением ультрафильтрации и диафильтрации. Способ может дополнительно включать стадию эксклюзионной хроматографии для удаления агрегатов. Другие параметры очистки приводятся в рабочих примерах ниже.

**[00153]** Биспецифические антитела, антитела или антигенсвязывающие фрагменты также могут быть получены другими способами, известными в данной области техники, например, путем химического соединения антител и фрагментов антител.

**[00154]** Каждая рукопись, исследовательская статья, обзорная статья, реферат, заявка на патент, патент или другая публикация, процитированная в данном описании, включена в данный документ посредством ссылки в своем полном объеме.

#### **РАБОЧИЕ ПРИМЕРЫ**

**[00155]** Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими рабочими примерами, которые иллюстрируют, но не ограничивают объем настоящего изобретения.

#### **Пример 1**

Мутации Fab

Материалы

[00156] Группу из молекул 43 человеческих и гуманизированных рекомбинантных моноклональных антител с различными мишенями и различными последовательностями получали и очищали в соответствии со стандартной процедурой (фигуры 1А и 1В). Собирали группу с эквивалентной чистотой, составляющей > 98%, с применением эксклюзионной хроматографии (SEC). Образцы концентрировали в максимальном объеме 3 мл с применением ультрафильтрационной ячейки с перемешиванием Amicon Model 8003 (Millipore, Биллерика, Массачусетс) при 2-8°C при максимальном давлении  $30 \pm 10$  фунтов/кв. дюйм. Их концентрировали до 150 мг/мл в соответствии с приблизительным убыванием объема в буфере для составления, содержащем 20 мМ ацетата, 9% сахарозы при pH 5,2 (без полисорбата), и определяли конечные концентрации ( $\pm 10\%$ ) с применением поглощения при 280 нм в отношении белка (после разбавления в конечном итоге в пределах 0,1-1 единицы абсорбции (AU)) и специфического для белка коэффициента экстинкции.

[00157] Получали, очищали и составляли несколько мутантов, характеризующихся низкой вязкостью, из двух mAb в соответствии с аналогичной стандартной процедурой. Они включали антитело к пропротеиновой конвертазе субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9, антитело АК) и антитело к макрофагальному колониестимулирующему фактору (M-CSF, АО).

Измерения вязкости

[00158] Анализ вязкости проводили на конусно-пластинчатом приборе Brookfield LV-DVIII (Brookfield Engineering, Мидлборо, Массачусетс, США) с применением шпинделя CP-40 и чашки для образца. Все измерения проводили при 25°C при контроле с помощью водяной бани, прикрепленной к чашке для образца. Многократные измерения вязкости собирали вручную в пределах определенного диапазона крутящего момента (10-90%) с помощью увеличения частоты вращения шпинделя. Измерения усредняли с целью указания в отчете одного значения вязкости на образец для упрощения полученной диаграммы сравнения.

## Выравнивание последовательностей

**[00159]** Структурное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программного средства Ab Initio, разработанного с использованием макросов Excel, загруженных на факультете биохимии Цюрихского университета.

**ПРИМЕР 2**

Мутации Fc

Экспрессия и очистка мутантов

Материалы и способы

Антитело к C-kit (антитело BA, SEQ ID NO: 174 и 176, кодируемые нуклеиновыми кислотами под SEQ ID NO: 173 и 175 соответственно), антитело АН к склеростину и антитело АК к PCSK9

IgG1 и IgG2 к стрептавидину

1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида гидрохлорид (EDC)

Солюбилизация с н-метил-2-пирролидоном

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC) со светорассеянием (LS)

Высокоэффективная жидкостная хроматография с восстановленной и алкилированной обращенной фазой (RA RP-HPLC)

Трипсиновая пептидная карта с применением электрораспылительной ионизации с масс-спектрометрией (ESI-MS)

Конусно-пластинчатый вискозиметр

Результаты

Выявление склонности к образованию олигомеров с помощью SE-HPLC перекрестного сшивания с применением EDC высококонцентрированных растворов моноклональных антител

**[00160]** Соединение 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида гидрохлорид (EDC) использовали для химической перекрестной сшивки кислотных остатков в антителе с первичными аминами в антителе (N-конец и/или остатки Lys) и применяли в других исследованиях для определения областей белок-белкового взаимодействия. Близость карбоксильной группы к первичному амину имеет решающее значение, поскольку между двумя группами образуется амидная связь (фигура 16). Образующиеся поперечные связи представляют собой, вероятно, солевые мостики,

которые присутствуют в растворе.. Carraway and Koshland, Jr. (1972). "Carbodiimide modification of proteins". Methods Enzymol **25**: 616-623. Панель антител химически подвергали перекрестному сшиванию при помощи EDC в идентичных условиях раствора. В предыдущих реологических исследованиях определили, что некоторые из антител на панели были вязкими, а некоторые - нет (фигура 17). Невязкие антитела характеризовались небольшими значениями увеличения содержания димеров, но они не содержали больших количеств олигомеров более высокого порядка. Напротив, вязкие антитела содержали большие количества димера, а также олигомеров более высокого порядка. Краткое изложение представлено на фигуре 17. Все антитела, которые были идентифицированы как вязкие, содержали перекрестно сшитые с помощью EDC частицы, которые оказались крупнее димера. Внешний вид более крупных олигомерных частиц зависит от концентрации (антитело АН показано на фигуре 18 в качестве примера). Для облегчения дальнейшего анализа условия химического перекрестного сшивания изменили, чтобы довести реакцию перекрестного сшивания до завершения. Растворы становились твердыми после химического перекрестного сшивания при 200 мг/мл. Твердые вещества повторно растворяли в буфере или забуференном 3% растворе NMP. Анализ SE-HPLC обоих образцов показал, что образцы были сходными. Забуференный 3% раствор NMP растворял белок значительно быстрее, и в раствор поступало больше материала. Антитело АН повторно растворяли и дополнительно анализировали в качестве примера.

Анализ размера с помощью SE-HPLC с LS в сетевом доступе

[00161] Растворы перекрестносшитых антител анализировали с помощью SE-HPLC со светорассеянием в сетевом доступе, чтобы определить размер элюируемых частиц. SE-HPLC осуществляли с анализом светорассеяния в сетевом доступе в отношении антитела АН после химического перекрестного сшивания при помощи EDC и повторного растворения с 3% NMP. В SE-HPLC выявили три пика, присутствующих в UV и RI. Первый пик идентифицировали как частицы с массой 840,5 кДа. Это близко к ожидаемой массе гексамера антитела АН, равной 873,2 кДа. Масса других частиц составляла 494,6 кДа, что близко к прогнозируемой массе 436,6

кДа для тримера антитела АН. Третьи частицы показали массу 139,9 кДа, что близко к прогнозируемой массе 145,5 кДа для мономера антитела АН.

HPLC с восстановленной и алкилированной обращенной фазой перекрестносшитого при помощи EDC антитела АН

**[00162]** Растворы перекрестносшитых антител анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с восстановленной и алкилированной обращенной фазой. Восстановление большей части как легкой цепи (LC), так и тяжелой цепи (HC) было неожиданным, так как предполагалось, что либо HC, либо LC будут перекрестно сшиты друг с другом с образованием ненативных пептидов LC-HC или ненативных пептидов LC-LC или HC-HC, отражая перекрестносшитые олигомеры, наблюдаемые при анализе SEC. В случае антитела АН LC элюировалась в том же месте с той же самой массой, что и неперекрестносшитая LC антитела АН. Имели место изменения HC в антителе АН, которые зависят от концентрации. Есть небольшое количество перекрестносшитого материала HC-HC (элюирование приблизительно через 33 минуты, фигура 21), который имел идентифицированную массу 100 кДа. При 150 мг/мл и 200 мг/мл распределение частиц HC является сходным. При более низких концентрациях белка распределение включает больше частиц, которые элюируются приблизительно через 28,5 мин. Распределение частиц HC коррелирует с количеством олигомера, присутствующего в каждом образце, как было проанализировано при помощи SEC в образце 200 мг/мл, содержащем наибольшее количество гексамеров, и образце 10 мг/мл, содержащем очень мало олигомера. Данная картина наблюдалась в растворах других вязких антител.

### **Пример 3**

Исследование фармакокинетики и фармакодинамики (PKPD) исходного антитела АК к PCSK9 и мутантов, характеризующихся низкой вязкостью, в отношении отличных от человека приматов

**[00163]** Материалы: антитело АК и его мутанты. Все мутации в тяжелой цепи.

**[00164]** Fab-мутант: T82(72)R, R94(84)S, S95(85)R; нумерация согласно Aho (фактическая нумерация)

**[00165]** Fc-мутант S(434)K (S440K в нумерации согласно EU):

[00166] двойной мутант: T82(72)R, R94(84)S, S95(85)R; S(434)K:

[00167] В этом исследовании использовали четыре группы по 4 самца яванских макаков. Каждая группа получала 1 подкожную (SC) дозу 10 мг/кг следующим образом. Группа 1 получала исходное антитело АК (140 мг/мл); группа 2 получала Fab-мутант (210 мг/мл); группа 3 получала Fc-мутант (210 мг/мл); группа 4: Fab/Fc-мутант (210 мг/мл). Группы 1 и 2 также получали контрольную дозу разбавителя SC. Fab-мутант содержал следующие замены в положениях T82(72)R, R94(84)S, S95(85)R. Fc-мутант содержал замену в положении S(434)K.

[00168] Для измерения вязкости при 210 мг/мл исходное антитело и все мутанты составляли в концентрации 210 мг/мл в 10 мМ ацетата, 155 мМ N-ацетиларгинина (NAR), 70 мМ ArgHCl, pH 5,4, 0,01% полисорбата 80. Вязкость измеряли с применением конуса/пластины ARG2 при 1000 с<sup>-1</sup> и 25°C. См. фигуру 15.

[00169] Общая схема исследования:

4 группы по 4 самца яванских макаков.

Каждая группа получала 1 дозу SC (10 мг/кг):

группа 1: исходное антитело АК (140 мг/мл);

группа 2: Fab-мутант (210 мг/мл);

группа 3: Fc-мутант (210 мг/мл);

группа 4: Fab/Fc-мутант (210 мг/мл).

Группы 1 и 2 также получали контрольную подкожную дозу разбавителя.

Биопсию кожи брали в месте инъекции через 3 дня после введения дозы.

Выполняли гистопатологический анализ.

LDL, HDL, общее содержание холестерина в плазме крови и РК наблюдали в течение 6 недель после введения дозы.

[00170] Выводы исследования

Все 4 гомолога обеспечивали заметное снижение LDL.

Максимальное снижение через 2 недели после введения дозы: на 1 неделю позже, чем ранее наблюдалось в отношении исходного антитела.

Низшая точка эффекта была не так выражена, как в отношении мутанта Fab/Fc (~ 78% по сравнению с ~ 90%).

Возврат к исходному уровню, по видимому, немного более ускорен для Fc-мутанта.

PK: Средние значения воздействия были одинаковыми (на основе Cmax и AUClast) между всеми группами лечения (в пределах 1,4 раза).

Мутации Fab и/или Fc в антителе АК к PCSK9 не обеспечивали существенного влияния на параметр реакции в месте инъекции (ISR) или профиль фармакокинетики и фармакодинамики (PKPD) у приматов, отличных от человека (NHP) (яванских макаков).

Fab-мутант: T82(72)R, R94(84)S, S95(85)R; нумерация согласно Aho (фактическая нумерация).

Fc-мутант: S(434)K (S440K в нумерации согласно EU).

#### **ПРИМЕР 4**

Получение и характеристика мутантов антитела AQ GIPR (2G10.006), характеризующихся низкой вязкостью

Клонирование, экспрессия, очистка и составление при высокой концентрации мутантов антитела AQ, характеризующихся низкой вязкостью

[00171] Исходное антитело AQ GIPR (2G10.006) описано в предварительной заявке на патент США 62/387486 как 2G10\_LC1.006 (SEQ ID NO: 74 из цитируемой заявки на патент). Вышеупомянутая заявка на патент США включена в данный документ посредством ссылки. Мутант тяжелой цепи AQ (НС 1, 17, 85) с участками мутаций Q1(1)E, R17(16)G, S85(75)A и мутант легкой цепи AQ (LC 4 13 76 95 97 98) с участками мутаций M4(4)L, V13(13)L, A76(60)D, S95(77)R, Q97(79)E, S98(80)P получали следующим образом. Синтетические гены для мутантов GIPR (2G10.006) (антитело AQ), характеризующихся низкой вязкостью, получали, расщепляли и лигировали в плазмидные векторы экспрессии. Конструкции проверяли путем секвенирования ДНК. Стабильные пулы клеток создавали путем электропорации клональной линии клеток-хозяев CHO. Пулы культивировали при отборе до достижения жизнеспособности более 85%. Пулы высевали в производственную культуру с подпиткой в течение 10 дней и собирали

центрифугированную среду.

[00172] Собранные супернатанты стерилизовали фильтрацией и очищали с применением трехколоночного хроматографического способа, предусматривающего белок А, катионный обмен и анионный обмен аналогично способу, описанному ранее (Shukla et al. (2007), "Downstream processing of monoclonal antibodies- Application of platform approaches," J. Chrom. В 848: 28-39). Полученные очищенные пулы подвергали диализу в буфере для составления, содержащем 20 мМ ацетата и 9% сахарозы при рН 5,2 (без полисорбата), с достижением конечного рН ~ 5,2, и концентрировали до приблизительно 150 мг/мл с применением фильтра с отсеканием выше 30 кДа с помощью центробежной ультрафильтрации (фигура 20А).

#### Измерения активности

[00173] Активность измеряли при помощи анализа с использованием клеток млекопитающих 293/huGIPR, экспрессирующих рецептор глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIPR). Увеличивающиеся концентрации исходного АQ к GIPR и мутантов, характеризующихся низкой вязкостью, обеспечивали блокирование взаимодействия GIP с GIPR, что вызывало изменения cAMP, отслеживаемые во время анализа. Применение анализа было ранее описано в Tseng C.C. et al. (1996), "Postprandial stimulation of insulin release by glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). Effect of a specific glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor antagonist in the rat", J. Clin. Invest. 98: 2440-2445.

#### Измерения вязкости

[00174] Анализ вязкости АQ и двух мутантов, характеризующихся низкой вязкостью, проводили на вискозиметре Anton Paar с применением шпинделя CP25-1/TG. Все измерения проводили при 25°C при контроле с помощью водяной бани, прикрепленной к чашке для образца. Измерения вязкости собирали вручную при увеличении скорости сдвига от 0 до 2000 об/мин. Собирали для каждого образца 10 результатов измерения вязкости при скорости сдвига 1000 1/с и 10 результатов измерения вязкости

при скорости сдвига 2000 1/с и усредняли с получением одного значения вязкости на образец.

[00175] Следует отметить, что надежность измерений вязкости намного выше, чем точность, поскольку измерения вязкости чувствительны даже к незначительным изменениям некоторых параметров, таких как состояние вискозиметра, температура в помещении и некоторые другие незначительные параметры во время измерений. Поэтому важно измерять все образцы, представляющие интерес, при одной настройке или, если образцы, представляющие интерес, измеряют при двух настройках, иметь одинаковый эталонный стандарт при обеих настройках.

#### Результаты

[00176] Антитело AQ к GIPR (2G10.006) принадлежит к подсемействам тяжелой цепи VH3|3-33 и легкой цепи VK3|L16 зародышевого типа, характеризующимся высокой вязкостью. Несколько мутаций, полученных на фигурах 11 и 12, выполнили в каркасах в попытке обеспечить уменьшение вязкости AQ. Вязкость исходного AQ и двух мутантов, измеренная при одной установке вискозиметра, показала следующие значения: AQ – 19,1 сП, AQ (НС 1, 17, 85) – 15,8 сП, AQ (LC 4 13 76 95 97 98) – 12,7 сП (фигура 20). Мутант тяжелой цепи AQ (НС 1, 17, 85) составлял 83%, а мутант легкой цепи AQ (LC 4 13 76 95 97 98) составлял 67% относительно исходного AQ. На фигурах 7 и 8 показаны положения мутантов на графиках зависимости вязкости от  $rI$  в отношении членов семейств VH3 и VK3. На активность cAMP in vitro мутации вязкости одинаково не влияли. Активность оставалась неизменной в пределах погрешности клеточного анализа *in vitro* (см. фигуру 20B). Чтобы подытожить, введенные мутации обеспечивали снижение вязкости без потери активности.

#### **ПРИМЕР 5**

Мутант легкой цепи V78F (LC V78F согласно нумерации Aho и LC V62F в линейной нумерации) антитела к GIPR, характеризующийся низкой вязкостью

[00177] Антитело AQ к GIPR (2G10.006) показало высокую вязкость 23 сП при 150 мг/мл в составе A52Su. Это антитело характеризовалось редко встречающимся остатком V78 согласно

нумерации Aho (V62 в линейной нумерации) в легкой цепи каппа (LC V78 Aho). Частота встречаемости V78 составляет <1%, тогда как F78 составляет > 98% в последовательностях легких цепей, родственных зародышевой линии каппа. Остаток LC V78 привлек внимание, поскольку он являлся ковариационным нарушителем. Ковариационный анализ позволяет установить попарные положения консервативных остатков на основе физико-химических свойств остатков в переменных областях антител с идентификацией неправильно расположенных остатков (которые часто не являются остатками зародышевого типа). Дополнительно с помощью ковариационного анализа можно предложить замену аминокислот в отклоняющихся положениях более распространенными последовательностями зародышевого типа, что приводит к значительному конформационному изменению, выявляемому с помощью молекулярно-динамического моделирования (Kannan G., "Method of correlated mutational analysis to improve therapeutic antibodies", заявка на патент США с сер. № 61/451929, PCT/US 2012/028596, WO 2012/125495). В попытке устранить нарушение ковариации и увеличить процент человеческих последовательностей, в антитело AQ к GIPR (2G10.006) вводили мутацию LC V78F.

