

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043899**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.03

(21) Номер заявки
201990837

(22) Дата подачи заявки
2017.09.28

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

(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**

(43) **2019.09.30**

(86) **PCT/US2017/053967**

(87) **WO 2018/064307 2018.04.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
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)

(56) **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, № 7, 6 April 2011 (2011-04-06), p. 1750-1764, XP019912566, ISSN: 1573-904X, DOI: 10.1007/S11095-011-0410-0, p. 1153, left-hand column - p. 1666, right-hand column
KETCHEM RANDAL R. ET AL.: "Mitigation of monoclonal antibody viscosity by modification of

protein surface charge", ABSTRACTS OF PAPERS ; ACS NATIONAL MEETING & EXPOSITION, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 243 25 March 2012 (2012-03-25), p. 1, XP008171180, ISSN: 0065-7727, retrieved from the Internet: URL: http://abstracts.acs.org/chem/243nm/program/view.php?obj_id=122153&terms=, abstract

SANDEEP YADAV ET AL.: "The Influence of Charge Distribution on Self-Association and Viscosity Behavior of Monoclonal Antibody Solutions", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 9, № 4, 2 April 2012 (2012-04-02), p. 791-802, XP055134188, ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp200566k, cited in the application, the whole document

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, № 10, 1 October 2008 (2008-10-01), p. 4219-4227, XP055136635, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.21322, p. 4223-4224

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, № 5, 7 February 2013 (2013-02-07), p. 1269-1279, XP055160590, ISSN: 1520-6106, DOI: 10.1021/jp3108396, cited in the application, p. 1153

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

B1**043899****043899****B1**

Перекрестная ссылка 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

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

В данный документ включен посредством ссылки во всей своей полноте перечень последовательностей под названием "A-2063-WO-PCT_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

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.

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 противодавление во время инъекций, приводящее к неисправности инъекционных устройств, затруднение ручного введения, снижение биодоступности и дискомфорт пациента.

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.

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.

Наибольшая вязкость раствора наблюдалась в условиях с наиболее отрицательным параметром диффузионного взаимодействия kD, наибольшим кажущимся радиусом и наименьшим суммарным заря-

дом. 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.

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., USA*, 111:18601-6.

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.

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. Borras et al. (2013), патент США № 8545849.

Краткое описание изобретения

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.

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., USA*, 63, 78-85), Kabat (Kabat et al. (1991), *Sequences of proteins of immunological interest*, Fifth Edition. NIH Publication № 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.

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.

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.

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.

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.

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

Способы по настоящему изобретению дополнительно включают 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. Предпочтительные С-концевые модификации Fc включают KP, KKP, KKKP (SEQ ID NO:380), E или EE на С-конце.

Вышеуказанные способы предпочтительно применяют в отношении антител, характеризующихся высокой вязкостью, показанных на фиг. 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 фиг. 1B. Часть способа, в которой используется последовательность VH3|3-33, предпочтительно применяют в отношении антител AQ, AM, AI и AG, представленных на фиг. 1B. Часть способа, в которой используется последовательность VK3|L16, предпочтительно применяют в отношении антител AF и AQ, представленных на фиг. 1B. Часть способа, в которой используется последовательность VK3|L6, предпочтительно применяют в отношении антитела AJ.

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 $440X^{16}$ в исходное антитело, где X^{16} 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 $440X^{16}$ в исходное антитело, где X^{16} 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^{16} является K, а предпочтительным исходным антителом является полипептид PCSK9 (антитело АК наиболее предпочтительно).

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 $82X^1$, $94X^2$ 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) последовательности подсемейства VH3|3-33 зародышевого типа, содержащей одну или несколько 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 X^6 выбран из G, A, V, I, L и M;

в) подсемейства VK3|L16 зародышевого типа, содержащего одну или несколько 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, где мутантный антигенсвязывающий белок не содержит только замену 78F;

г) подсемейства VK3|L6 зародышевого типа, содержащего одну или несколько замен, выбранных из $76X^{12}$ и $95X^{13}$;

е) последовательности Fc-домена, содержащей одну или несколько замен, выбранных из $253X^{10}$,

440X¹¹ и 439X¹², где X¹⁰ выбран из G, A, V, I, L и M; X¹¹ выбран из R, K и H; и X¹² выбран из D и E, где антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере одно из 253X¹⁵ или модификаций, выбранных из подпунктов a, b, c, d и f, если X¹⁶ представляет собой K; и X¹⁷ представляет собой E и антигенсвязывающий белок специфически связывает CD20; и

f) последовательности Fc-домена, содержащей на C-конце X¹⁸X¹⁹, где X¹⁸ представляет собой от одной до четырех аминокислот, выбранных из D и E или из H, K и R, и X¹⁹ выбран из P, M, G, A, V, I, L, S, T, N, Q, F, Y и W и отсутствует, если X¹⁸ содержит D или E, присутствует, если X¹⁸ содержит K или R в своем C-концевом участке, и присутствует или отсутствует, если X¹⁸ содержит H в своем C-концевом участке, и где антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере одно из 253X¹⁵ или замен, выбранных из подпунктов от a) до e), если на C-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 C-концевые модификации Fc включают KP, KKP, KKKP (SEQ ID NO:380), E или EE на C-конце,

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

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

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;

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;

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;

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;

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

Все вышеуказанные предпочтительные аминокислотные замены в варибельных областях идентифицированы согласно системе нумерации Aho. Все остатки в консервативных областях, включая Fc, идентифицированы согласно системе нумерации EU.

Предпочтительные антигенсвязывающие белки в соответствии с настоящим изобретением включают антитела AF, AK, AL, AN и AO, представленные на фиг. 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 фиг. 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 фиг. 1B, имеющее одну или несколько, наиболее предпочтительно все, из замен подсемейства VK3|L6 зародышевого типа; и

антитела BA, AH и AN, представленные на фиг. 1B, имеющие одну или несколько, предпочтительно все, из замен Fc, указанных выше.

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, 3666 и 368, предпочтительно также содержащим последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 351.

Из-за вышеизложенных модификаций последовательности настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, которые специфически связывают с-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.

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.

Все модифицированные антигенсвязывающие белки применимы по тем же показаниям, которые

описаны ранее для немодифицированных антител.