**[00178]** Неожиданно вязкость мутанта снизилась на 25% с сохранением при этом аналогичной активности в отношении GIPR человека, измеренной в анализах cAMP (клеточных). Обе последовательности, исходное антитело AQ к GIPR (2G10.006) и его мутант LC V78F описаны в предварительной заявке на патент США 62/387486 как 2G10\_LC1.006 (SEQ ID NO: 74 из цитируемой заявки) и 2G10\_LC1.003 (SEQ ID NO: 71 из цитируемой заявки) соответственно. Заявка на патент США включена в данный документ посредством ссылки. Впервые обнаружено в настоящем изобретении, что такая замена приводила к снижению вязкости на приблизительно 25% за счет мутации LC V78F. Анализ вязкости AQ GIPR\_2G10.006 и его мутанта V78F осуществляли при 150 мг/мл в составе, содержащем 20 мМ ацетата, 9% сахарозы при pH 5,2, 0,01% полисорбата 80, при скорости сдвига 1000 и 25°C с применением магнитного конусно-пластинчатого вискозиметра AR-G2 от TA

Instruments - Waters LLC. Размер пластины конуса составлял 20 мм в диаметре, угол конуса  $1,988^\circ$ , он был снабжен пластиной Пельтье из стали марки 990918 и работал с применением процедуры Flow Sweep. Измеренные значения вязкости составляли 21 сП для GIPR\_2G10.006 и 15,3 сП для мутанта LC V78F GIPR (2G10.003), что означает снижение вязкости на 25%.

[00179] Как отмечалось в предыдущем примере, надежность измерений вязкости намного выше, чем точность. Вязкость при 150 мг/мл с 0,01% полисорбата обычно на 10% ниже, чем без полисорбата, что наблюдалось в случае GIPR (2G10.006). Его вязкость составляла 23 сП без полисорбата (как для всех 43 антител) и 21 сП с полисорбатом.

#### **ПРИМЕР 6**

##### Исследование в отношении яванских макаков

[00180] Антитела, обозначенные как АК (контроль, также известный как AMG 145 и эволокумаб) и Fab-мутант, Fc-мутант и двойной мутант, показанные в примере 3, получали с применением методологии, раскрытой в примерах 1 и 2. Фармакокинетические свойства этих антител тестировали *in vivo* с помощью однократной подкожной болюсной инъекции самцам яванских макаков.

##### Схема исследования

[00181] Исследование проводили на самцах яванских макаков. Возраст животных составлял от 2,7 до 3,8 лет, а вес от 2,9 до 3,8 кг. Животных акклиматизировали в лабораторном корпусе в течение 7 дней до начала введения дозы. Критерии отбора включали приемлемые результаты в отношении уровней холестерина до лечения (включая уровни LDL и HDL). Перед началом введения дозы всех животных рандомизировали и распределяли по группам с применением компьютерной процедуры рандомизации.

[00182] Тестируемые и контрольные препараты вводили подкожно в области середины спины соответствующим животным один раз в 1-й день. Место (места) инъекции брили перед введением и маркировали несмываемыми чернилами. Животных временно удерживали для введения дозы и не подвергали седации. Объем дозы для каждого животного основывался на самых последних измерениях

массы тела. Для групп 1 и 2 дозированные растворы вводили с помощью 2 подкожных инъекций в спину каждого животного (1 с помощью тестируемого материала, 1 с помощью разбавителя). Места инъекций находились на расстоянии по меньшей мере 5-6 см друг от друга. Тестируемый материал вводили справа от позвоночника каждому животному. Разбавитель доставляли слева от позвоночника каждому животному. Для групп 3 и 4 дозированные растворы вводили с помощью однократной подкожной инъекции в спину каждого животного. Уровни доз и объемы для каждой группы обобщены на фигуре 21.

**[00183]** Образцы крови собирали с помощью венепункции в пробирки, содержащие EDTA калия (K2), в различные моменты времени в течение прижизненной части данного исследования (43 дня). Животных не подвергали голоданию перед сборами крови для сывороточной химии.

**[00184]** Образцы охлаждали после сборов крови и разделяли для получения или сыворотки, или плазмы. Образцы осторожно перемешивали и центрифугировали. Образцы крови хранили на влажном льду сразу после сбора до центрифугирования (1500-2000 × g в течение примерно 10 минут) при температуре приблизительно 4°C. Полученную плазму или сыворотку отделяли и разделяли на 2 аликвоты (первичную и резервную), переносили в полипропиленовые пробирки с соответствующей маркировкой и хранили в морозильной камере, в которой поддерживалась температура -80°C, до анализа. Образцы плазмы использовали для определения концентрации тестируемого препарата для фармакокинетической оценки, образцы сыворотки анализировали в отношении холестерина, HDL и LDL.

#### Оценка фармакокинетики

**[00185]** Образцы плазмы анализировали в отношении концентрации каждого тестируемого антитела (антитело АК, Fab-мутант АК, Fc-мутант S440K АК и двойной мутант Fab/S440K АК) с применением твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В анализе применяют рекомбинантный человеческий PCSK9 в качестве реагента для захвата и антитело к человеческому IgG1, меченое пероксидазой хрена, в качестве реагента для обнаружения.

Стандарты и образцы для контроля качества (QC) готовят путем добавления антитела АК или гомологов, характеризующихся низкой вязкостью, в 100% пул K2-EDTA яванского макака. Лунки 96-луночных микропланшетов Costar (Corning Incorporated) покрывают рекомбинантным человеческим PCSK9. После этапа блокировки стандарты, холостой образец (NSB), QC (QC) и тестовые образцы загружают в лунки микропланшета после предварительной обработки с коэффициентом разведения 100 в Blocker™ BLOTTO в TBS (Thermo Scientific). Антитело АК в образцах захватывается иммобилизованным рекомбинантным человеческим PCSK9, нанесенным на микропланшет. Несвязанный материал удаляют с помощью промывания лунок микропланшета. После промывки мышиное антитело к человеческому IgG, Ab35, конъюгированное с HRP детекторное антитело, добавляют в лунки микропланшета для связывания захваченного антитела АК. Несвязанное антитело для выявления удаляют с помощью промывания лунок микропланшета. В лунки микропланшета добавляют однокомпонентный раствор TMB для обнаружения связанного конъюгата с HRP мышиного антитела к человеческому IgG Ab35. Раствор субстрата TMB реагирует с пероксидом и, в присутствии HRP, создает колориметрический сигнал, который является пропорциональным количеству антитела АК или мутантного гомолога, характеризующегося низкой вязкостью, связанного реагентом для захвата. Проявление цвета останавливают с применением 2 н. серной кислоты и измеряют интенсивность цвета (оптическую плотность или OD) при 450 нм минус 650 нм. Данные сокращают с применением пакета сокращения объема данных Watson SP3 версии 7.4 (или более поздней) с помощью регрессионной модели с 4 параметрами (Марквардта) с весовым коэффициентом 1.

**[00186]** Фармакокинетические параметры оценивали с применением фармакокинетического программного обеспечения WinNonlin. Для оценки параметров применяли подход без компартментализации, совместимый с подкожным путем введения. Все параметры получали на основе отдельных концентраций в плазме с 1-го дня. Определяли следующие параметры:

$T_{max}$  (время после введения дозы, при котором отмечали

максимальную наблюдаемую концентрацию),

$C_{max}$  (максимальная наблюдаемая концентрация, измеренная после введения дозы),

AUC (0-t) (площадь под кривой зависимости концентрации от времени от начала введения дозы до времени после введения дозы, при котором наблюдалась последняя количественная концентрация, с применением линейного или линейного/логарифмического метода трапеций),

AUC (0-t)/D (AUC (0-t), деленная на введенную дозу), и

RAUC (площадь под кривой от T1 до T2 в состоянии равновесия, деленная на площадь под кривой от T1 до T2 в течение исходного интервала введения дозы).

#### Результаты и обсуждение

[00187] Графики концентраций тестируемого препарата в зависимости от времени показаны на фигурах 24А и 24В (средние концентрации для каждого тестируемого препарата, n=4 в каждый момент времени). Фармакокинетические параметры четырех тестируемых препаратов обобщены на фигуре 22. Антитела, содержащие мутацию Fc S440K (как антитело АК (Fc-мутант), так и антитело АК (двойной мутант Fc и Fab)), демонстрируют снижение  $T_{max}$  (0,81 и 1 день соответственно по сравнению с 2,5 дня) и повышение  $C_{max}$  (125 и 112 мкг/мл соответственно) по сравнению с 87,8 мкг/мл) относительно антитела АК (контроль) и антитела АК (Fab-мутант), что указывает на то, что антитела, содержащие мутацию Fc, которая обеспечивает снижение вязкости, быстрее распределяются в кровотоке после подкожной инъекции.

[00188] Введение всех гомологов антитела АК, характеризующихся низкой вязкостью, приводило к ожидаемому фармакологическому снижению параметров липопротеинов низкой плотности (LDL) от легкой до умеренной степени, связанному со снижением концентрации общего холестерина по сравнению с исходным уровнем (день -6). Величина снижения содержания общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности после введения Fab-мутанта АК и Fc-мутанта S440K АК в целом была сходной с контрольными животными с тенденцией к восстановлению до исходного уровня у Fc-мутанта S440K АК на 25-й день и АК

(контроль) и Fab-мутанта АК на 29-й день. Величина снижения содержания общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности в случае двойного мутанта Fab/S440K АК была в целом менее выраженной по сравнению с контролем (антитело АК в дозе 10 мг/кг). Не было изменений в показателе липопротеина высокой плотности ни в одном случае гомолога АК, характеризующегося низкой вязкостью. Процентные изменения LDL-C относительно исходного уровня приведены в таблице на фигуре 23 и нанесены на график в зависимости от времени на фигурах 24А и 24В.

### СОКРАЩЕНИЯ

[00189] Сокращенные термины, используемые во всем данном документе, определяются следующим образом.

AEI дисбаланс аллельной экспрессии  
 ANOVA дисперсионный анализ  
 AUC площадь под кривой  
 BSA бычий сывороточный альбумин  
 DMEM среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко  
 DMSO диметилсульфоксид  
 EDC 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида гидрохлорид  
 EDTA этилендиаминтетрауксусная кислота  
 ELISA твердофазный иммуноферментный анализ  
 eQTL экспрессия локусов количественных признаков  
 ESI-TOF время-пролетная масс-спектрометрия с  
 электрораспылительной ионизацией  
 FACS сортировка клеток с активированной флуоресценцией  
 FBS фетальная бычья сыворотка  
 FPLC жидкостная экспресс-хроматография белков  
 FVB линия мышей, инбредных в отношении аллеля вируса  
 лейкоза Френда 1b (Fv1b)  
 H&E гематоксилин и эозин  
 HA гипоксантин  
 HIC хроматография гидрофобных взаимодействий  
 HPLC высокоэффективная жидкостная хроматография  
 HRP пероксидаза хрена  
 HUVEC эпителиальные клетки пупочной вены человека  
 IBD воспалительное заболевание кишечника

IDMEM DMEM без глутамин

IFN интерферон

IL интерлейкин

MCP белок хемотаксиса моноцитов

MSD база данных макромолекулярных структур

PBMC мононуклеарная клетка периферической крови

PBS фосфатно-солевой буферный раствор

PCR полимеразная цепная реакция

PEG полиэтиленгликоль

PEI полиэтиленимин

QTL локусы количественных признаков

RPMI среда, разработанная в Мемориальном институте Розуэлла Парка

SNP однонуклеотидный полиморфизм

TFA трифторуксусная кислота

TMB 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

1. Способ снижения вязкости антигенсвязывающего белка, который включает введение в последовательность антигенсвязывающего белка одной или нескольких модификаций, выбранных из:

а. если антигенсвязывающий белок предусматривает подсемейство VH1|1-18 зародышевого типа, модификации последовательности VH1 с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $82X^1$ ,  $94X^2$  и  $95X^3$ , где  $X^1$  выбран из R, K и H,  $X^2$  выбран из S, T, N и Q, и  $X^3$  выбран из R, K и H;

б. если антигенсвязывающий белок предусматривает подсемейство VH3|3-33 зародышевого типа, модификации последовательности VH3 с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $1X^4$ ,  $17X^5$  и  $85X^6$ , где  $X^4$  выбран из D и E,  $X^5$  выбран из G, A, V, I, L, и M, и W, и  $X^6$  выбран из G, A, V, I, L и M;

с. если антигенсвязывающий белок предусматривает подсемейство VK3|L16 зародышевого типа, модификации последовательности VK3 с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $4X^{10}$ ,  $13X^{11}$ ,  $76X^{12}$ , 78F,  $95X^{13}$ ,  $97X^{14}$  и 98P, где  $X^{10}$  выбран из G, A, V, I, L и M,  $X^{11}$  выбран из G, A, V, I, L и M,  $X^{12}$

выбран из D и E, X<sup>13</sup> выбран из R, K и H, и X<sup>14</sup> выбран из D и E;

d. если антигенсвязывающий белок предусматривает подсемейство VK3|L6 зародышевого типа, модификации последовательности VK3 с включением одной или нескольких замен, выбранных из 76X<sup>12</sup> и 95X<sup>13</sup>;

e. модификации последовательности Fc-домена с включением одной или нескольких замен, выбранных из 253X<sup>15</sup>, 440X<sup>16</sup> и 439X<sup>17</sup>, где X<sup>15</sup> выбран из G, A, V, I, L и M, X<sup>16</sup> выбран из R, K и H, и X<sup>17</sup> выбран из D и E, где последовательность Fc-домена содержит только одну из 440X<sup>16</sup> и 439X<sup>17</sup>; и

f. модификации С-конца последовательности Fc-домена с включением X<sup>18</sup>X<sup>19</sup>, где X<sup>18</sup> представляет собой от одной до четырех аминокислот, выбранных из D и E или из H, K и R, и X<sup>19</sup> выбран из P, M, G, A, V, I, L, S, T, N, Q, F, Y и W и отсутствует, если X<sup>18</sup> содержит D или E, присутствует, если X<sup>18</sup> содержит K или R в своем С-концевом участке, и присутствует или отсутствует, если X<sup>18</sup> содержит H в своем С-концевом участке;

где аминокислоты в подпунктах a, b, c и d пронумерованы в соответствии с системой нумерации Aho, и аминокислоты в подпункте e пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

2. Способ по п. 1, где антигенсвязывающий белок содержит, кроме подвергнутых замене, последовательности антитела, выбранного из представленных на фигурах 1A и 1B (SEQ ID NO: 166 и 168; 2 и 4; 178 и 180; 170 и 172; 6 и 8; 10 и 12; 14 и 16; 18 и 20; 22 и 24; 26 и 28; 30 и 32; 34 и 36; 38 и 40; 43 и 44; 46 и 48; 50 и 52; 54 и 56; 58 и 60; 62 и 64; 66 и 68; 70 и 72; 74 и 76; 78 и 80; 82 и 84; 86 и 88; 90 и 92; 94 и 96; 98 и 100; 102 и 104; 106 и 108; 110 и 112; 114 и 116; 118 и 120; 122 и 124; 126 и 128; 130 и 132; 134 и 136; 158 и 160; 138 и 140; 142 и 144; 146 и 148; 150 и 152 и 154 и 156).

3. Способ по п. 1, который включает модификацию последовательности VH1 антигенсвязывающего белка, предусматривающего подсемейство VH1|1-18 зародышевого типа, с включением одной или нескольких замен, выбранных из 82R, 94S и 95R.

4. Способ по п. 2, который включает модификацию последовательности VH1 антигенсвязывающего белка, предусматривающего подсемейство VH1|1-18 зародышевого типа, с включением замен 82R, 94S и 95R.

5. Способ по п. 1, дополнительно включающий модификацию последовательности VH1 антигенсвязывающего белка, предусматривающего подсемейство VH1|1-18 зародышевого типа, с включением замены 59X<sup>20</sup>, где X<sup>20</sup> выбран из R, K и N.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий модификацию последовательности VH1 антигенсвязывающего белка, предусматривающего подсемейство VH1|1-18 зародышевого типа, с включением замены 59K.

7. Способ по п. 2, дополнительно включающий модификацию последовательности VH1 антигенсвязывающего белка, предусматривающего подсемейство VH1|1-18 зародышевого типа, с включением замены 59K.

8. Способ по п. 3, где антигенсвязывающий белок, кроме подвергнутых замене, содержит последовательности антитела, выбранного из антител AF, AK, AL, AN и AO, представленных на фигуре 1B (SEQ ID NO: 114 и 116; 134 и 136; 138 и 140; 146 и 148 и 150 и 152).

9. Способ по п. 1, который включает модификацию последовательности VH3 антигенсвязывающего белка, предусматривающего подсемейство VH3|3-33 зародышевого типа, с включением одной или нескольких замен, выбранных из 1E, 17G и 85A.

10. Способ по п. 2, который включает модификацию последовательности VH3 антигенсвязывающего белка, предусматривающего подсемейство VH3|3-33 зародышевого типа, с включением замен 1E, 17G и 85A.

11. Способ по п. 10, где антигенсвязывающий белок, кроме подвергнутых замене, содержит последовательности антитела, выбранного из антител AQ, AM, AI и AG, представленных на фигуре 1B (SEQ ID NO: 158 и 160; 142 и 144; 126 и 128 и 118 и 120).

12. Способ по п. 1, который включает модификацию последовательности VK3|L16 антигенсвязывающего белка с

включением одной или нескольких замен, выбранных из 4L, 13L, 76D, 78F, 95R, 97E и 98P.

13. Способ по п. 2, который включает модификацию последовательности VK3|L16 антигенсвязывающего белка с включением замен 4L, 13L, 76D, 78F, 95R, 97E и 98P.

14. Способ по п. 13, где антигенсвязывающий белок, кроме подвергнутых замене, содержит последовательности антитела, выбранного из антител AF и AQ, представленных на фигуре 1B (SEQ ID NO: 114 и 116 и 158 и 160).

15. Способ по п. 1, который включает модификацию последовательности VK3|L6 антигенсвязывающего белка с включением одной или нескольких замен, выбранных из 76D и 95R.

16. Способ по п. 2, который включает модификацию последовательности VK3|L6 антигенсвязывающего белка с включением замен 76D и 95R.

17. Способ по п. 16, где антигенсвязывающий белок, кроме подвергнутых замене, содержит последовательности антитела AJ, представленного на фигуре 1B (SEQ ID NO: 130 и 132).

18. Способ по п. 1, который включает модификацию последовательности Fc-домена с включением одной или нескольких замен, выбранных из 253A, 440K и 439E.

19. Способ по п. 2, который включает модификацию последовательности Fc-домена с включением замен 253A, 440K и 439E.

20. Способ по п. 18, где антигенсвязывающий белок содержит, кроме подвергнутых замене, последовательности антитела, выбранного из антител BA, AH и AN (SEQ ID NO: 174 и 176; 122 и 124 и 146 и 148).

21. Способ по п. 1, который включает модификацию С-конца Fc-домена с включением аминокислотной последовательности, выбранной из KP, KKP, KKKP (SEQ ID NO:380) и E.

22. Способ по п. 2, который включает модификацию С-конца Fc-домена с включением аминокислотной последовательности, выбранной из KP, KKP, KKKP (SEQ ID NO:380) и E.

23. Способ по п. 18, который включает модификацию С-конца Fc-домена с включением аминокислотной последовательности,

выбранной из КР, ККР, КККР (SEQ ID NO:380) и Е.

24. Антигенсвязывающий белок, который предусматривает одну или несколько модификаций последовательности, выбранных из:

а. последовательности подсемейства VN1|1-18 зародышевого типа, содержащей одну или несколько замен, выбранных из 82X<sup>1</sup>, 94X<sup>2</sup> и 95X<sup>3</sup>, где X<sup>1</sup> выбран из R, K и H, X<sup>2</sup> выбран из S, T, N и Q, и X<sup>3</sup> выбран из R, K и H;

б. последовательности подсемейства VN3|3-33 зародышевого типа, содержащей одну или несколько замен, выбранных из 1X<sup>4</sup>, 17X<sup>5</sup> и 85X<sup>6</sup>, где X<sup>4</sup> выбран из D и E, X<sup>5</sup> выбран из G, A, V, I, L и M, и X<sup>6</sup> выбран из G, A, V, I, L и M;

с. последовательности подсемейства VK3|L16 зародышевого типа, содержащей одну или несколько замен, выбранных из 4X<sup>10</sup>, 13X<sup>11</sup>, 76X<sup>12</sup>, 95X<sup>13</sup>, 97X<sup>14</sup> и 98P, где X<sup>10</sup> выбран из G, A, V, I, L и M, X<sup>11</sup> выбран из G, A, V, I, L и M, X<sup>12</sup> выбран из D и E, X<sup>13</sup> выбран из R, K и H, и X<sup>14</sup> выбран из D и E, где антигенсвязывающий белок не содержит только замену 78F;

д. последовательности подсемейства VK3|L6 зародышевого типа, содержащей одну или несколько замен, выбранных из 76X<sup>12</sup> и 95X<sup>13</sup>;

е. последовательности Fc-домена, содержащей одну или несколько замен, выбранных из 253X<sup>15</sup>, 440X<sup>16</sup> и 439X<sup>17</sup>, где X<sup>15</sup> выбран из G, A, V, I, L и M, X<sup>16</sup> выбран из R, K и H, и X<sup>17</sup> выбран из D и E, где последовательность Fc-домена содержит только одно из 440X<sup>16</sup> и 439X<sup>17</sup>, и где антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере одно из 253X<sup>15</sup> или модификаций, выбранных из подпунктов а, б, с, д и ф, если X<sup>16</sup> представляет собой K, или X<sup>17</sup> представляет собой E, и антигенсвязывающий белок специфически связывает CD20; и

ф. последовательности Fc-домена, содержащей X<sup>18</sup>X<sup>19</sup> на своем С-конце, где X<sup>18</sup> представляет собой от одной до четырех аминокислот, выбранных из D и E или из H, K и R, и X<sup>19</sup> выбран из P, M, G, A, V, I, L, S, T, N, Q, F, Y и W и отсутствует, если X<sup>18</sup> содержит D или E, присутствует, если X<sup>18</sup> содержит K или R в своем С-концевом участке, и присутствует или отсутствует, если X<sup>18</sup> содержит H в своем С-концевом участке, и где антигенсвязывающий

белок содержит по меньшей мере одно из 253X<sup>15</sup> или замен, выбранных из подпунктов а-е, если на С-конце Fc-домена находится PGKP (SEQ ID NO:381), PGKKP (SEQ ID NO:382), PGKKKP (SEQ ID NO:383) или PGE, и антигенсвязывающий белок специфически связывает CD20 или CD38;

где аминокислоты в подпунктах а, b, с и d пронумерованы в соответствии с системой нумерации Aho, и аминокислоты в подпункте е пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

25. Антигенсвязывающий белок по п. 24, где антигенсвязывающий белок содержит, кроме подвергнутых замене, последовательности антитела, выбранные из представленных на фигурах 1A и 1B (SEQ ID NO: 166 и 168; 2 и 4; 178 и 180; 170 и 172; 6 и 8; 10 и 12; 14 и 16; 18 и 20; 22 и 24; 26 и 28; 30 и 32; 34 и 36; 38 и 40; 43 и 44; 46 и 48; 50 и 52; 54 и 56; 58 и 60; 62 и 64; 66 и 68; 70 и 72; 74 и 76; 78 и 80; 82 и 84; 86 и 88; 90 и 92; 94 и 96; 98 и 100; 102 и 104; 106 и 108; 110 и 112; 114 и 116; 118 и 120; 122 и 124; 126 и 128; 130 и 132; 134 и 136; 158 и 160; 138 и 140; 142 и 144; 146 и 148; 150 и 152 и 154 и 156).

26. Антигенсвязывающий белок по п. 24, где последовательность подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа содержит одну или несколько замен, выбранных из 82R, 94S и 95R.

27. Антигенсвязывающий белок по п. 25, где последовательность подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа содержит замены 82R, 94S и 95R.

28. Антигенсвязывающий белок по п. 24, где последовательность подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа содержит замену 59X<sup>20</sup>, где X<sup>20</sup> выбран из R, K и H.

29. Антигенсвязывающий белок по п. 24, где последовательность подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа содержит замену 59K.

30. Антигенсвязывающий белок по п. 25, где последовательность подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа содержит замену 59K.

31. Антигенсвязывающий белок по п. 30, где

антигенсвязывающий белок содержит, кроме подвергнутых замене, последовательности антитела, выбранного из антител AF, AK, AL, AN и AO, представленных на фигуре 1B (SEQ ID NO: 114 и 116; 134 и 136; 138 и 140; 146 и 148 и 150 и 152).

32. Антигенсвязывающий белок по п. 24, где последовательность подсемейства VH3|3-33 зародышевого типа содержит одну или несколько замен, выбранных из IE, 17G и 85A.

33. Антигенсвязывающий белок по п. 25, где последовательность подсемейства VH3|3-33 зародышевого типа содержит замены IE, 17G и 85A.

34. Антигенсвязывающий белок по п. 33, где антигенсвязывающий белок содержит, кроме подвергнутых замене, последовательности антитела, выбранного из антител AQ, AM, AI и AG, представленных на фигуре 1B (SEQ ID NO: 158 и 160; 142 и 144; 126 и 128 и 118 и 120).

35. Антигенсвязывающий белок по п. 24, где последовательность VK3|L16 содержит одну или несколько замен, выбранных из 4L, 13L, 76D, 78F, 95R, 97E и 98P.

36. Антигенсвязывающий белок по п. 25, где последовательность VK3|L16 содержит замены 4L, 13L, 76D, 95R, 97E и 98P.

37. Антигенсвязывающий белок по п. 26, где последовательность VK3|L16 содержит одну или несколько замен, выбранных из 4L, 13L, 76D, 95R, 97E и 98P.

38. Антигенсвязывающий белок по п. 29, где последовательность VK3|L16 содержит одну или несколько замен, выбранных из 4L, 13L, 76D, 95R, 97E и 98P.

39. Антигенсвязывающий белок по п. 32, где последовательность VK3|L16 содержит одну или несколько замен, выбранных из 4L, 13L, 76D, 95R, 97E и 98P.

40. Антигенсвязывающий белок по п. 36, где антигенсвязывающий белок, кроме подвергнутых замене, содержит последовательности антитела, выбранного из антител AF и AQ, представленных на фигуре 1B (SEQ ID NO: 114 и 116 и 158 и 160).

41. Антигенсвязывающий белок по п. 24, где последовательность VK3|L16 содержит одну или несколько замен,

выбранных из 76D и 95R.

42. Антигенсвязывающий белок по п. 25, где последовательность VK3|L6 содержит замены 76D и 95R.

43. Антигенсвязывающий белок по п. 26, где последовательность VK3|L6 содержит замены 76D и 95R.

44. Антигенсвязывающий белок по п. 29, где последовательность VK3|L6 содержит замены 76D и 95R.

45. Антигенсвязывающий белок по п. 32, где последовательность VK3|L6 содержит замены 76D и 95R.

46. Антигенсвязывающий белок по п. 39, где антигенсвязывающий белок, кроме подвергнутых замене, содержит последовательности антитела AJ, представленного на фигуре 1B (SEQ ID NO: 130 и 132).

47. Антигенсвязывающий белок по п. 24, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253A, 440K и 439E.

48. Антигенсвязывающий белок по п. 25, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253A, 440K и 439E.

49. Антигенсвязывающий белок по п. 42, где антигенсвязывающий белок содержит, кроме подвергнутых замене, последовательности антитела, выбранного из антител BA, AH и AN (SEQ ID NO: 174 и 176; 122 и 124 и 146 и 148).

50. Антигенсвязывающий белок по п. 24, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из замен 253A, 440K и 439E.

51. Антигенсвязывающий белок по п. 26, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из замен 253A, 440K и 439E.

52. Антигенсвязывающий белок по п. 29, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253A, 440K и 439E.

53. Антигенсвязывающий белок по п. 32, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253A, 440K и 439E.

54. Антигенсвязывающий белок по п. 35, который содержит

последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253А, 440К и 439Е.

55. Антигенсвязывающий белок по п. 37, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253А, 440К и 439Е.

56. Антигенсвязывающий белок по п. 38, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253А, 440К и 439Е.

57. Антигенсвязывающий белок по п. 39, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253А, 440К и 439Е.

58. Антигенсвязывающий белок по п. 41, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253А, 440К и 439Е.

59. Антигенсвязывающий белок по п. 42, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253А, 440К и 439Е.

60. Антигенсвязывающий белок по п. 43, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253А, 440К и 439Е.

61. Антигенсвязывающий белок по п. 44, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253А, 440К и 439Е.

62. Антигенсвязывающий белок по п. 45, который содержит последовательность Fc-домена, содержащую одну или несколько замен, выбранных из 253А, 440К и 439Е.

63. Антигенсвязывающий белок по п. 24, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из КР, ККР, КККР (SEQ ID NO:380) и Е.

64. Антигенсвязывающий белок по п. 26, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из КР, ККР, КККР (SEQ ID NO:380) и Е.

65. Антигенсвязывающий белок по п. 29, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из КР, ККР, КККР (SEQ ID NO:380) и Е.

66. Антигенсвязывающий белок по п. 32, который содержит на

С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

67. Антигенсвязывающий белок по п. 35, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

68. Антигенсвязывающий белок по п. 37, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

69. Антигенсвязывающий белок по п. 38, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

70. Антигенсвязывающий белок по п. 39, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

71. Антигенсвязывающий белок по п. 41, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

72. Антигенсвязывающий белок по п. 42, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

73. Антигенсвязывающий белок по п. 43, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

74. Антигенсвязывающий белок по п. 44, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

75. Антигенсвязывающий белок по п. 45, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

76. Антигенсвязывающий белок по п. 47, который содержит на С-конце Fc-домена аминокислотную последовательность, выбранную из KR, KKR, KKKR (SEQ ID NO:380) и E.

77. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывает PCSK9, при этом содержит последовательности тяжелой и легкой цепей полипептида, связывающего PCSK-9, кроме этого, указанный антигенсвязывающий белок содержит группу замен,

выбранных из представленных на фигуре 10:

- a. T82R, R94S и S95R в тяжелой цепи,
- b. S59K, T82R, R94S и S95R в тяжелой цепи,
- c. T82R, R94S и S95R в тяжелой цепи и G13L в легкой цепи, и
- d. S59K, T82R, R94S и S95R в тяжелой цепи и G13L в легкой цепи; где аминокислоты пронумерованы в соответствии с системой нумерации Aho.

78. Антигенсвязывающий белок по п. 77, где полипептид, связывающий PCSK-9, содержит последовательности тяжелой и легкой цепей антитела АК, представленного на фигуре 1B (SEQ ID NO: 134 и 136).

79. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывает PCSK9, при этом содержит последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 136) антитела АК, представленного на фигуре 1B, кроме того, указанная тяжелая цепь содержит одну или несколько замен из I253A, S440K или K439E, где аминокислоты пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

80. Антигенсвязывающий белок по п. 77, где тяжелая цепь дополнительно содержит одну или несколько замен из I253A, S440K или K439E, где аминокислоты пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

81. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывает PCSK9, при этом содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 352, 353 и 354.

82. Антигенсвязывающий белок по п. 81, дополнительно содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 351 и 367.

83. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывает c-fms, при этом содержит последовательности тяжелой и легкой цепей антитела A0, представленного на фигуре 1B (SEQ ID NO: 150 и 152), кроме того, указанный антигенсвязывающий белок содержит группу замен, выбранных из представленных на фигуре 10:

- a. T82R, R94S и S95R в тяжелой цепи,
- b. S59K, T82R, R94S и S95R в тяжелой цепи,
- c. T82R, R94S и S95R в тяжелой цепи и V13L в легкой цепи, и
- d. S59K, T82R, R94S и S95R в тяжелой цепи и V13L в легкой цепи

цепи; где аминокислоты пронумерованы в соответствии с системой нумерации Aho.

84. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывает c-fms, при этом содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 356, 357 и 358.

85. Антигенсвязывающий белок по п. 84, дополнительно содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 355.

86. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывает GIPR, при этом содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 359, 361, 362, 364 и 368.

87. Антигенсвязывающий белок по п. 86, дополнительно содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 360, 363, 365 и 367.

88. Антигенсвязывающий белок по п. 24, где:

а. антигенсвязывающий белок содержит замену 440X<sup>16</sup> по сравнению с исходным антителом, в котором отсутствует замена 440X<sup>16</sup>,

б. антигенсвязывающий белок достигает максимальной концентрации в сыворотке после подкожной инъекции быстрее, чем исходное антитело, если антигенсвязывающий белок и исходное антитело вводятся в одной и той же концентрации, и

с. антигенсвязывающий белок достигает максимальной концентрации в сыворотке после подкожной инъекции, которая выше, чем концентрация исходного антитела, если антигенсвязывающий белок и исходное антитело вводятся в одной и той же концентрации.

89. Антигенсвязывающий белок по п. 88, где антигенсвязывающий белок по п. 88 достигает максимальной концентрации в сыворотке в по меньшей мере приблизительно два раза быстрее, чем исходное антитело.

90. Антигенсвязывающий белок по п. 88, где антигенсвязывающий белок по п. 88 достигает максимальной концентрации в сыворотке, на по меньшей мере приблизительно 25% превышающей концентрацию исходного антитела.

91. Антигенсвязывающий белок по п. 88, где исходное

антитело представляет собой полипептид, связывающий PCSK-9.

92. Антигенсвязывающий белок по п. 88, где исходное антитело представляет собой антитело АК, представленное на фигуре 1B (SEQ ID NO: 134 и 136).

93. Антигенсвязывающий белок по п. 88, где X<sup>16</sup> представляет собой К.

94. Антигенсвязывающий белок по п. 89, где X<sup>16</sup> представляет собой К.

95. Антигенсвязывающий белок по п. 90, где X<sup>16</sup> представляет собой К.

96. Антигенсвязывающий белок по п. 91, где X<sup>16</sup> представляет собой К.

97. Антигенсвязывающий белок по п. 92, где X<sup>16</sup> представляет собой К.

98. Способ получения антигенсвязывающего белка, который достигает более высокой максимальной концентрации в сыворотке, чем исходное антитело, и достигает максимальной концентрации в сыворотке быстрее, чем исходное антитело, если и то и другое вводят в одной и той же концентрации, при этом включает введение модификации последовательности 440X<sup>16</sup> в исходное антитело, где X<sup>16</sup> выбран из R, K и H.

99. Способ по п. 98, где антигенсвязывающий белок достигает максимальной концентрации в сыворотке в по меньшей мере два раза быстрее, чем исходное антитело.

100. Способ по п. 98, где X<sup>16</sup> представляет собой К.