Каждый из антигенсвязывающих белков на фиг. 1А и 1В, характеризующийся мутированными тяжелыми цепями, предпочтителен для дополнительного включения последовательности легкой цепи, как указано в немодифицированном исходном антителе на фиг. 1А и 1В. 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 фиг. 1А и 1В.

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 440X¹⁶ по сравнению с исходным антителом, в котором отсутствует модификация последовательности 440X¹⁶;

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 X¹⁶ в таком антигенсвязывающем белке является К. Дополнительно в объем настоящего изобретения входит способ лечения гиперхолестеринемии с помощью такого антигенсвязывающего белка.

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.

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

На фиг. 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 фиг. 1А и 1В показаны мишени исследуемых антител, а также типы их легких и тяжелых цепей, подсемейства зародышевого типа, концентрация, рI и вязкость. Каждое антитело на фиг. 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.

На фиг. 1С и 1D показаны идентификационные номера последовательностей (SEQ ID NO) для карманных областей и областей Fc антител на фиг. 1А и 1В. На фиг. 1D также показано антитело ВА, которое обсуждается на фиг. 17.

На фиг. 2 показаны пары подтипов с высокой вязкостью и низкой вязкостью, определенные в данном описании.

На фиг. 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%.

На фиг. 4 показана эффективность исходных антител АК (контроль АК, АК) и их мутантов.

На фиг. 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.

На фиг. 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 рI для всей молекулы. Мутанты антител АК и АО с низкой вязкостью также показаны.

На фиг. 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 рI для всей молекулы. Мутант AQ с низкой вязкостью (1, 17, 85) также показан.

На фиг. 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 рI для всей молекулы. Мутант AQ с низкой вязкостью (4, 13, 76, 95, 97, 98) также показан.

Фиг. 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 фиг. 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.

Фиг. 10 представляет собой таблицу, на которой показаны полученные и охарактеризованные мутанты антител АК и АО.

Фиг. 11 представляет собой таблицу, на которой показаны общие параметры последовательностей тринадцати mAb с тяжелыми цепями VH3. На фиг. 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.

Фиг. 12 представляет собой таблицу, на которой показаны общие параметры последовательностей четырнадцати mAb с легкими цепями VK3. На фиг. 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.

На фиг. 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.

На фиг. 14А показано, что мутации на поверхности взаимодействия Fc-Fc могут обеспечивать снижение вязкости раствора. Показана зависимость вязкости от концентрации антитела АК и мутантов I253A и S440K антитела АК.

На фиг. 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 I253A антитела АК, мутанта S440K антитела АК и двойного мутанта K439E/S440K антитела АК. На фигуре также показана вязкость мутанта K439E антитела АК, мутанта N433A антитела АК и мутанта N434A антитела АК, у которых не снижена вязкость относительно исходного антитела АК.

Фиг. 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.

Фиг. 16 представляет собой схему химического поперечного сшивания с помощью EDC (см. пример 2).

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

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

На фиг. 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.) Фиг. 19В представляет собой график рассеяния тех же данных с экспоненциальной аппроксимацией. Ромбы на фиг. 19В обозначают немодифицированное антитело АQ в указанных концентрациях, а квадрат отмечает мутант S440K при 150 мг/мл.

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

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

На фиг. 21 показано краткое изложение экспериментальной схемы для фармакокинетического исследования однократной дозы подкожного болюса на самцах яванских макаков, как более подробно опи-

сано в рабочем примере ниже.

На фиг. 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_{max} и увеличивает C_{max} .

На фиг. 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.

На фиг. 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_{max} и к более высокой C_{max} . Все мутантные формы исходного антитела сохраняют способность обеспечивать снижение уровня LDL-C в сыворотке (нижняя панель).

Подробное описание изобретения

Определение терминов.

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

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.

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')₂, Fv, однодоменное антитело), производные антител, аналоги антител, слитые белки и антигенные рецепторы, включая химерные антигенные рецепторы (CAR).

"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 антигеном, раскрытым в данном описании, или его антигенсвязывающему фрагменту (например, Fab, Fab', F(ab')₂, 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)², F(ab')², Fv и одноцепочечные антитела. Примеры антител, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения антитела, перечисленные на фиг. 1А и 1В, а также абаговомаб, абциксимаб, актоксумаб, адалимумаб, афелимомаб, афугузумаб, 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, безлтоксумаб, бициромаб, биватузумаб, биватузумаб мертанзин, блинатумомаб, блосозумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, канакинумаб, кантузумаб мертанзин, кантузумаб мертанзин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, катумаксумаб, CC49, целделизумаб, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, конатумумаб, кренезумаб, CR6261, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, даратумумаб, демцизумаб, деносуамаб, детумомаб, дорлимомаб аритокс, дроцитумаб, дулиготумаб, дупилумаб, экроексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элотузумаб, элсилимомаб, энаватузумаб, энлимомаб пегол, энокизумаб, энокизумаб, энотикумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпигтумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эренумаб, эрлизумаб, эртумаксумаб, этарацизумаб, этролизумаб, эволюкумаб, эксби-

вирумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фланвотумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, фресолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантнерумаб, 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, минретумумаб, митумумаб, могамулизумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумумаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумумаб эстафенатокс, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумумаб 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, пемтумумаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинтумумаб, плакулумаб, понезумаб, презалумаб, приликсимаб, притумумаб, PRO 140, квиллизумаб, ракотумумаб, радретумаб, рафивирумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, самализумаб, сарилумаб, сатумумаб пандетид, секукинумаб, севирумаб, сибротузумаб, сифалимумаб, сультуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, таплитумумаб паптокс, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумумаб, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумумаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тезепелумаб, TGN1412, тремелимумаб, тицилимумаб, тилдракизумаб, тигатузумаб, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тозитумумаб, тралокинумаб, трастузумаб, TRBS07, трегализумаб, тремелимумаб, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, ублитуксимаб, урелумаб, уртуксазумаб, устекинумаб, вапаликсимаб, вателизумаб, ведолизумаб, вельтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, визилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб и золимомаб аритокс.

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.

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.

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.

Полноразмерные "легкие цепи" иммуноглобулина (приблизительно 25 кДа или приблизительно 214 аминокислот) кодируются геном переменной области на NH₂-конце (приблизительно 110 аминокислот).