101. Способ по п. 99, где X<sup>16</sup> представляет собой К.

102. Способ по п. 98, где исходное антитело представляет собой полипептид, связывающий PCSK9.

103. Способ по п. 99, где исходное антитело представляет собой полипептид, связывающий PCSK9.

104. Способ по п. 100, где исходное антитело представляет собой полипептид, связывающий PCSK9.

105. Способ по п. 98, где исходный антигенсвязывающий белок представляет собой антитело АК, представленное на фигуре 1B (SEQ ID NO: 134 и 136).

106. Способ по п. 99, где исходный антигенсвязывающий белок

представляет собой антитело АК, представленное на фигуре 1В (SEQ ID NO: 134 и 136).

107. Способ по п. 100, где исходный антигенсвязывающий белок представляет собой антитело АК, представленное на фигуре 1В (SEQ ID NO: 134 и 136).

108. Способ лечения показания, связанного с PCSK9, у пациента, который включает введение антигенсвязывающего белка по п. 81.

109. Способ по п. 108, где показание, связанное с PCSK9, представляет собой гиперхолестеринемию.

110. Способ лечения показания, связанного с PCSK9, у пациента, который включает введение антигенсвязывающего белка по п. 82.

111. Способ по п. 110, где показание, связанное с PCSK9, представляет собой гиперхолестеринемию.

112. Способ лечения показания, связанного с PCSK9, у пациента, который включает введение антигенсвязывающего белка по п. 88.

113. Способ по п. 112, где показание, связанное с PCSK9, представляет собой гиперхолестеринемию.

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ снижения вязкости антигенсвязывающего белка, включающий внесение одной или нескольких модификаций в последовательность антигенсвязывающего белка, где:

а. если антигенсвязывающий белок включает подсемейство VN3|3-33 зародышевого типа, способ включает модификацию последовательности VN3 с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $1X^4$ ,  $17X^5$  и  $85X^6$ , где  $X^4$  выбран из D и E,  $X^5$  выбран из G, A, V, I, L и M, и W, и  $X^6$  выбраны из G, A, V, I, L и M;

б. если антигенсвязывающий белок включает подсемейство VK3|L16 зародышевого типа, способ включает модификацию последовательности VK3 с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $4X^{10}$ ,  $13X^{11}$ ,  $76X^{12}$ ,  $78F$ ,  $95X^{13}$ ,  $97X^{14}$  и  $98P$ , где  $X^{10}$  выбран из G, A, V, I, L и M,  $X^{11}$  выбран из G, A, V, I, L и M,  $X^{12}$  выбран из D и E,  $X^{13}$  выбран из R, K и H, и  $X^{14}$  выбран из D и E;

с. если антигенсвязывающий белок включает подсемейство VK3|L6 зародышевого типа, способ включает модификацию последовательности VK3 с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $76X^{12}$  и  $95X^{13}$ ;

д. антигенсвязывающий белок включает Fc-домен, и способ включает модификацию последовательности Fc-домена с включением одной или нескольких замен, выбранных из  $253X^{15}$ ,  $440X^{16}$  и  $439X^{17}$ , где  $X^{15}$  выбран из G, A, V, I, L и M,  $X^{16}$  выбран из R, K и H, и  $X^{17}$  выбран из D и E, где последовательность Fc-домена содержит только одну из  $440X^{16}$  и  $439X^{17}$ ; или

е. антигенсвязывающий белок включает Fc-домен, и способ включает модификацию С-конца последовательности Fc-домена, с включением  $X^{18}X^{19}$ , где  $X^{18}$  представляет собой от одной до четырех аминокислот, выбранных из D и E или из H, K и R, и  $X^{19}$  выбран из P, M, G, A, V, I, L, S, T, N, Q, F, Y и W и отсутствует, если  $X^{18}$  содержит D или E, присутствует, если  $X^{18}$  содержит K или R в своем С-концевом участке, и присутствует или отсутствует, если  $X^{18}$  содержит H в своем С-концевом участке;

где аминокислоты в подпунктах а, b и с пронумерованы в соответствии с системой нумерации Aho, а аминокислоты в подпункте d пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

2. Способ по п. 1, в котором антигенсвязывающий белок включает, кроме подвергнутых замене, последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно, выбранные из SEQ ID NO: 166 и 168; 2 и 4; 178 и 180; 170 и 172; 6 и 8; 10 и 12; 14 и 16; 18 и 20; 22 и 24; 26 и 28; 30 и 32; 34 и 36; 38 и 40; 43 и 44; 46 и 48; 50 и 52; 54 и 56; 58 и 60; 62 и 64; 66 и 68; 70 и 72; 74 и 76; 78 и 80; 82 и 84; 86 и 88; 90 и 92; 94 и 96; 98 и 100; 102 и 104; 106 и 108; 110 и 112; 118 и 120; 122 и 124; 126 и 128; 130 и 132; 158 и 160; 142 и 144; и 154 и 156.

3. Способ по п. 1, который включает модификацию последовательности VN3 антигенсвязывающего белка, содержащего подсемейство VN3|3-33 зародышевого типа, с включением одной или нескольких замен, выбранных из 1E, 17G и 85A

4. Способ по п. 3, в котором антигенсвязывающий белок, кроме подвергнутых замене, содержит аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела AQ, AM, AI или AG, представленного на фиг. 1B (SEQ ID NO: 158 и 160; 142 и 144; 126 и 128 или 118 и 120, соответственно).

5. Способ по п. 1, который включает модификацию последовательности VK3|L16 антигенсвязывающего белка с включением одной или нескольких замен, выбранных из 4L, 13L, 76D, 78F, 95R, 97E и 98P.

6. Способ по п. 5, в котором антигенсвязывающий белок, кроме подвергнутых замене, содержит аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела AF или AQ, представленного на Фигуре 1B (SEQ ID NO: 114 и 116; или 158 и 160, соответственно).

7. Способ по п. 1, который включает модификацию последовательности VK3|L6 антигенсвязывающего белка с включением одной или нескольких замен, выбранных из 76D и 95R.

8. Способ по п. 7, в котором антигенсвязывающий белок, кроме подвергнутых замене, содержит аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела AJ, представленного на фигуре 1B (SEQ ID NO: 130 и 132, соответственно).

9. Способ по п. 1, который включает модификацию последовательности домена Fc с включением одной или нескольких замен, выбранных из 253A, 440K и 439E, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.

10. Способ по п. 9, в котором антигенсвязывающий белок содержит, кроме подвергнутых замене, аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела VA, AH или AN (SEQ ID NO: 174 и 176; 122 и 124; или 146 и 148, соответственно).

11. Способ по п. 1, который включает модификацию C-конца Fc-домена с включением аминокислотной последовательности, выбранной из KP, KKP, KKKP (SEQ ID NO: 380) и E.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где антигенсвязывающий белок представляет собой антитело IgG.

Мишень (неофициальное название)	mAb	Конц. мг/мл	Вязк. сП	Тип HC (включая аллотипы)	Тип LC	Зароды- шевый тип VL	Зароды- шевый тип VH	pl	SEQ ID NO HC	SEQ ID NO LC
Антитело к амилоиду	A	142,2	5,0	IgG1 (f) (R;EM)	Каппа	VK2 A23	VH2 2-26	9,0	168	166
GMCSF (247)	B	139,7	5,6	IgG2	Каппа	VK3 A27	VH1 1-02	8,7	4	2
CGRPR	C	136,6	6,3	IgG2	Лямбда	VL1 1g	VH3 3-15	8,6	180	178
RANKL	D	152,7	6,6	IgG2	Каппа	VK3 A27	VH3 3-23	8,6	172	170
Склеростин (27H6)	E	145,0	6,7	IgG2	Каппа	VK2 O1	VH3 3-48	6,6	8	6
IL-1R1	F	153,9	6,7	IgG2	Каппа	VK6 A10	VH5 5-51	7,4	12	10
Миостатин	G	141,0	6,8	IgG1 (z) (K;EM)	Каппа	VK1 O18	VH3 3-07	8,7	16	14
B7RP1	H	137,5	7,7	IgG2	Каппа	VK1 L15	VH3 3-07	7,7	20	18
Амилоид	I	140,6	8,2	IgG1 (za) (K;DL)	Каппа	VK2 A17	VH2 2-70	8,7	24	22
GMCSF (3.112)	J	156,0	8,2	IgG2	Каппа	VK3 A27	VH1 1-02	8,8	28	26
CGRP (32H7)	K	159,5	8,3	IgG2	Каппа	VK3 A27	VH3 3-33	8,7	32	30
CGRP (3B6.2)	L	161,1	8,4	IgG2	Лямбда	VL3 3l	VH1 1-02	8,6	36	34
PCSK9 (8A3.1)	M	150,0	9,1	IgG2	Каппа	VK2 A19	VH3 3-07	6,7	40	38
PCSK9 (492)	N	150,0	9,2	IgG2	Каппа	VK2 A19	VH3 3-07	6,9	44	42
CGRP	O	155,2	9,6	IgG2	Лямбда	VL1 1b	VH3 3-33	8,8	48	46
Гепцидин	P	147,1	9,9	IgG2	Лямбда	VL3 3r	VH3 3-33	7,3	52	50
TNFR p55 )	Q	157,0	10,0	IgG2	Каппа	VK3 A27	VH3 3-23	8,2	56	54
OX40L	R	144,5	10,0	IgG2	Каппа	VK2 A23	VH3 3-33	8,7	60	58
HGF	S	155,8	10,6	IgG2	Каппа	VK3 L16	VH4 4-59	8,1	64	62
GMCSF	T	162,5	11,0	IgG2	Каппа	VK4 B3	VH1 1-02	8,1	68	66
Глюкагон R	V	146,0	12,1	IgG2	Каппа	VK1 A30	VH3 3-33	8,4	72	70
GMCSF (4.381)	U	144,5	12,1	IgG2	Каппа	VK3 A27	VH1 1-02	8,4	76	74

Мишень (неофициальное название)	mAb	Конц. мг/мл	Вязк. сП	Тип HC (включая аллотипы)	Тип LC	Зароды- шевый тип VL	Зароды- шевый тип VH	pI	SEQ ID NO HC	SEQ ID NO LC
Склеростин (13F3)	W	155,0	12,1	IgG2	Капша	VK1 L19	VH1 1-46	7,8	80	78
CD-22	X	143,7	12,2	IgG1 (f) (R;EM)	Капша	VK1 O18	VH1 1-69	8,8	84	82
INFR	Y	154,2	12,2	IgG1 (za) (K;DL)	Капша	VK3 A27	VH5 5-51	8,8	88	86
Ang2	Z	151,5	12,4	IgG2	Капша	VK2 A19	VH3 3-48	7,4	92	90
TRAILR2	AA	158,3	12,5	IgG1 (f) (R;EM)	Капша	VK3 A27	VH4 4-30	8,7	96	94
EGFR	AB	141,7	14,0	IgG2	Капша	VK1 O18	VH4 4-61	6,8	100	98
IL-4R	AC	145,8	15,2	IgG2	Капша	VK3 A27	VH3 3-48	8,6	104	102
IL-15	AD	149,0	16,3	IgG1 (f) (R;EM)	Капша	VK3 A27	VH5 5-51	8,8	108	106
IGF1R	AE	159,2	17,3	IgG1 (za) (K;DL)	Капша	VK2 A19	VH4 4-04	8,6	112	110
IL-17R	AF	150,9	19,1	IgG2	Капша	VK3 L16	VH1 1-18	8,6	116	114
Dkk1 (6.37.5)	AG	159,4	19,6	IgG2	Капша	VK2 A2	VH3 3-33	8,2	120	118
Склеростин	AH	134,8	20,9	IgG2	Капша	VK1 O2	VH1 1-e	7,4	124	122
TSLP	AI	134,2	21,4	IgG2	Лямбда	VL3 3h	VH3 3-33	7,2	128	126
Dkk1 (11H10)	AJ	145,3	22,5	IgG2	Капша	VK3 L6	VH3 3-48	8,2	132	130
PCSK9	AK	145,2	22,8	IgG2	Лямбда	VL2 2a2	VH1 1-18	8,1	136	134
GIPR (2G10.006)	AQ	150,0	19,1	IgG1 (z) (K;EM)	Капша	VK3 L16	VH3 3-33	8,1	160	158
Активин	AL	133,9	29,4	IgG2	Лямбда	VL3 3r	VH1 1-18	7,0	140	138
Склеростин (2B8)	AM	150,0	30,0	IgG2	Лямбда	VL6 6a	VH3 3-33	6,7	144	142
Склеростин	AN	141,4	30,4	IgG2	Капша	VK1 O2	VH1 1-18	6,8	148	146
c-fms	AO	146,9	32,1	IgG2	Капша	VK4 B3	VH1 1-18	6,6	152	150
$\alpha 4\beta 7$	AP	154,9	32,7	IgG2	Капша	VK1 L19	VH1 1-24	6,5	156	154

ФИГУРА 1B

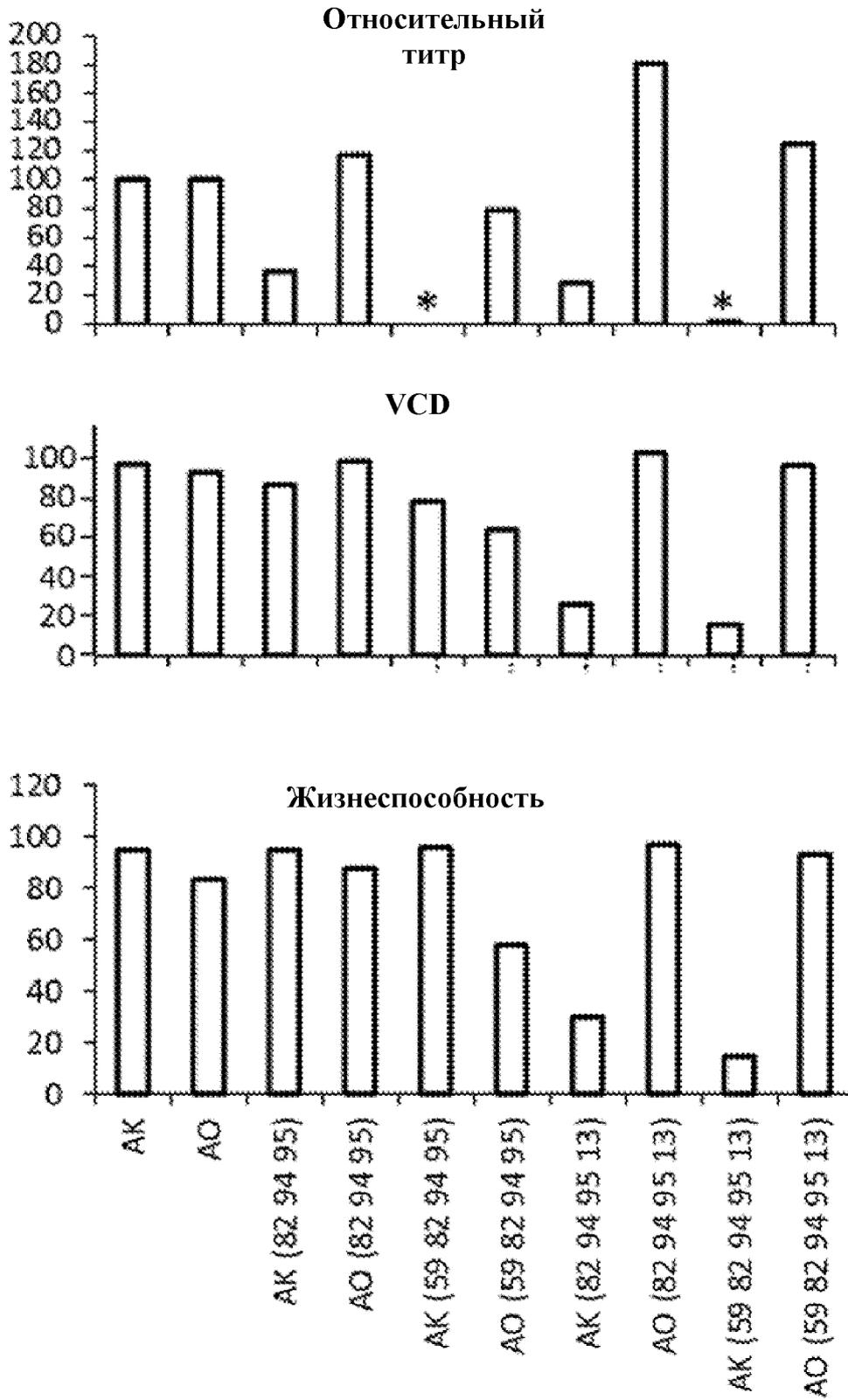
Мишень (неофициальное название)	mAb	SEQ ID NO							
		HC FR1	HC FR2	HC FR3	HC FR4	LC FR1	LC FR2	LC FR3	LC FR4
Антитело к амилоиду	A	280	281	282	283	189	190	191	192
GMCSF (247)	B	300	285	301	276	197	194	198	196
CGRPR	C	316	317	318	287	257	258	259	250
RANKL	D	291	292	293	276	193	194	195	196
Склеростин (27H6)	E	304	292	349	276	246	225	226	188
IL-1R1	F	277	278	279	276	185	186	187	188
Миостатин	G	304	289	346	287	205	206	219	231
B7RP1	H	304	289	305	276	205	229	207	196
Амилоид	I	333	281	334	276	235	236	226	237
GMCSF (3.112)	J	344	285	345	283	193	194	201	196
CGRP (32H7)	K	302	289	338	287	193	194	198	231
CGRP (3B6.2)	L	299	285	339	287	266	267	268	269
PCSK9 (8A3.1)	M	304	289	315	287	227	225	226	188
PCSK9 (492)	N	304	289	314	287	227	225	228	188
CGRP	O	302	289	306	287	254	255	256	250
Гепцидин	P	302	289	303	283	263	264	265	250
TNFR p55 )	Q	291	292	293	276	193	199	198	196
OX40L	R	302	289	303	276	189	190	213	214
HGF	S	273	274	275	276	181	182	183	184
GMCSF	T	299	285	301	276	215	211	216	217
Глюкагон R	V	302	289	310	287	205	222	223	188
GMCSF (4.381)	U	299	285	301	276	193	202	203	204

Мишень (неофициальное название)	mAb	SEQ ID NO							
		HC FR1	HC FR2	HC FR3	HC FR4	LC FR1	LC FR2	LC FR3	LC FR4
Склеростин (13F3)	W	347	285	348	276	208	245	207	214
CD-22	X	307	308	309	287	218	206	219	220
INF $\gamma$ R	Y	329	330	331	332	193	194	198	214
Ang2	Z	326	292	305	276	227	225	226	231
TRAILR2	AA	319	320	321	287	193	200	198	196
EGFR	AB	335	336	337	283	205	206	221	188
IL-4R	AC	304	292	305	276	193	194	198	196
IL-15	AD	322	323	324	276	193	194	198	230
IGF1R	AE	311	312	313	283	224	225	226	196
IL-17R	AF	299	285	328	276	181	232	233	188
Dkk1 (6.37.5)	AG	302	289	341	276	240	241	242	243
Склеростин	AH	294	285	295	276	205	206	207	196
TSLP	AI	288	289	290	283	251	252	253	250
Dkk1 (11H10)	AJ	340	292	305	287	238	194	239	231
PCSK9	AK	284	285	286	287	247	248	249	250
GIPR (2G10.006)	AQ	302	342	303	276	181	194	234	188
Активин	AL	299	285	325	283	260	261	262	250
Склеростин (2B8)	AM	302	289	303	287	270	271	272	250
Склеростин	AN	327	285	328	287	205	206	207	188
c-fms	AO	299	285	328	276	210	211	212	214
$\alpha$ 4 $\beta$ 7	AP	296	297	298	276	208	206	209	196
c-kit	BA	299	285	295	276	210	211	212	188

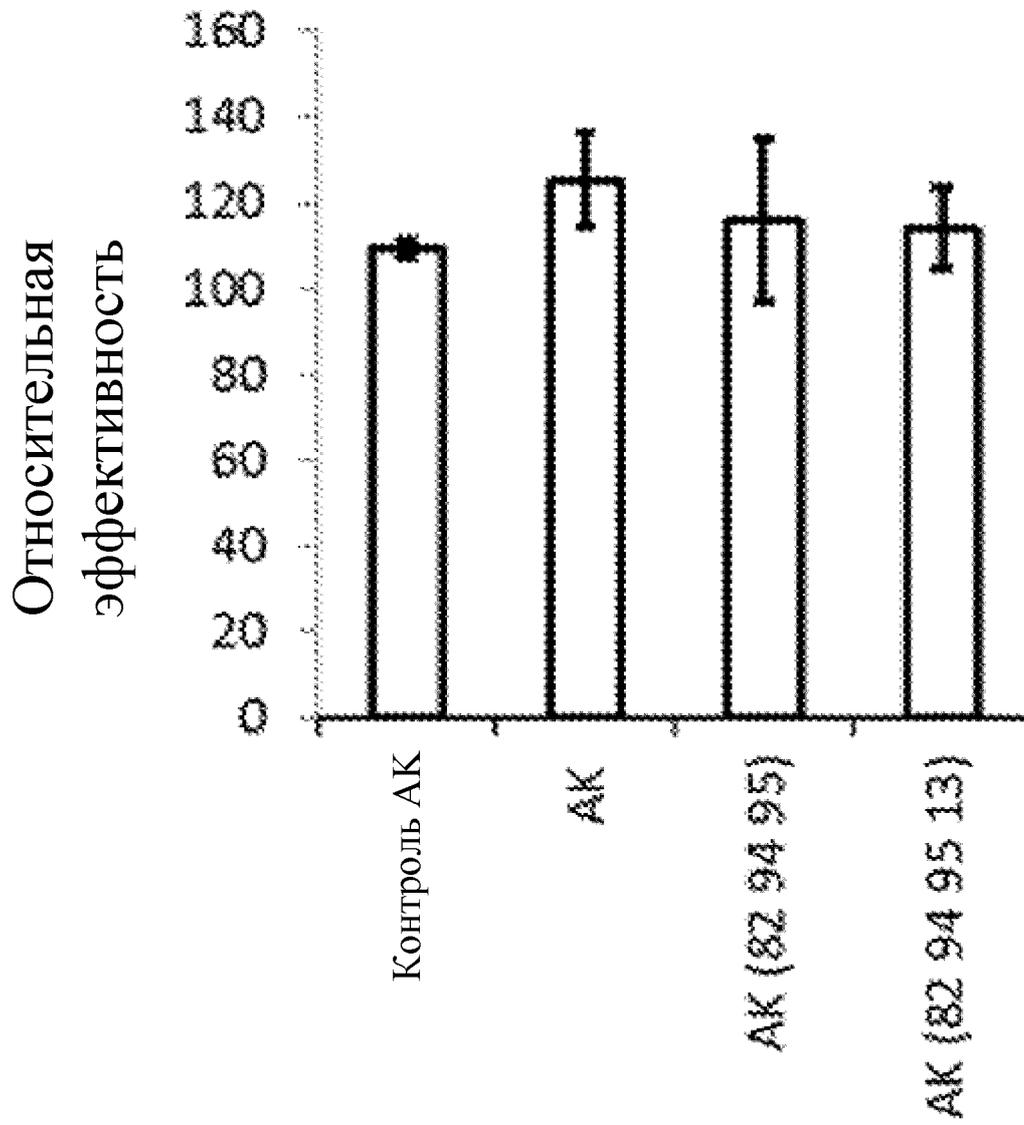
Цель	Подсемейство, высокая вязкость	Подсемейство, низкая вязкость	p-значение	Остатки в подсемействе с высокой вязкостью, положения согласно нумерации Aho, остатки в подсемействе с низкой вязкостью				
				FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
Тяж.	VH1 1-18	VH1 1-02	0,0002		S33G, G40Y, S42H		S59N, Y61N, N65S, N67G,	T82R, T86I, R94S, S95R
Тяж.	VH3 3-33	VH3 3-07	0,076	Q1E, R17G	G40W, M41_, H42S		V57S/Q, W/S59K/R, Y60Q, N67E	S85A
Легк.	VK3 L16	VK3 A27	0,031	M4L, V13L	_33S		D58G	A76D, S95R, Q97E, S98P