кислот) и геном константной области каппа или лямбда на СООН-конце. Полноразмерные "тяжелые цепи" иммуноглобулина (приблизительно 50 кДа или приблизительно 446 аминокислот) аналогичным образом кодируются геном варибельной области (приблизительно 116 аминокислот) и одним из других вышеупомянутых генов константной области (приблизительно 330 аминокислот). Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon и определяют изотип антитела как IgG (такой как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях варибельные 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).

Варибельный 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 варибельного 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 варибельная область химерного антитела отлична от человеческой.

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 варибельного домена, полученные от приматов, отличных от человека (например, марьяшковые, 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., USA*, 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.

Каждый из терминов "человеческое антитело" и "полностью человеческое антитело" относится 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.

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, вариабельной 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.

"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.

"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 $F(ab')_2$.

" $F(ab')_2$ -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.

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).

"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 вариабельные фрагменты (приблизительно 25 кДа, два вариабельных 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 вариабельных доменах тяжелой цепи, также показано, что вариабельные домены легкой цепи и наночастицы, полученные из легких цепей, специфически связываются с целевыми эпитопами.

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.

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 AF, замещенную, как описано в данном документе, будет селективно подавлять антиген на фиг. 1B для антитела AF. 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.

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 Biotec, 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 антигеном-мишенью.

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, α -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 стерически 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 фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилиотиоат, фосфоранилидат, фосфорамидат и т.п.

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 одонитевыми, либо двухнитевыми.

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

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).

"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.

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

"Комплементарная ДНК (сDNA)" представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК, которая образована из матрицы mRNA ферментом обратной транскриптазой. Как правило, для инициирования обратной транскрипции применяют праймер, комплементарный частям mRNA. Специалисты в данной об-

ласти 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.

"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 сАМФ (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 репрессируемые промоторы.

"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.

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

"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.

"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.

"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.

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 карбоксильного конца относительно эталонной последовательности внутри полипептида, расположена ближе к карбоксильному концу эталонной последовательности, но необязательно находится на карбоксильном конце полноразмерного полипептида.

"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.

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.

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.

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

"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.

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 полигистидиновые участки, белок А (Nilsson et al. (1985), EMBO J., 1:1075; Nilsson et al. (1991), Methods Enzymol., 198:3), глутатион-S-трансферазу (Smith et al. (1988), Gene, 67:31), аффинную метку Glu-Glu (Grusenmeyer 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, Пискаатауэй, Нью-Джерси).

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.

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

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

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.

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.

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).

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) варибельную область тяжелой цепи, характеризующуюся аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 136; и

ii) варибельную 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 варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 378 и последовательность варибельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 379.

Предпочтительные варианты осуществления.

Корреляция общих характеристик последовательности с вязкостью.

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 (фиг. 1А и 1В). Основные общие характеристики последовательностей моноклональных антител, такие как типы легких и тяжелых цепей, их подтипы (зародышевые линии) и pI, рассчитывали и сопоставляли с вязкостью, но не сразу выявили значимые корреляции (фиг. 1А и 1В). Полиморфизмы (известные как аллотипы) в изотипах IgG были описаны с применением серологических реагентов, полученных от человека (Ropartz, C., Schanfield, M.S., 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 & Lefranc (2009), Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity, mAbs 1, 332-338.) (Vidarsson, G., Dekkers, G., 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 консерва-

тивные 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 фиг. 1A и 1B.

Антитела на фиг. 1A и 1B рассортированы по вязкости. Таблицы на фиг. 1A и 1B включают название моноклонального антитела, измеренные концентрации, измеренные значения вязкости и общие параметры последовательности, включая тип, подтип и рассчитанный pI. Тип IgG1, легкие цепи лямбда и подтип VH1 тяжелой цепи выделены жирным шрифтом.

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 (фиг. 2). В исследовании искали корреляции вязкости с последовательностями областей D и J, но не обнаружили значимой корреляции.

На фиг. 2 показаны значения p, которые указывают на вероятность случайной корреляции с вязкостью. На фиг. 2 также показаны остатки в подтипе с высокой вязкостью, положения в нумерации Aho и остатки в подтипах, характеризующихся низкой вязкостью.

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 (фиг. 9).

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.

Обнаружили ассоциацию (t-критерий, $p=0,031$) легкой цепи VK3|L16 с высокой вязкостью и VK3|A27 с низкой вязкостью (фиг. 2, 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.

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., USA, 63, 78-85;

Kabat--Kabat et al. (1991), Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, NIH Publication № 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 фиг. 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 A. 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 комплементарности 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.

В дополнение к оценке общих характеристик последовательности, последовательности переменных 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.

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 (фиг. 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 (фиг. 9, справа).

Оценка *in silico* предлагаемых аминокислотных замен.

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. HC82 характеризуется очень консервативными взаимодействиями Н-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.

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.

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.

VH S59R/K- в пределах VH1 и VH3, гидрофильное положение 59 ассоциировано с более низкой вязкостью. Положение VH S59R/K характеризуется высокой структурной 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).

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.

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.

Принимая во внимание вышеизложенные соображения, получили несколько мутантов для двух антител IgG2 АК и АО подтипа VH1-18, характеризующегося высокой вязкостью, с целью снижения вязкости при сохранении активности (фиг. 9B). Фиг. 9B включает символы мутантов моноклональных анти-

тел и соответствующие мутации в тяжелой и легкой цепях.

Очень низкий уровень экспрессии наблюдали для обоих мутантов АК, содержащих замену S59R (отмечена * на фиг. 3). Жизнеспособность и плотность жизнеспособных клеток также были низкими для одного из них, АК (59 82 94 95 13). С другой стороны, мутанты антитела АО, содержащие замену S59R, характеризовались продуцированием титра, сопоставимого с титром исходной молекулы АО. 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.

Значения активности исходного антитела АК и двух хорошо экспрессируемых мутантов, измеренной посредством связывания с PCSK9, были сходными (фиг. 4). Наконец, измеренные значения вязкости мутантов АК и АО были значительно ниже, чем у исходных антител, как и предсказывалось (фиг. 5). Например, мутант АК (82 94 95) обладал только 39% от вязкости исходного антитела. Вязкость обоих мутантов АО, содержащих замену S59R, была даже ниже, приблизительно 28% от вязкости исходного антитела (фиг. 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 (фиг. 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 (АК и АО) 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.