ФИГУРА 2

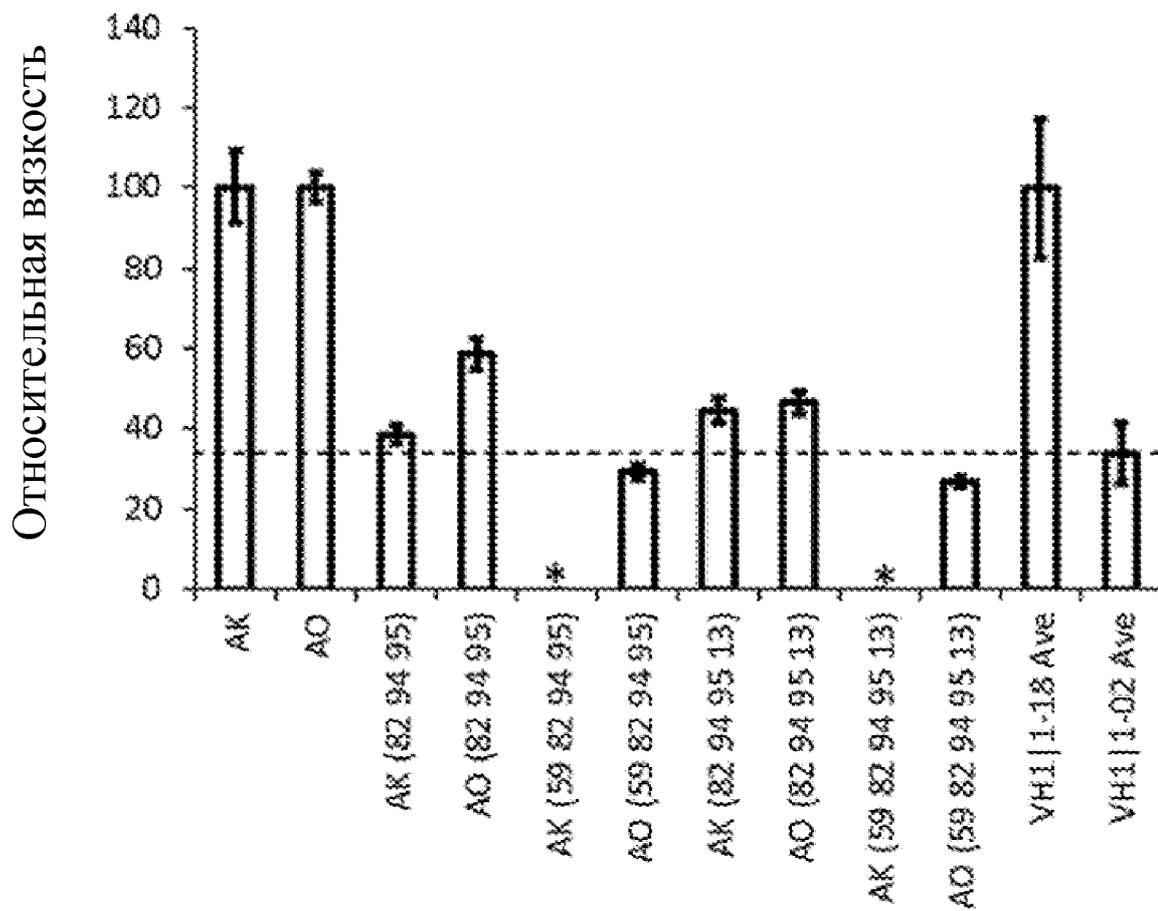
6/28



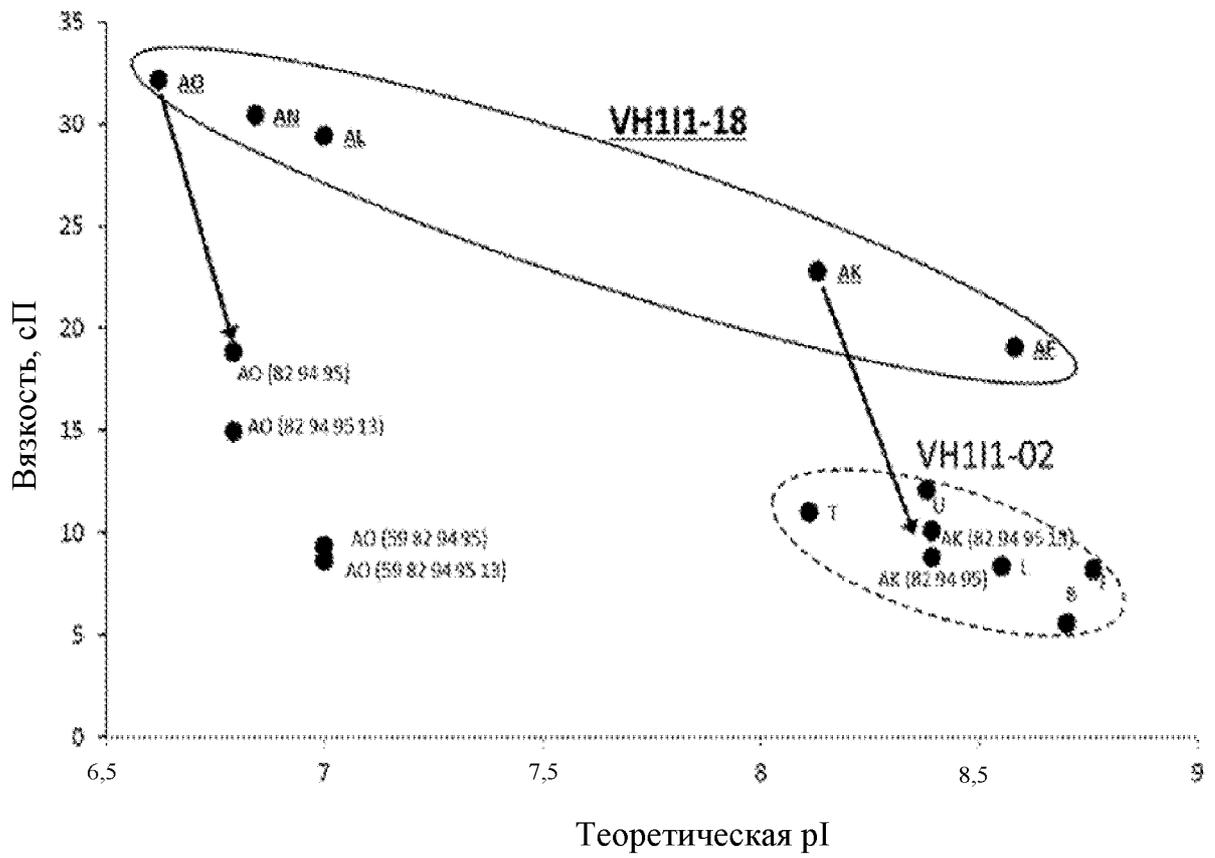
ФИГУРА 3



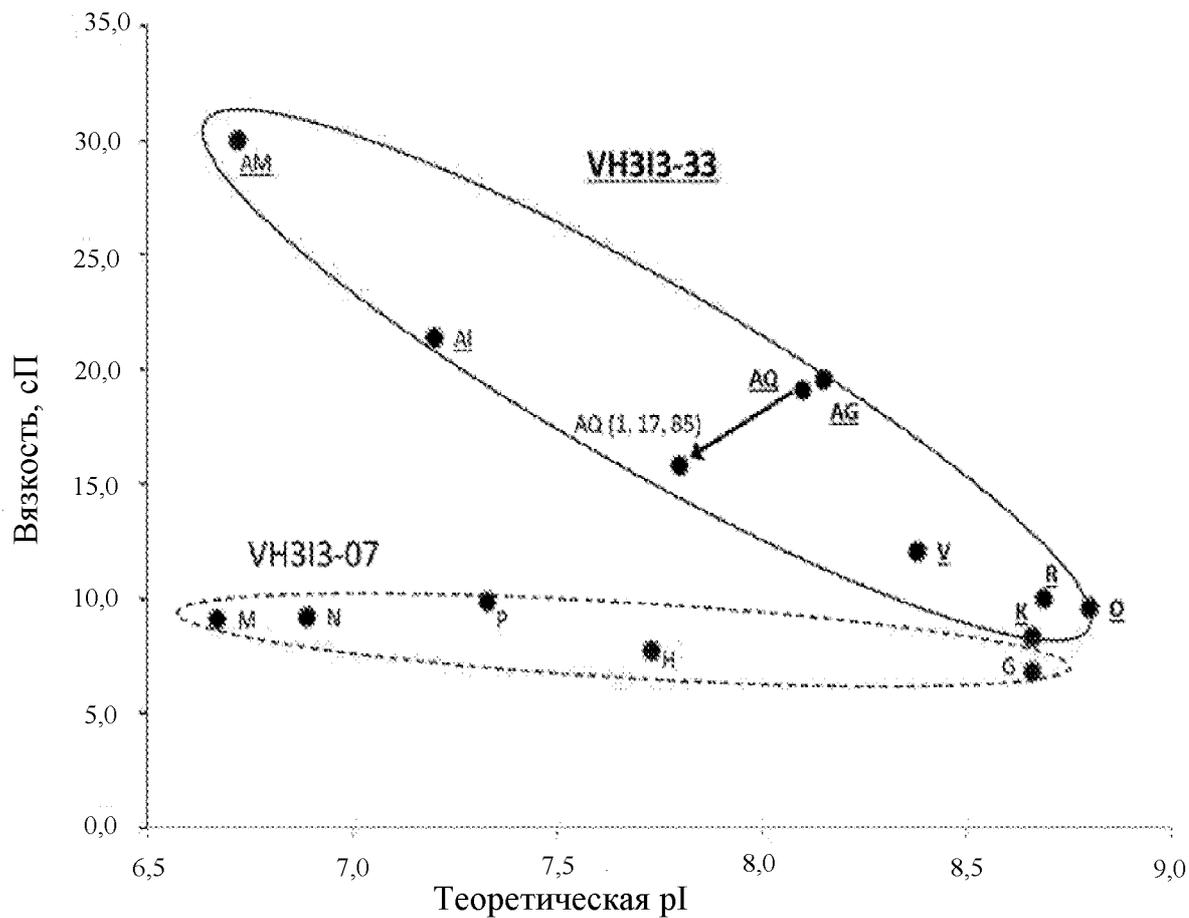
ФИГУРА 4



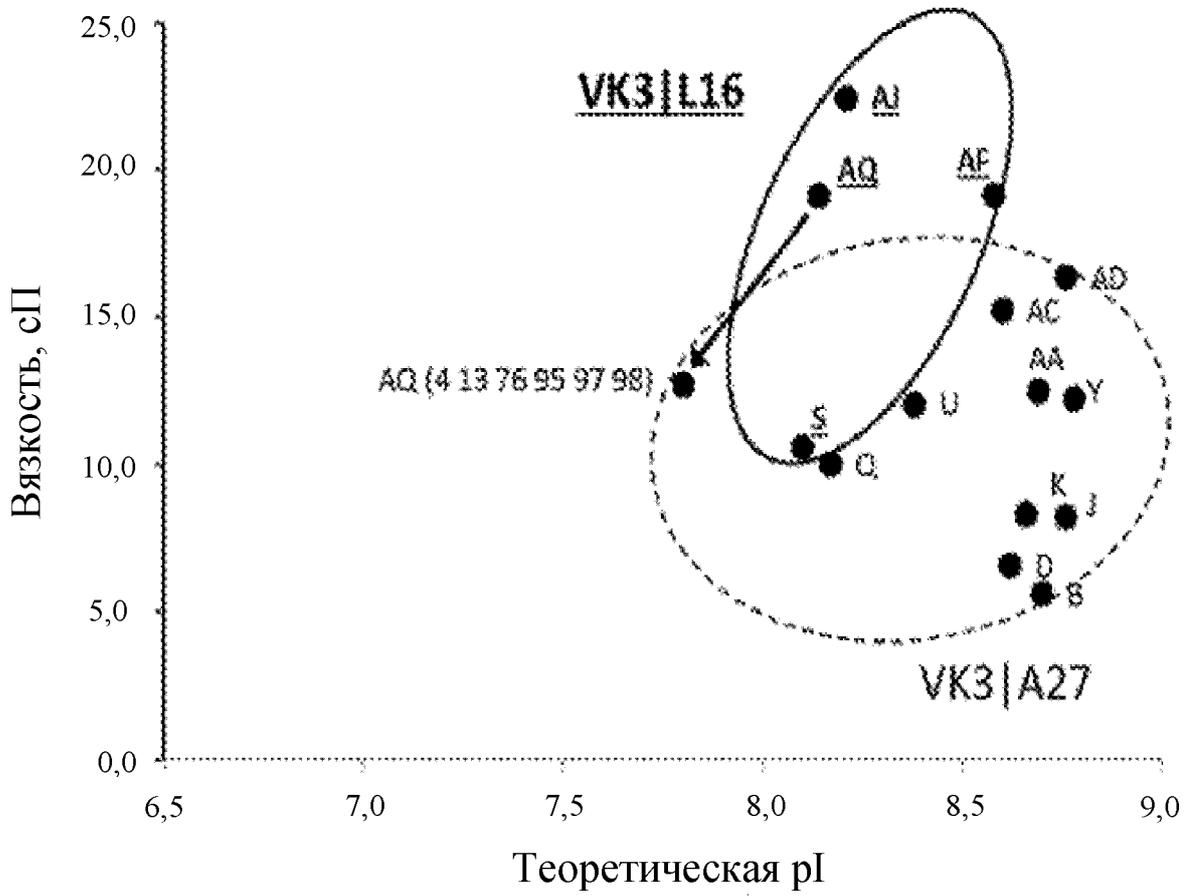
ФИГУРА 5



ФИГУРА 6



ФИГУРА 7



ФИГУРА 8

Общие параметры последовательностей VH1 1-18 и VH1 1-02					CDR1			CDR2				FR3									
					32	33	35	52	53	54	55	57	67	68	69	70	71	72	73	74	75
					31	33	35	52	a	53	54	56	66	67	68	69	70	71	72	73	74
mAb	Вязк, сП	PI	VL	VH1	33	40	42	59	60	61	65	67	77	78	79	80	81	82	83	84	85
VBase				VH1 1-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S
B	5,6	8,7	VK3 A27	VH1 1-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S
J	8,2	8,8	VK3 A27	VH1 1-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S
L	8,4	8,6	VL3 3i	VH1 1-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S
T	11,0	8,1	VK4 B3	VH1 1-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S
U	12,1	8,4	VK3 A27	VH1 1-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S
AF	19,1	8,6	VK3 L16	VH1 1-18	R	G	S	S	I	Y	S	N	R	V	T	M	T	I	D	T	S
AK	22,8	8,1	VL2 2a2	VH1 1-18	S	G	S	S	F	Y	N	N	R	G	T	M	T	I	D	P	S
AL	29,4	7,0	VL3 3r	VH1 1-18	S	G	S	I	P	Y	N	N	R	V	T	M	T	I	D	T	S
AN	30,4	6,8	VK1 D2	VH1 1-18	D	N	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	I	D	T	S
AQ	32,1	6,6	VK4 B3	VH1 1-18	S	G	S	S	A	Y	N	N	R	V	T	M	T	I	D	T	S
Vbase				VH1 1-18	S	G	S	S	A	Y	N	N	R	V	T	M	T	I	D	T	S
p-значен.	0,0002	0,03																			

FR3																		VH	VL	Схема					
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	52	12	EU
75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	50	13	Kabat
75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	52	13	Chothia
86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	59	13	Aho
I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R			
I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	L	
I	S	T	A	S	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	F	C	A	R	N	L	
I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	F	C	A	R	N	V	
I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	V	
I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	L	
I	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	V	
I	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	G	
T	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	F	C	A	R	I	V	
T	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	A	
I	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	V	
I	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R			

ФИГУРА 9

Обозначения мутантов	Мутации тяжелой цепи	Мутации легкой цепи
AK	AK HC	AK LC
AK (82 94 95)	AK HC: [T82R, R94S, S95R]	AK LC
AK (59 82 94 95)	AK HC: [S59K, T82R, R94S, S95R]	AK LC
AK (82 94 95 13)	AK HC: [T82R, R94S, S95R]	AK LC: [G13L]
AK (59 82 94 95 13)	AK HC: [S59K, T82R, R94S, S95R]	AK LC: [G13L]
AO	AO HC	AO LC
AO (82 94 95)	AO HC: [T82R, R94S, S95R]	AO LC
AO (59 82 94 95)	AO HC: [S59K, T82R, R94S, S95R]	AO LC
AO (82 94 95 13)	AO HC: [T82R, R94S, S95R]	AO LC: [V13L]
AO (59 82 94 95 13)	AO HC: [S59K, T82R, R94S, S95R]	AO LC: [V13L]

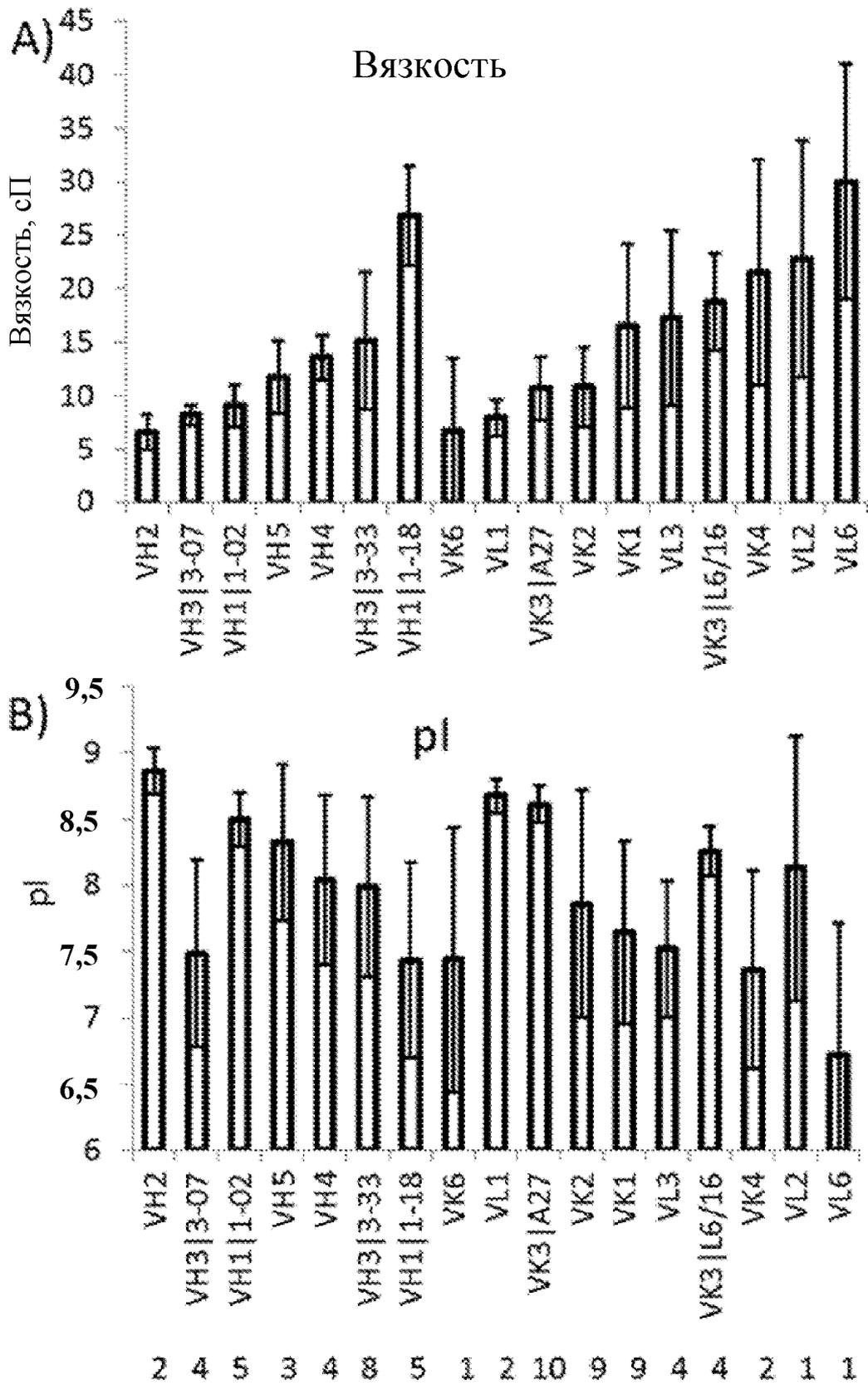
ФИГУРА 10

Общие параметры последовательностей VH3β-07 и VH3β-33					FR1		CDR1			CDR2				FR3	Схема
					1	16	33	34	35	50	52	53	57	75	EU
					1	16	33	34	35	50	52	52a	56	74	Kabat
					1	16	33	34	35	50	52	52a	56	74	Chothia
mAb	Вязк., сП	pI	VL	VH3	1	17	40	41	42	57	59	60	67	85	Aho
VBase				VH3β-07	E	G	W	M	S	N	K	Q	E	A	
G	6,8	8,7	VK1 O18	VH3β-07	E	G	W		N	Q	R	L	A	A	
H	7,7	7,7	VK1 L15	VH3β-07	E	G	W		S	Y	K	Q	E	A	
<u>K</u>	8,3	8,7	VK3 A27	<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	
M	9,1	6,7	VK2 A19	VH3β-07	E	G	W		S	S	K	Q	E	A	
N	9,2	6,9	VK2 A19	VH3β-07	E	G	W		S	S	K	Q	E	A	
<u>O</u>	9,6	8,8	VL1 1b	<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	
<u>P</u>	9,9	7,3	VL3 3r	<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	
<u>R</u>	10,0	8,7	VK2 A23	<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	
<u>V</u>	12,1	8,4	VK1 A30	<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	
<u>AG</u>	19,6	8,2	VK2 A2	<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	
<u>AI</u>	21,4	7,2	VL3 3h	<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	
<u>AQ</u>	19,1	8,1	VK3 L16	<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	
<u>AM</u>	30,0	6,7	VL6 6a	<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	
<u>VBase</u>				<u>VH3β-33</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	
p-значен.	0,076	0,300													

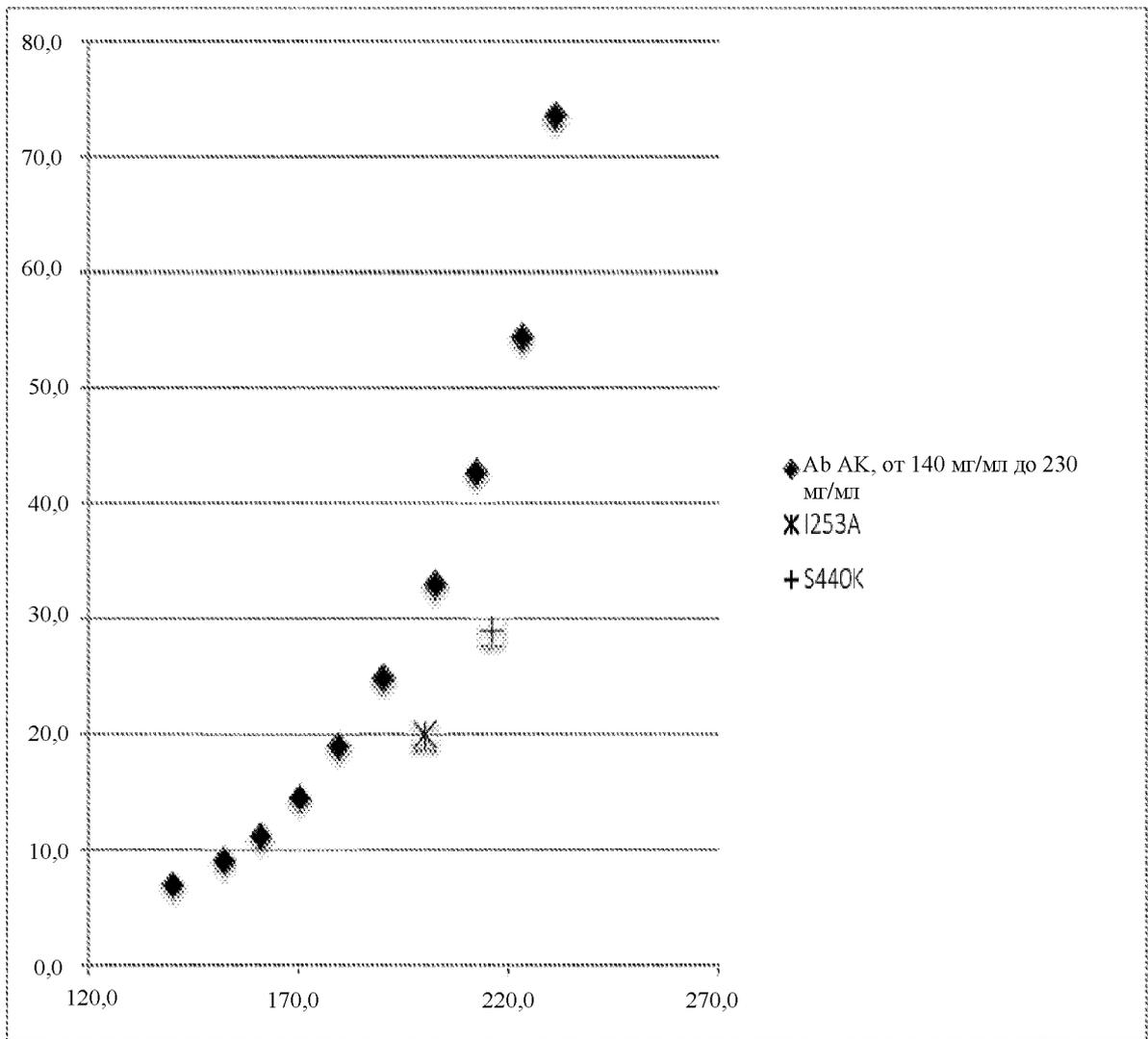
ФИГУРА 11

Общие параметры последовательностей VK3 A27 and VK3 L					FR1		CDR1		CDR2	FR3				Схема
					4	12	31	33	51	66	85	87	88	EU
					4	12	31	33	51	65	82b	83	84	Kabat
					4	12	31	33	51	65	82b	83	84	Chothia
mAb	Вязк., сП	pI	VH	VK3	4	13	33	40	58	76	95	97	98	Aho
VBase				VK3 A27	L	L	S	Y	G	D	R	E	P	
B	5,6	8,7	VH1 1-02	VK3 A27	L	L	S	Y	G	D	R	E	P	
D	6,6	8,6	VH3 3-23	VK3 A27	L	L	G	Y	G	D	R	E	P	
J	8,2	8,8	VH1 1-02	VK3 A27	L	L	S	Y	G	D	R	E	P	
K	8,3	8,7	VH3 3-33	VK3 A27	L	L	S	Y	G	D	R	E	P	
Q	10,0	8,2	VH3 3-23	VK3 A27	L	L	S	Y	G	D	R	E	P	
<b>S</b>	10,6	8,1	VH4 4-59	<b>VK3 L16</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	-	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	
U	12,1	8,4	VH1 1-02	VK3 A27	L	L	N	Y	G	D	R	E	P	
Y	12,2	8,8	VH5 5-51	VK3 A27	L	L	S	Y	G	D	R	E	P	
AA	12,5	8,7	VH4 4-30	VK3 A27	L	L	R	Y	G	D	R	E	P	
AC	15,2	8,6	VH3 3-48	VK3 A27	L	L	N	Y	G	D	R	E	P	
AD	16,3	8,8	VH5 5-51	VK3 A27	L	L	S	Y	G	D	R	E	P	
<b>AF</b>	19,1	8,6	VH1 1-18	<b>VK3 L16</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	-	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	
<b>AJ</b>	22,5	8,2	VH3 3-48	<b>VK3 L6</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	-	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>P</b>	
<b>AQ</b>	19,1	8,1	VH3 3-33	<b>VK3 L16</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	-	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	
<b>Vbase</b>				<b>VK3 L16</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	-	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	
p- значен.	0,007	0,011												