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 (фиг. 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 АК и АО переместились приблизительно в два раза ниже по шкале вязкости от области VH1|1-18 до VH1|1-02 на графике (фиг. 6). Мутанты АО (59, 82, 94, 95) и АО (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 АК, содержащие R59, экспрессировались плохо, что позволяет предположить, что появление редкого встречающегося остатка аргинина в положении 59 может влиять на экспрессию.

Увеличение pI в отношении антител в составах с pH < pI (например, в слабощелочном 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 pI антител, что дает основание предполагать, что не увеличение заряда, а некоторые структурные изменения могут быть причиной резкого снижения вязкости.

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 (фиг. 11) и VK3 (фиг. 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.

Более низкая вязкость антител VK3|A27 и более высокая вязкость антител VK3|L16 показали обратную корреляцию между вязкостью и pI (фиг. 8, 12).

Следует отметить, что pI был не очень эффективным, но в некоторых случаях полезным прогности-

ческим 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 (фиг. 7). Следовательно, rI следует принимать во внимание при прогнозировании вязкости VH3|3-33.

Предлагаемое снижение вязкости для семейств VH3 и VK3 зародышевого типа.

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 (фиг. 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.

Моноклональные антитела с легкими цепями VK3|L16, характеризующиеся высокой вязкостью, и легкими цепями VK3|A27, характеризующиеся 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 (фиг. 8). Значения вязкости следующих молекул VK3|L16 можно уменьшать при помощи мутаций, описанных на фиг. 11: антитела AQ и AF.

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 (фиг. 2). Положения и остатки последовательностей, коррелирующие с различиями вязкости, идентифицировали, и их можно рассматривать в качестве кандидатов для точечных мутаций, обеспечивающих снижение вязкости (фиг. 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 (фиг. 13A и 13B): 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: B (5,6 сП), J (8,2 сП), Y (12, 1 сП).

Исследования химического перекрестного сшивания.

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.

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 1HZN 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.

Научная литература включает исследования в отношении образования гексамеров антител, связанных с взаимодействием с Clq1 и активностью CDC. Diebold et al. обнаружили, что антитела к CD20 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. Diebold et al. (2014), "Complement is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface", *Science*, 343:1260-3. Diebold 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.

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 про-

верить, может ли взаимодействие Fc-Fc влиять на вязкость раствора, в Amgen получали Fc-мутанты на основе работы, сделанной Diebold 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, H433A, N434A, определенных Diebold 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, H433A 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 Diebold 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 H433A и N434A не имеют явной чувствительности к экранированию заряда, как мутант K439E.

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.

Наличие взаимодействия Fc-Fc также увеличивает вероятность того, что олигомер антител (димер, тример, тетрамер и т.д.) содержит максимальное количество свободных концов CDR. Большее 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.

Определенные модификации на С-конце антитела препятствуют связыванию C1q 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 C1q1. 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.

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 введе-

ния 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. фиг. 22.

Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева.

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.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть клонированы в вектор, такой как плаزمид, космид, бакмид, 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 индукцибельного 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.

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.

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.

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

Очистка.

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, катионо-

обменную 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.

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.

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

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

Пример 1.

Мутации Fab.

Материалы.

Группу из молекул 43 человеческих и гуманизированных рекомбинантных моноклональных антител с различными мишенями и различными последовательностями получали и очищали в соответствии со стандартной процедурой (фиг. 1A и 1B). 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±10 фунтов/кв. дюйм. Их концентрировали до 150 мг/мл в соответствии с приблизительным убыванием объема в буфере для составления, содержащем 20 mM ацетата, 9% сахарозы при pH 5,2 (без полисорбата), и определяли конечные концентрации (±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.

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.

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.

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 *n*-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

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 (фиг. 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 (фиг. 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 фиг. 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 фиг. 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.

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.

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 перекрестносшитая 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, фиг. 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.

Материалы: антитело АК и его мутанты. Все мутации в тяжелой цепи.

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).

Двойной мутант: T82(72)R, R94(84)S, S95(85)R, S(434)K.

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.

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 c^{-1} и 25°C . См. фиг. 15.

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.

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. РК: средние значения воздействия были одинаковыми (на основе C_{\max} 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.

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 (HC 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.

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. B, 848:28-39). Полученные очищенные пулы подвергали диализу в буфере для составления, содержащем 20 мМ ацетата и 9% сахарозы при pH 5,2 (без полисорбата), с достижением конечного pH ~5,2, и концентрировали до приблизительно 150 мг/мл с применением фильтра с отсеканием выше 30 кДа с помощью центробежной ультрафильтрации (фиг. 20A).

Измерения активности.

Активность измеряли при помощи анализа с использованием клеток млекопитающих 293/huGIPR, экспрессирующих рецептор глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIPR). Увеличивающиеся концентрации исходного AQ 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.

Анализ вязкости AQ 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.

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.

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 фиг. 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 (HC 1, 17, 85) - 15,8 сП, AQ (LC 4, 13, 76, 95, 97, 98) - 12,7 сП (фиг. 20). Мутант тяжелой цепи AQ (HC 1, 17, 85) составлял 83%, а мутант легкой цепи AQ (LC 4, 13, 76, 95, 97, 98) составлял 67% относительно исходного AQ. На фиг. 7 и 8 показаны положения мутантов на графиках зависимости вязкости от μ 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. фиг. 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.

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.

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 конусо-пластинчатого вискозиметра AR-G2 от TA Instruments - Waters LLC. Размер пластины конуса составлял

20 мм в диаметре, угол конуса 1,988°, 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%.

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.

Антитела, обозначенные как АК (контроль, также известный как AMG 145 и эволюкумаб) 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.

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.

Тестируемые и контрольные препараты вводили подкожно в области середины спины соответствующим животным один раз в 1-й день. Место(а) 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 фиг. 21.

Образцы крови собирали с помощью венопункции 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.

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 мин) 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.

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 ТМВ для обнаружения связанного конъюгата с HRP мышиного антитела к человеческому IgG Ab35. Раствор субстрата ТМВ 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.

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.

Графики концентраций тестируемого препарата в зависимости от времени показаны на фиг. 24А и 24В (средние концентрации для каждого тестируемого препарата, n=4 в каждый момент времени). Фармакокинетические параметры четырех тестируемых препаратов обобщены на фиг. 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.

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 фиг. 23 и нанесены на график в зависимости от времени на фиг. 24А и 24В.

Сокращения

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) карбодимида 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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения вязкости антитела или его антигенсвязывающего фрагмента подсемейства VH1|1-18 зародышевого типа, который включает введение в последовательность антигенсвязывающего белка одной или нескольких модификаций, выбранных из модификации аминокислотной последовательности VH1 так, чтобы она содержала одну или несколько 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, где аминокислоты пронумерованы в соответствии с системой нумерации Aho.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит, кроме подвергнутых замене, аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела AF, AK, AL, AN или AO, представленных на фиг. 1B (SEQ ID NO: 114 и 116; 134 и 136; 138 и 140; 146 и 148; и 150 и 152 соответственно).

3. Способ по п.1 или 2, который включает модификацию аминокислотной последовательности VH1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, так что она включает замены 82R, 94S и 95R.

4. Способ по п.1 или 2, дополнительно включающий модификацию последовательности VH1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, так что она включает замены $59X^{20}$, где X^{20} выбран из R, K и H.

5. Способ по п.3 или 4, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит, кроме подвергнутых замене, аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела AF, AK, AL, AN или AO, представленных на фиг. 1B (SEQ ID NO: 114 и 116; 134 и 136; 138 и 140; 146 и 148; и 150 и 152 соответственно).

6. Способ по п.2 или 5, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 114, кроме подвергнутых замене 82R, 94S и 95R, и аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 116.

7. Способ по п.2 или 5, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 134, кроме подвергнутых замене 82R, 94S и 95R, и аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую

SEQ ID NO: 136.

8. Способ по п.2 или 5, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 138, кроме подвергнутых замене 82R, 94S и 95R, и аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 148.

9. Способ по п.2 или 5, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 146, кроме подвергнутых замене 82R, 94S и 95R, и аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 148.

10. Способ по п.2 или 5, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 150, кроме подвергнутых замене 82R, 94S и 95R, и аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 152.

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
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

Фиг. 1А

Мишень (неофици- альное 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 (L3F3)	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
INFgR	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	VL5 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

Фиг. 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

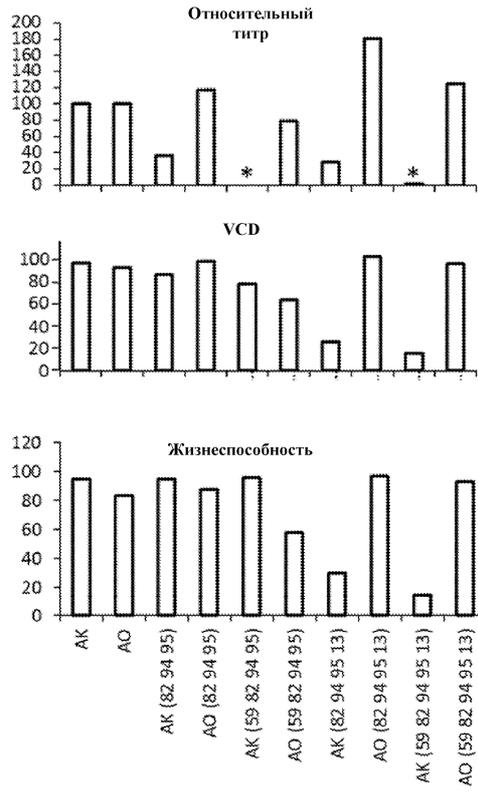
Фиг. 1С

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
INFγR	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
α4β7	AP	296	297	298	276	208	206	209	196
c-kit	BA	299	285	295	276	210	211	212	188

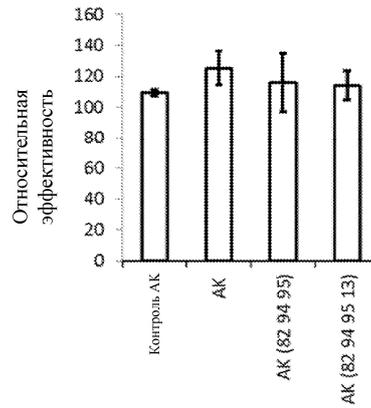
Фиг. 1D

Цепь	Подсемейство, высокая вязкость	Подсемейство, низкая вязкость	p-значе- ние	Остатки в подсемействе с высокой вязкостью, положения согласно нумерации Aю, 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