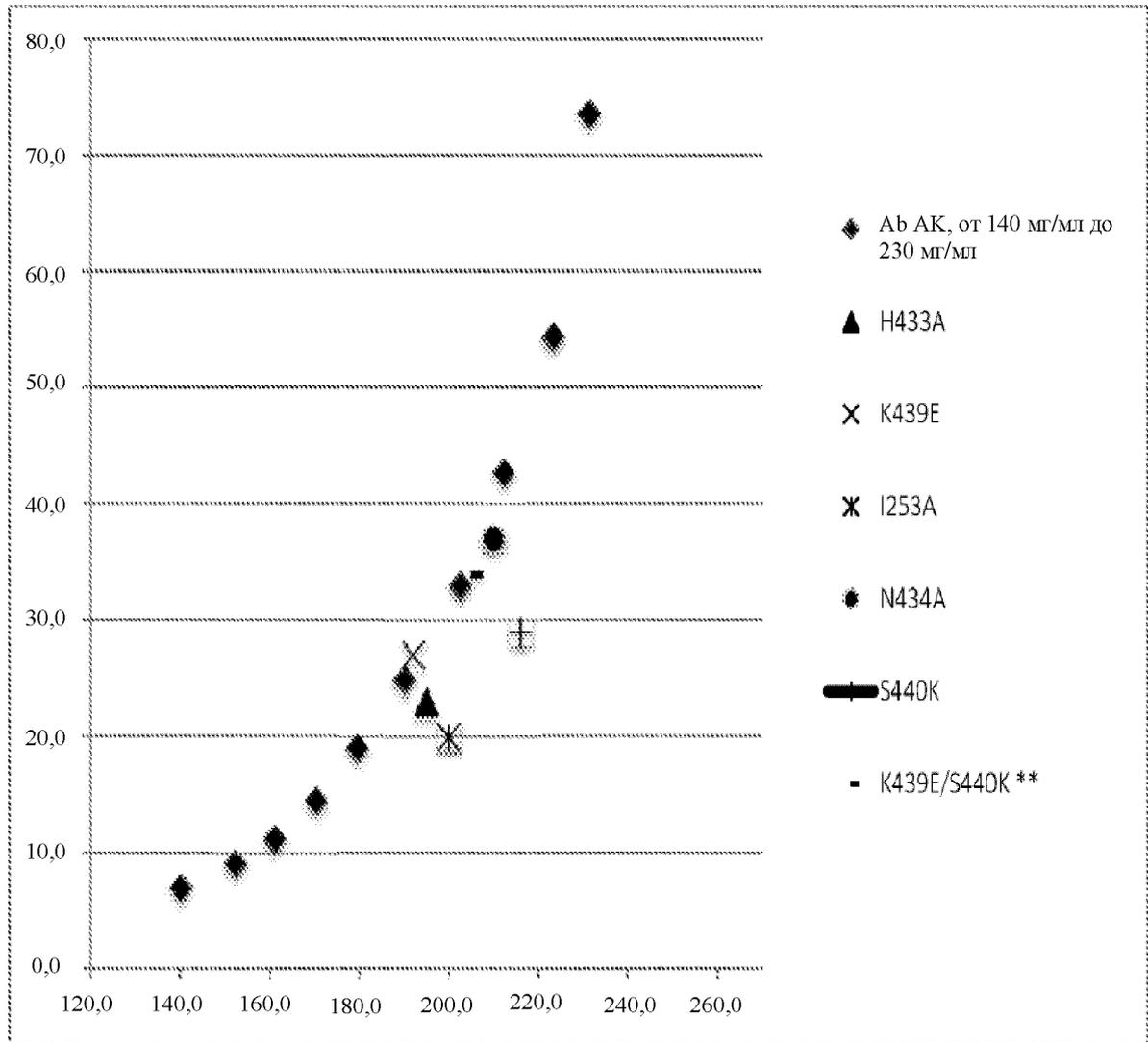
ФИГУРА 12



ФИГУРА 13



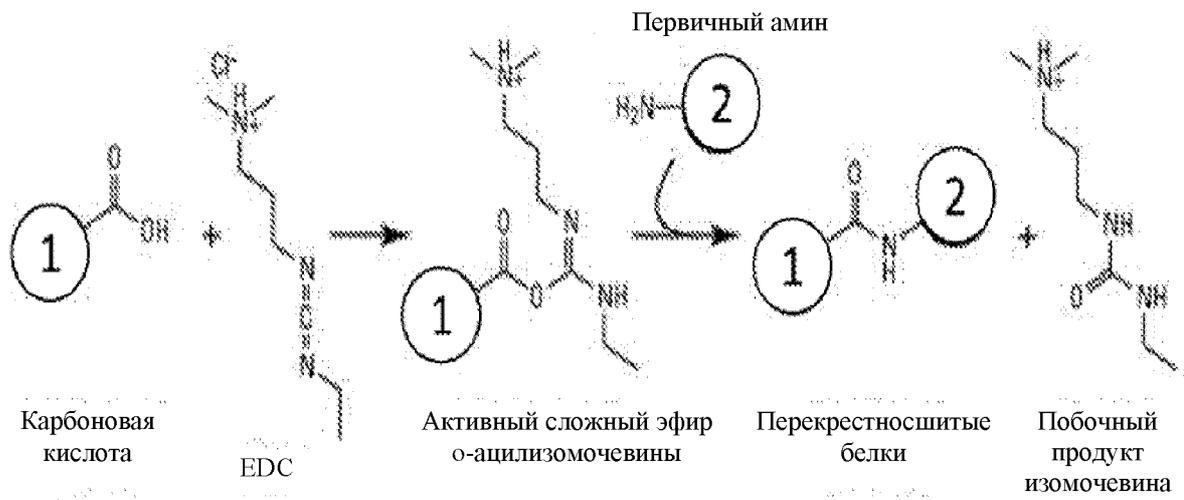
ФИГУРА 14А



ФИГУРА 14В

Образец	Вязкость (сП) при $1000 \text{ с}^{-1}$ при $25^\circ\text{C}$	Относительная вязкость
Антитело АК	43,7	100%
Fab-мутант	25,6	59%
Fc-мутант	34,8	80%
Двойной мутант	22,6	52%

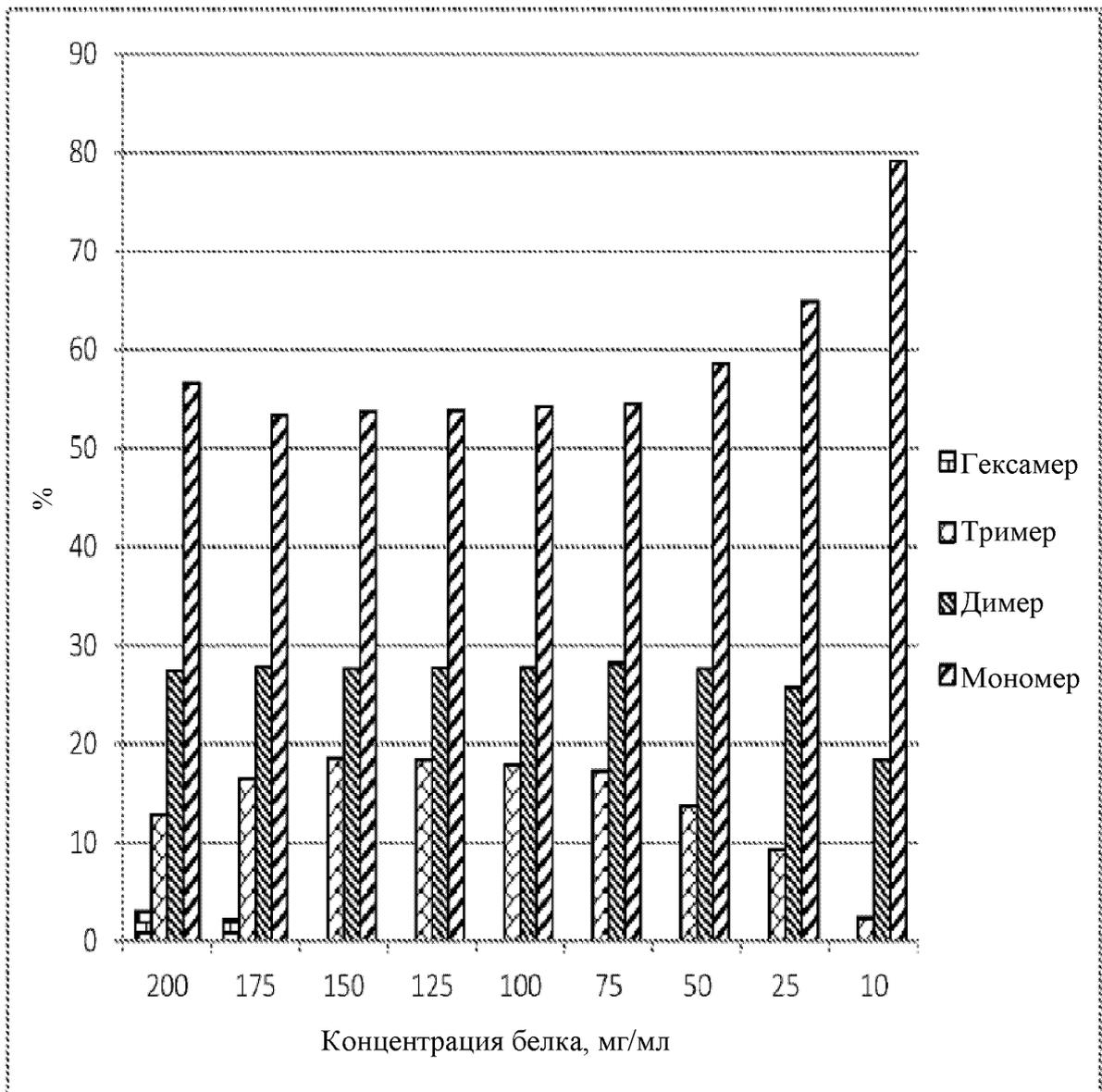
ФИГУРА 15



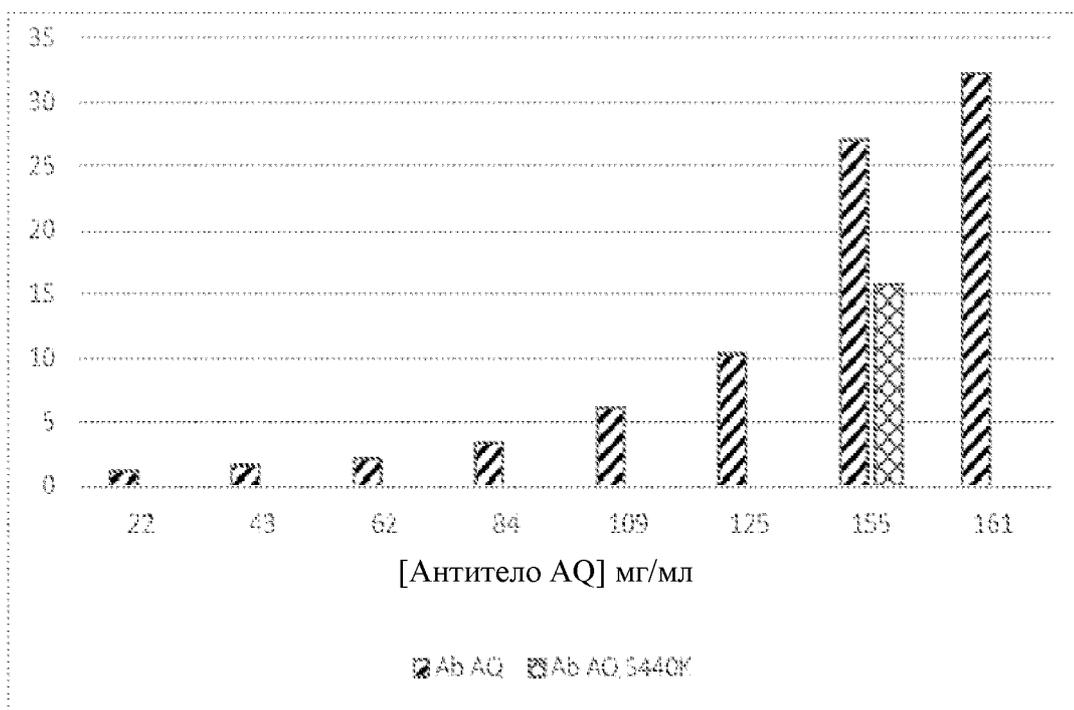
ФИГУРА 16

Белок	Мишень	Мономер	Димер	Другие	Вязкость при 150 мг/мл при 25°C
ASA1		Да	Да	Нет	~ 2-4 сП в А5
ASA2		Да	Да	Нет	~ 2-4 сП в А5
Ab BA	C-kit	Да	Да	Да	~ 50 сП в А52Su
Ab AN	Склеростин	Да	Да	Да	~ 22 сП в А52Su
Ab AN	Склеростин	Да	Да	Да	~ 30 сП в А52Su

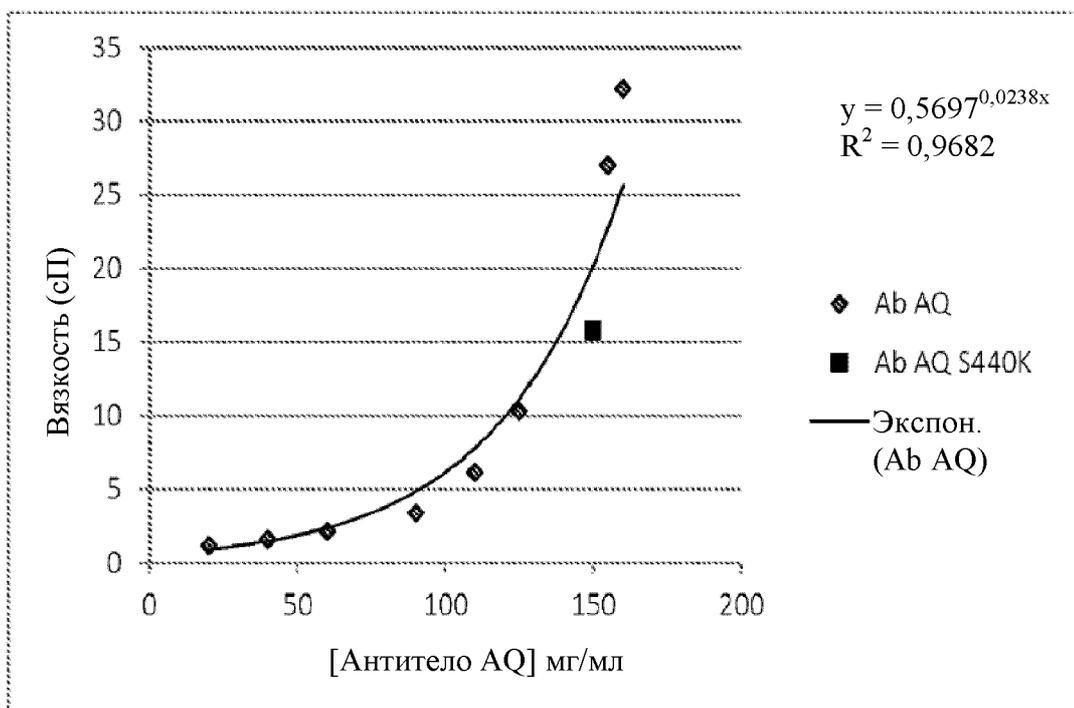
ФИГУРА 17



ФИГУРА 18



ФИГУРА 19А

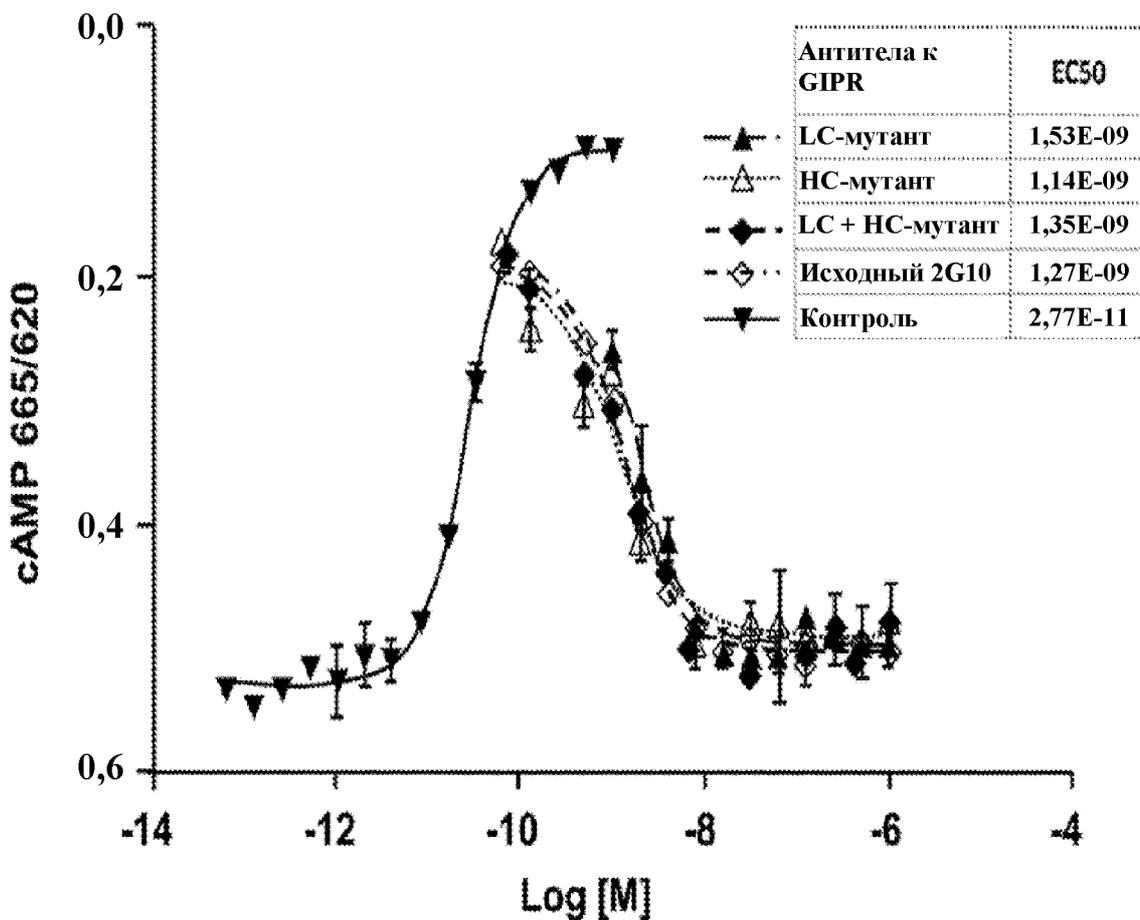


ФИГУРА 19В

Обозначения мутантов AQ	Мутации HC AQ согласно нумерации Aho (линейной)	Мутации LC AQ согласно нумерации Aho (линейной)	Конц., мг/мл	Вязк., сП	STDEV, сР	Вязк. отн. AQ
AQ	AQ_HC	AQ_LC	151,1	19,1	0,6	1
AQ (HC 1, 17, 85)	AQ_HC: Q1(1)E, R17(16)G, S85(75)A	AQ_LC	151,7	15,8	0,8	0,87
AQ (LC 4 13 76 95 97 98)	AQ_HC:	AQ_LC: M4(4)L, V13(13)L, A76(60)D, S95(77)R, Q97(79)E, S98(80)P	149,1	12,7	0,4	0,67
AQ (HC 1, 17, 85) (LC 4 13 76 95 97 98)	AQ_HC: Q1(1)E, R17(16)G, S85(75)A	AQ_LC: M4(4)L, V13(13)L, A76(60)D, S95(77)R, Q97(79)E, S98(80)P	152,6	24,2	1	1,26