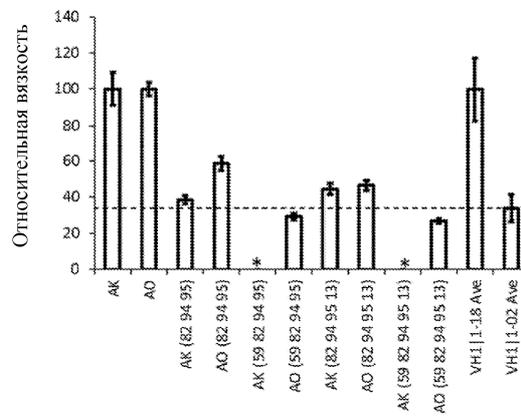
Фиг. 2



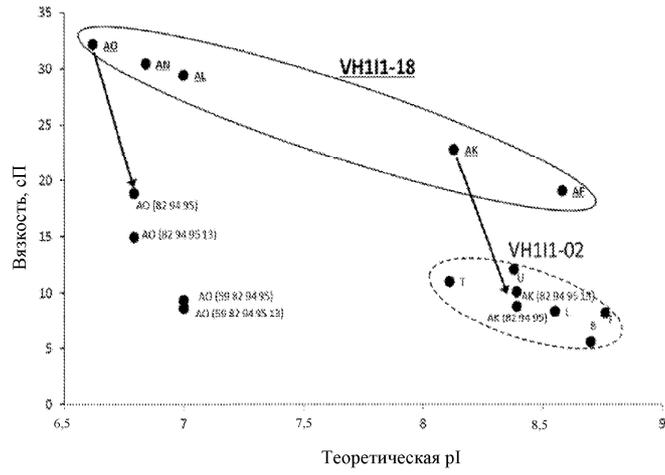
Фиг. 3



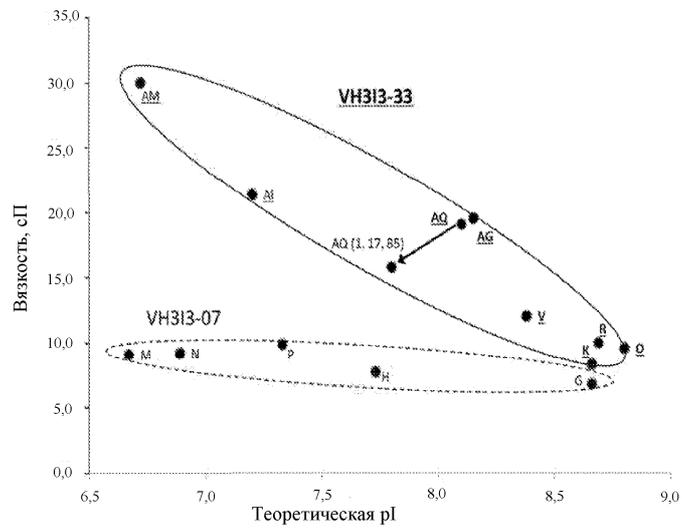
Фиг. 4



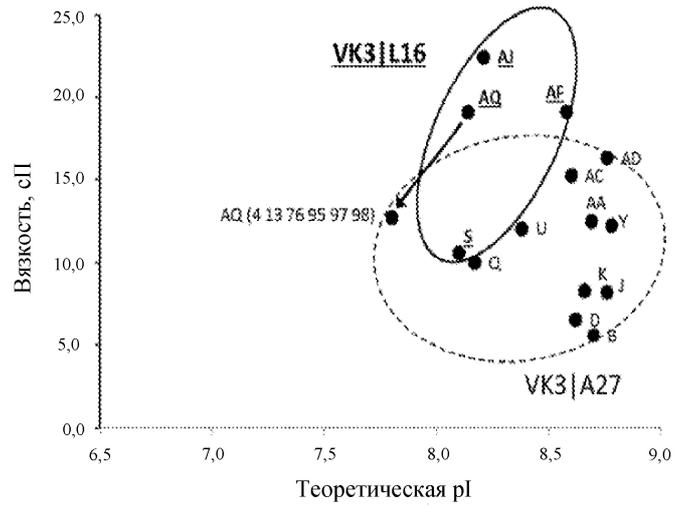
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

				CDR1			CDR2			FR3												
Общие параметры последовательностей VH11-18 и VH11-02				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	75	
				31	33	35	52	a	53	54	56	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	
mAb	Вязк., сП	pi	VL	VH1	33	40	42	59	60	61	65	67	77	78	79	80	81	82	83	84	85	
VBase				VH11-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	
B	5,6	8,7	VK3(A27)	VH11-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	
J	8,2	8,8	VK3(A27)	VH11-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	
L	8,4	8,6	VL3(B3)	VH11-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	
T	11,0	8,1	VK4(B3)	VH11-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	
U	12,1	8,4	VK3(A27)	VH11-02	G	Y	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	
AF	19,1	8,6	VK3(L16)	VH11-18	R	G	S	S	I	Y	S	N	R	V	T	M	T	I	D	T	S	
AK	22,8	8,1	VL2(2a2)	VH11-18	S	G	S	S	F	Y	N	N	R	G	T	M	T	I	D	P	S	
AL	29,4	7,0	VL3(3r)	VH11-18	S	G	S	I	P	Y	N	N	R	V	T	M	T	I	D	T	S	
AN	30,4	6,8	VK1(C2)	VH11-18	D	N	H	N	P	N	S	G	R	V	T	M	T	I	D	T	S	
AO	32,1	6,6	VK4(B3)	VH11-18	S	G	S	S	A	Y	N	N	R	V	T	M	T	I	D	T	S	
Vbase				VH11-18	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	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113									
75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113					
75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113					
86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113																			
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	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	V																						
T	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	Q																						
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																						
T	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	V																						
T	S	T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R																								

Фиг. 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]

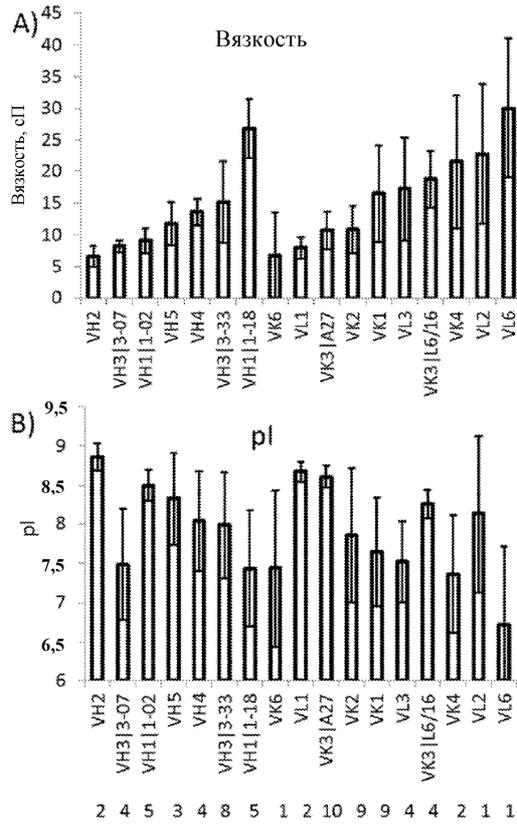
Фиг. 10

Общие параметры последовательностей VH3/3-07 и VH3/3-33					FR1		CDR1			CDR2				FR3	Схема		
					1	16	33	34	35	50	52	53	57	75	75	75	EU
					1	16	33	34	35	50	52	52a	56	74	74	74	Kabat
					1	16	33	34	35	50	52	52a	56	74	74	Chothia	
mAb	Вязк, сП	pl	VL	VH3	1	17	40	41	42	57	59	60	67	85	Aho		
VBase				VH3/3-07	E	G	W	M	S	N	K	Q	E	A			
G	6,8	8,7	VK1 O18	VH3/3-07	E	G	W		N	Q	R	L	A	A			
H	7,7	7,7	VK1 L15	VH3/3-07	E	G	W		S	Y	K	Q	E	A			
<u>K</u>	8,3	8,7	VK3 A27	<u>VH3/3-33</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	VH3/3-07	E	G	W		S	S	K	Q	E	A			
N	9,2	6,9	VK2 A19	VH3/3-07	E	G	W		S	S	K	Q	E	A			
<u>O</u>	9,6	8,8	VL1 1b	<u>VH3/3-33</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>VH3/3-33</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>VH3/3-33</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>VH3/3-33</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>VH3/3-33</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>VH3/3-33</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>VH3/3-33</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>VH3/3-33</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>			
VBase				<u>VH3/3-33</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															

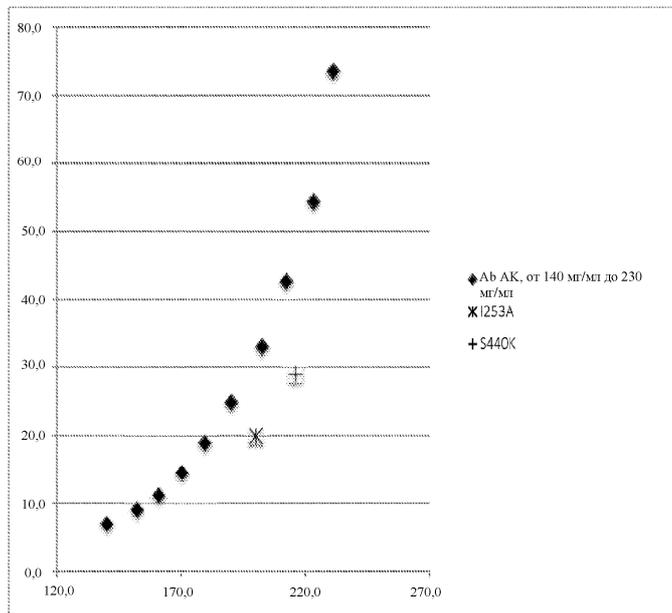
Фиг. 11

Общие параметры последовательностей VK3/A27 and VK3/L					FR1		CDR1		CDR2		FR3				Схема	
					4	12	31	33	51	66	85	87	88	88	88	EU
					4	12	31	33	51	65	82b	83	84	84	84	Kabat
					4	12	31	33	51	65	82b	83	84	84	Chothia	
mAb	Вязк, сП	pl	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			
<u>S</u>	10,6	8,1	VH4 4-59	<u>VK3/L16</u>	<u>M</u>	<u>V</u>	-	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>			
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			
<u>AF</u>	19,1	8,6	VH1 1-18	<u>VK3/L16</u>	<u>M</u>	<u>V</u>	-	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>			
<u>AJ</u>	22,5	8,2	VH3/3-48	<u>VK3/L6</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	-	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>P</u>			
<u>AQ</u>	19,1	8,1	VH3/3-33	<u>VK3/L16</u>	<u>M</u>	<u>V</u>	-	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>			
VBase				<u>VK3/L16</u>	<u>M</u>	<u>V</u>	-	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>			
p-значен.	0,007	0,011														

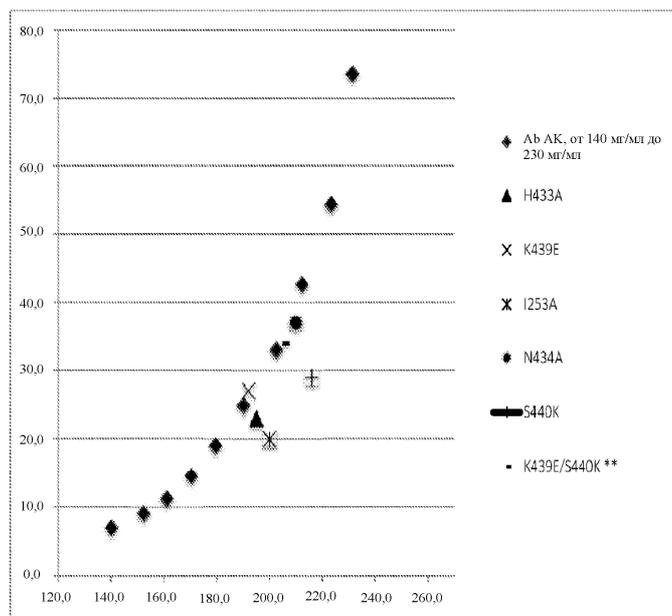
Фиг. 12



Фиг. 13



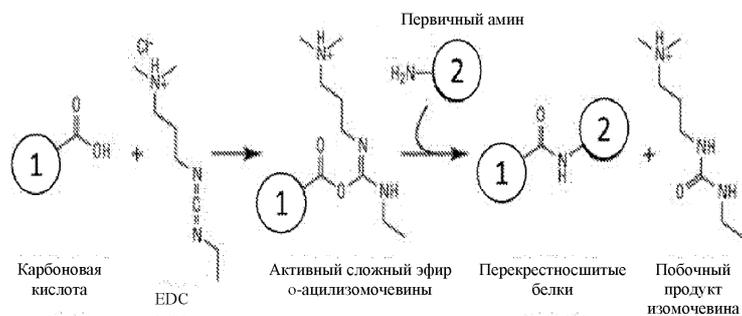
Фиг. 14А



Фиг. 14В

Образец	Вязкость (сП) при 1000 с ⁻¹ при 25°С	Относительная вязкость
Антитело АК	43,7	100%
Fab-мутант	25,6	59%
Fc-мутант	34,8	80%
Двойной мутант	22,6	52%