ФИГУРА 20А

## Анализ сАМР в отношении 4 Аб в 293/huGIPR №10



ФИГУРА 20В

Группа №	Тестируемый материал	Уровень дозы (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Концентрация дозы (мг/кг)	Количество животных
1	Антитело АК	10	0,071	140	4
	Разбавитель (контроль процедуры)	0	0,071	0	
2	Антитело АК (мутация Fab)	10	0,048	210	4
	Разбавитель (контроль процедуры)	0	0,048	0	
3	Антитело АК (мутация Fc)	10	0,048	210	4
4	Антитело АК (двойная мутация Fab и Fc)	10	0,048	210	4

ФИГУРА 21

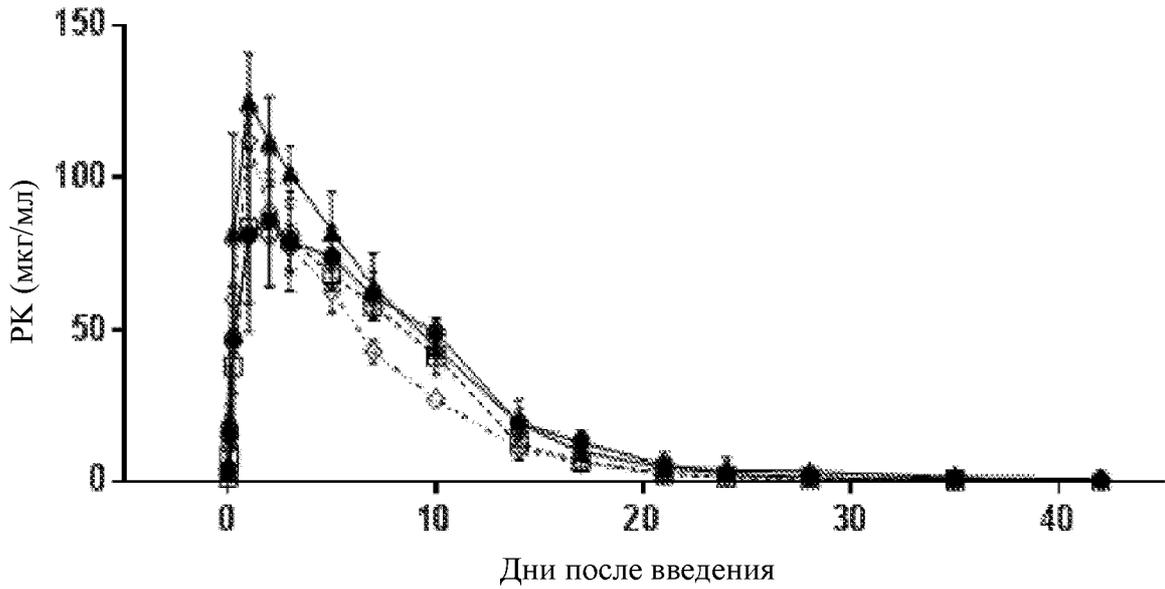
Группа и уровень дозы	T <sub>max</sub> (день)	C <sub>max</sub> (мкг/мл)	AUC <sub>last</sub> (день*мкг/мл)	AUC <sub>last/D</sub> (день*кг*мкг/мл*мг)
Антитело АК, 10 мг/кг	2,5	87,8	923	92,3
Антитело АК (мутация Fab), 10 мг/кг	2,5	91,1	807	80,7
Антитело АК (мутация Fc), 10 мг/кг	0,81	125	1020	102
Антитело АК (мутация Fab + Fc), 10 мг/кг	1	112	740	74,0

ФИГУРА 22

Предварительное тестирование LDL-C, % *															
Дни после введения															
Животное №	Предв. тес тиров. (1-й день СЛАВ)	1,02	2	3	4	6	8	11	15	18	22	25	29	36	43
1001	100,00%	101,75%	66,67%	40,35%	36,84%	29,82%	33,33%	29,82%	15,79%	24,56%	21,05%	22,81%	31,58%	57,89%	59,65%
1002	100,00%	95,00%	52,50%	45,00%	37,50%	37,50%	47,50%	20,00%	7,50%	50,00%	32,50%	30,00%	42,50%	60,00%	70,00%
1003	100,00%	111,11%	58,33%	27,78%	27,78%	22,22%	22,22%	36,11%	8,33%	25,00%	22,22%	19,44%	61,11%	97,22%	97,22%
1004	100,00%	105,97%	52,24%	35,82%	32,84%	29,85%	19,40%	14,93%	4,48%	4,48%	19,40%	19,40%	83,58%	98,51%	100,00%
Среднее	100,00%	103,50%	57,50%	37,50%	34,00%	30,00%	29,50%	24,00%	9,00%	23,00%	23,00%	22,50%	56,50%	79,00%	82,00%
2001	100,00%	106,52%	58,70%	34,78%	26,09%	28,26%	30,43%	28,26%	21,74%	52,17%	32,61%	39,13%	39,13%	54,35%	69,57%
2002	100,00%	100,00%	48,57%	34,29%	31,43%	28,57%	25,71%	8,57%	8,57%	25,71%	28,57%	42,86%	65,71%	120,00%	102,86%
2003	100,00%	110,34%	63,79%	32,76%	32,76%	24,14%	13,79%	18,97%	5,17%	15,52%	18,97%	24,14%	41,38%	60,34%	67,24%
2004	100,00%	114,29%	62,86%	37,14%	31,43%	25,71%	22,86%	28,57%	20,00%	22,86%	31,43%	31,43%	48,57%	65,71%	77,14%
Среднее	100,00%	108,05%	59,20%	34,48%	30,46%	26,44%	22,41%	21,26%	13,22%	28,74%	27,01%	33,33%	47,13%	71,84%	77,01%
3001	102,63%	63,16%	42,11%	31,58%	28,95%	23,68%	18,42%	7,89%	23,68%	28,95%	76,32%	113,16%	126,32%	97,37%	94,87%
3002	104,17%	50,00%	29,17%	27,08%	29,17%	18,75%	14,58%	6,25%	16,67%	25,00%	52,08%	81,25%	89,58%	79,17%	76,00%
3003	100,00%	37,21%	18,60%	18,60%	6,98%	6,98%	6,98%	6,98%	6,98%	39,53%	67,44%	116,28%	95,35%	102,33%	102,33%
3004	100,00%	55,00%	40,00%	32,50%	27,50%	25,00%	27,50%	20,00%	22,50%	25,00%	22,50%	32,50%	37,50%	50,00%	50,00%
Среднее	100,00%	101,78%	50,89%	31,95%	27,22%	23,08%	18,34%	16,57%	10,06%	17,16%	29,59%	54,44%	85,80%	86,98%	82,25%
4001	100,00%	105,88%	76,47%	56,86%	47,06%	45,10%	35,29%	39,22%	25,49%	31,37%	31,37%	37,25%	64,71%	92,16%	96,08%
4002	100,00%	102,17%	54,35%	39,13%	32,61%	30,43%	21,74%	28,26%	15,22%	28,26%	28,26%	34,78%	34,78%	67,39%	82,81%
4003	100,00%	94,92%	54,24%	35,59%	30,51%	20,34%	22,03%	27,12%	15,25%	23,73%	57,63%	45,76%	67,80%	74,58%	81,36%
4104	100,00%	102,99%	56,72%	32,84%	34,33%	35,82%	28,36%	29,85%	31,34%	25,37%	28,36%	26,87%	44,78%	55,22%	58,70%
Среднее	100,00%	101,35%	60,09%	40,36%	35,87%	32,74%	26,91%	30,94%	22,42%	26,91%	36,77%	35,87%	53,56%	71,30%	78,48%

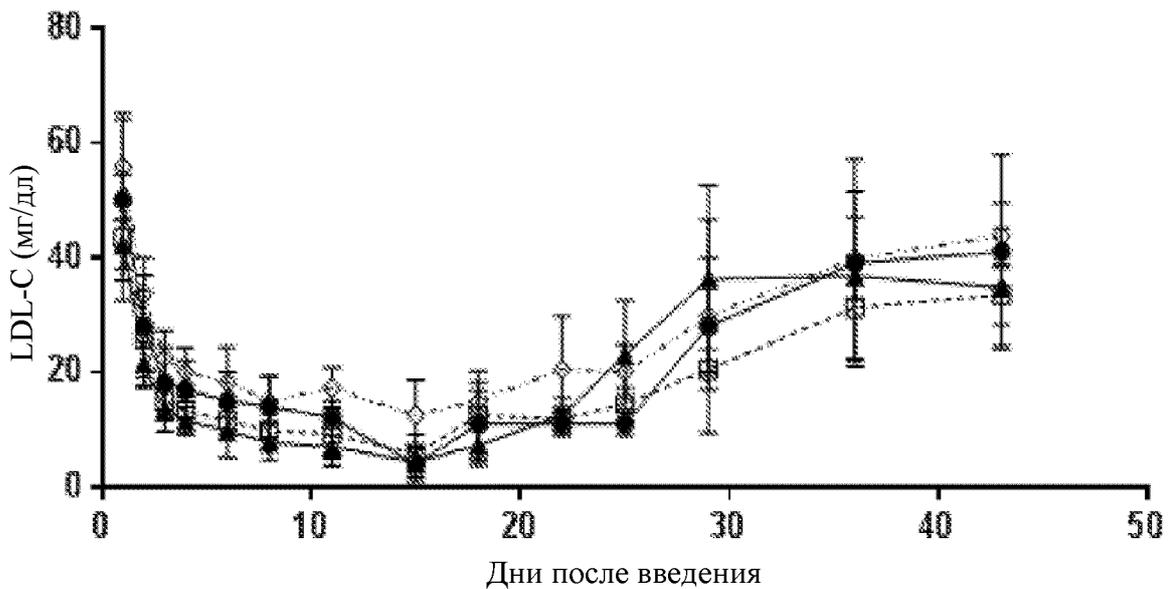
ФИГУРА 23

28/28  
Фармакокинетика



ФИГУРА 24

LDL-C (% отличия от исходного уровня)



ФИГУРА 24В

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference A-2063-WOPCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2017/053967	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 28 September 2017 (28-09-2017)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 29 September 2016 (29-09-2016)
Applicant  AMGEN INC		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 5  
 as suggested by the applicant  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b.  none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2017/053967

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

3-8, 22, 26-31(completely); 1, 2, 24, 25, 88-113(partially)

### Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2017/053967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 INV. C07K16/28 G01N11/00  
 ADD. C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SANDEEP YADAV ET AL: "Establishing a Link Between Amino Acid Sequences and Self-Associating and Viscoelastic Behavior of Two Closely Related Monoclonal Antibodies", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 28, no. 7, 6 April 2011 (2011-04-06), pages 1750-1764, XP019912566, ISSN: 1573-904X, DOI: 10.1007/S11095-011-0410-0 page 1153, left-hand column - page 1666, right-hand column</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	<p>1-8,22, 24-31, 88-113</p>

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  28 March 2018	Date of mailing of the international search report  06/06/2018
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Meyer, Wolfram
--	--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/053967

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>KETCHEM RANDAL R ET AL: "Mitigation of monoclonal antibody viscosity by modification of protein surface charge", ABSTRACTS OF PAPERS ; ACS NATIONAL MEETING &amp; EXPOSITION, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US</p> <p>, vol. 243 25 March 2012 (2012-03-25), page 1, XP008171180, ISSN: 0065-7727 Retrieved from the Internet: URL:<a href="http://abstracts.acs.org/chem/243nm/program/view.php?obj_id=122153&amp;terms=abstract">http://abstracts.acs.org/chem/243nm/program/view.php?obj_id=122153&amp;terms=abstract</a></p>	1-8,22, 24-31, 88-113
A	<p>-----</p> <p>SANDEEP YADAV ET AL: "The Influence of Charge Distribution on Self-Association and Viscosity Behavior of Monoclonal Antibody Solutions", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 9, no. 4, 2 April 2012 (2012-04-02), pages 791-802, XP055134188, ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp200566k cited in the application the whole document</p>	1-8,22, 24-31, 88-113
A	<p>-----</p> <p>SONOKO KANAI ET AL: "Reversible self-association of a concentrated monoclonal antibody solution mediated by Fab-Fab interaction that impacts solution viscosity", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 97, no. 10, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 4219-4227, XP055136635, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.21322 page 4223 - page 4224</p>	1-8,22, 24-31, 88-113
A	<p>-----</p> <p>ANUJ CHAUDHRI ET AL: "The Role of Amino Acid Sequence in the Self-Association of Therapeutic Monoclonal Antibodies: Insights from Coarse-Grained Modeling", THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, vol. 117, no. 5, 7 February 2013 (2013-02-07), pages 1269-1279, XP055160590, ISSN: 1520-6106, DOI: 10.1021/jp3108396 cited in the application page 1153</p> <p>-----</p>	1-8,22, 24-31, 88-113

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 3-8, 22, 26-31(completely); 1, 2, 24, 25, 88-113(partially)

antigen binding protein, and a method of reducing the viscosity of an which comprises making one or more modifications in the sequence of the antigen binding protein if the antigen binding protein comprises the VH1|1-18 germline subfamily, modifying the VH1 sequence to comprise one or more substitutions selected from 82X1 , 94X2 , and 95X3 , wherein X1 is selected from R, K and H, X2 is selected from S, T, N and Q and X3 is selected from R, K, and H;

---

2. claims: 9-12, 32-34(completely); 1, 2, 24, 25, 88-113(partially)

An antigen binding protein and a method of reducing the viscosity of an antigen binding protein, which comprises making one or more modifications in the sequence of the antigen binding protein if the antigen binding protein comprises the VH3|3-33 germline subfamily, modifying the VH3 sequence to comprise one or more substitutions selected from IX4 , 17X5 , and 85X6 , wherein X4 is selected from D and E, X5 is selected from G, A, V, I, L, and M, and W, and X6 is selected from G, A, V, I, L, and M

---

3. claims: 13, 14, 35-40, 46(completely); 1, 2, 24, 25, 88-113(partially)

An antigen binding protein and a method of reducing the viscosity of an antigen binding protein, which comprises making one or more modifications in the sequence of the antigen binding protein if the antigen binding protein comprises the VK3|L16 germline subfamily, modifying the VK3 sequence to comprise one or more substitutions selected from 4X10 , 13X11 , 76X12 , 78F, 95X13 , 97X14 , and 98P, wherein X10 is selected from G, A, V, I, L, and M, X11 is selected from G, A, V, I, L, and M, X12 is selected from D and E, X13 is selected from R, K and H, and X14 is selected from D and E

---

4. claims: 15-17, 41-45, 49(completely); 1, 2, 24, 25, 88-113(partially)

An antigen binding protein and a method of reducing the viscosity of an antigen binding protein, which comprises making one or more modifications in the sequence of the antigen binding protein if the antigen binding protein

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

comprises the VK3 L6 germline subfamily, modifying the VK3 sequence to comprise one or more substitutions selected from 76X12 and 95X13

---

5. claims: 18-23, 47, 48, 50-76(completely); 1, 2, 24, 25, 88-113(partially)

An antigen binding protein and a method of reducing the viscosity of an antigen binding protein, which comprises making one or more modifications in the sequence of the antigen binding protein modifying the Fc domain sequence to comprise one or more substitutions selected from 253X15 , 440X16 , and 439X17 ,wherein X15 is selected from G, A, V, I, L, and M, X16 is selected from R, K, and H, and X17 is selected from D and E, wherein the Fc domain sequence comprises only one of 440X16 and 439X17

---

6. claims: 77-83(completely); 1, 2, 24, 25, 88-113(partially)

An antigen binding protein that specifically binds PCSK9

---

7. claims: 84, 85(completely); 1, 2, 24, 25, 88-113(partially)

An antigen binding protein that specifically binds c-fms

---

8. claims: 86, 87(completely); 1, 2, 24, 25, 88-113(partially)

An antigen binding protein that specifically binds GIPR

---