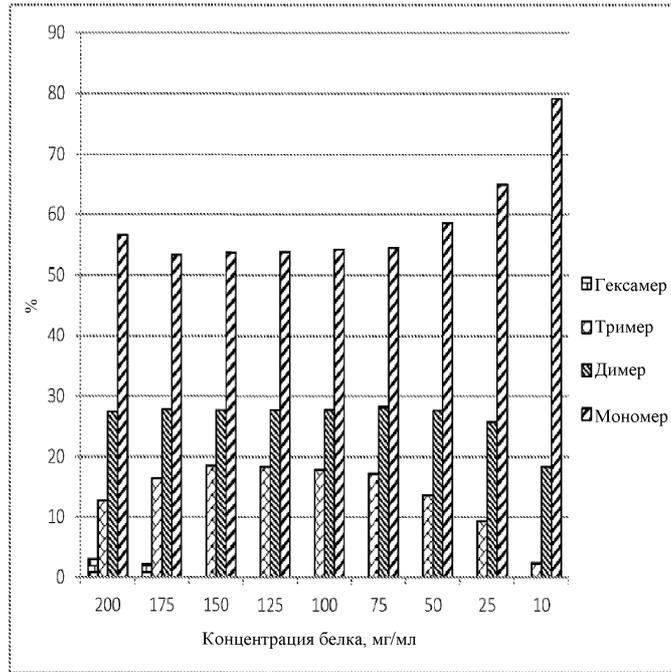
Фиг. 15



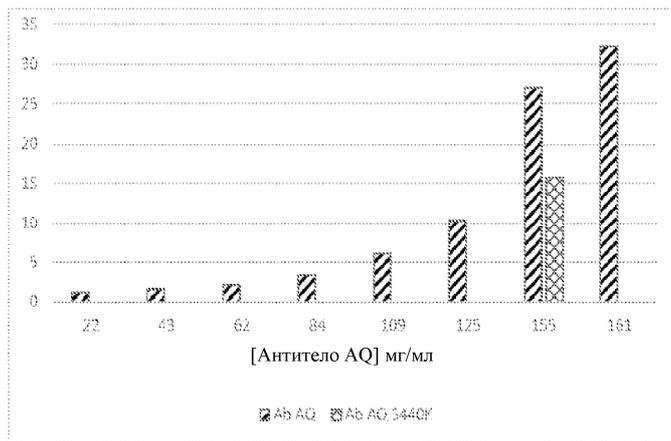
Фиг. 16

Белок	Мишень	Мономер	Димер	Другие	Вязкость при 150 мг/мл при 25°С
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

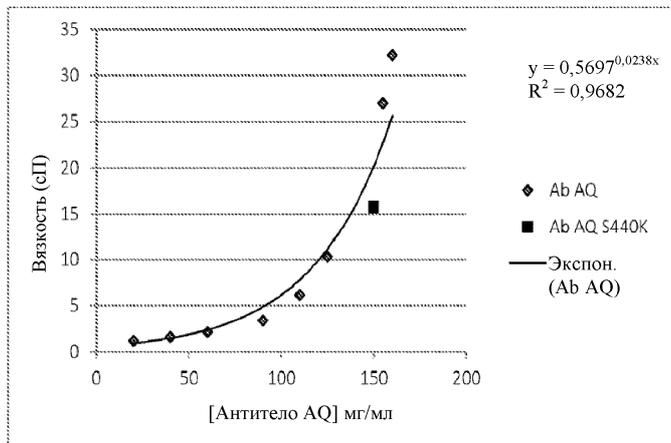
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19А

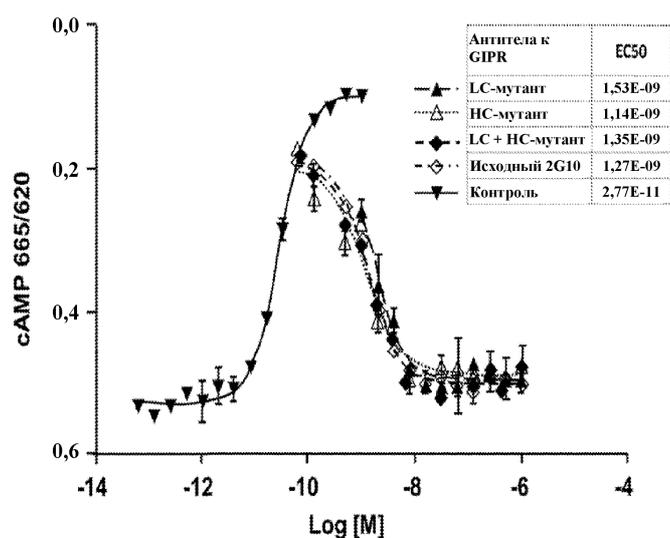


Фиг. 19В

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

Фиг. 20А

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



Фиг. 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

Фиг. 21

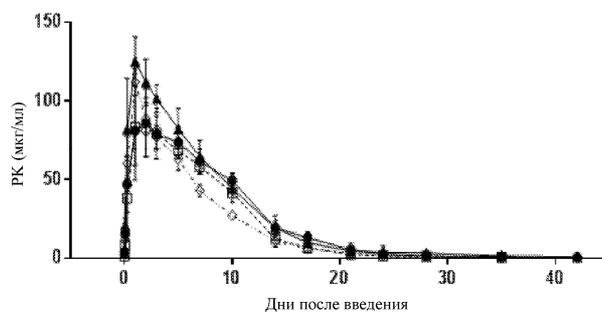
Группа и уровень дозы	T _{max} (день)	C _{max} (мкг/мл)	AUC _{last} (день*мкг/мл)	AUC _{last/D} (день*кг*мкг/мл*мг)
Антитело АК, 10 мг/кг	2,5	87,8	923	92,3
Антитело АК (мутация Fab), 10 мг/кг	2,5	91,1	807	80,7
Антитело АК (мутация Fc), 10 мг/кг	0,81	125	1020	102
Антитело АК (мутация Fab + Fc), 10 мг/кг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

Фиг. 22

Предварительное тестирование LDL-C, % *															
Животное №	Предв. тестиров. (1-й день СЛАВ)	Дни после введения													
		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%

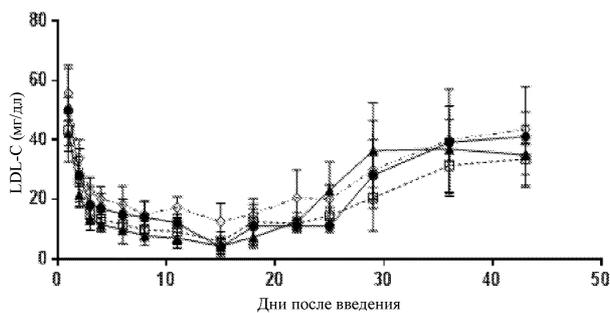
Фиг. 23

Фармакокинетика



Фиг. 24А

LDL-C (% отклония от исходного уровня)



Фиг. 24В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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