

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **024430**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.09.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/40** (2006.01)

(21) Номер заявки
201490470

(22) Дата подачи заявки
2012.09.12

(54) АНТИТЕЛА К PCSK9 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/535,625

(56) WO-A1-2011053759

(32) 2011.09.16

US-A1-2010166768

(33) US

WO-A2-2011111007

(43) 2014.06.30

NI YAN G. ET AL.: "A PCSK9-binding antibody that structurally mimics the EGF(A) domain of LDL-receptor reduces LDL cholesterol in vivo", JOURNAL OF LIPID RESEARCH, vol. 52, no. 1, January 2011 (2011-01), pages 78-86, XP002686538, ISSN: 0022-2275, page 83; figures 6A, 6B; table 1

(86) PCT/US2012/054737

(87) WO 2013/039958 2013.03.21

CHAN JOYCE C.Y. ET AL.: "A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 106, no. 24, 16 June 2009 (2009-06-16), pages 9820-9825, XP002570200, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0903849106, page 9821; figures 3, 4

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Дэвис Джулиан, Аллан Барретт,
Дарлинг Райан Джеймс (US)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Кондакова
Е.В., Соболев А.Ю. (RU)**

WO-A1-2011072263

(57) Изобретение относится к антителам к пропротеинконвертазе субтилизин/кесин типа 9 (PCSK9) или их антигенсвязывающим фрагментам, композициям, включающим такие антитела к PCSK9 или антигенсвязывающие фрагменты, и способам их применения для лечения гиперлипидемии или гиперхолестеринемии.

B1

024430

024430 B1

Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, настоящее изобретение относится к антителам к пропротеинконвертазе субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), композициям, включающим такие PCSK9-антитела, и способам применения PCSK9-антител для лечения гиперлипидемии или гиперхолестеринемии.

Пропропротеинконвертаза субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) является секретируемой сериновой протеазой, продуцируемой главным образом в печени, регулирующей концентрацию холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП-Х) в плазме. Секретируемая PCSK9 связывается и интернализуется с рецептором ЛПНП (LDLR), расположенным на поверхности гепатоцитов. Благодаря LDLR плазма очищается от ЛПНП-Х за счет связывания и транспортировки частиц ЛПНП в лизосомы, где происходит их разрушение. После доставки частицы ЛПНП для разрушения LDLR восстанавливаются на поверхности гепатоцитов, где связывает и интернализует следующую молекулу ЛПНП-Х из плазмы. PCSK9 регулирует уровень ЛПНП-Х в плазме, направляя интернализированный LDLR на разрушение, а не на восстановление на поверхности клетки, за счет чего снижается клиренс ЛПНП-Х. Исследования на грызунах с дефицитом или сверхэкспрессией PCSK9 подтвердили, что PCSK9 контролирует уровни циркулирующего ЛПНП путем регуляции уровней LDLR. Данные о том, что циркулирующая PCSK9 участвует в разрушении LDLR печени, указывают, что нейтрализация PCSK9 антителами является перспективным терапевтическим подходом к снижению ЛПНП-Х. Кроме того, сообщалось, что статины, в настоящее время являющиеся стандартным средством для снижения ЛПНП-Х, фактически могут увеличивать экспрессию и уровни PCSK9 в сыворотке. Таким образом, антитело к PCSK9 также может снижать ЛПНП-Х синергично с лечением статинами.

Антитела к PCSK9 и их влияние на снижение ЛПНП-Х в плазме известны в данной области техники. Например, в US 2009/0246192, US 2009/0142352, US 2010/0166768 и WO 2010/029513 описаны такие антитела к PCSK9 и их применение. Тем не менее, в настоящее время отсутствуют антитела, мишенью которых является PCSK9, одобренные для терапевтического применения. Таким образом, остается потребность в альтернативных PCSK9-антителах. В частности, остается потребность в альтернативных PCSK9-антителах, эффективно снижающих уровень ЛПНП-Х. В частности, остается потребность в альтернативных антителах к PCSK9, эффективно снижающих уровень ЛПНП-Х и обеспечивающих пролонгированное действие (например, пролонгированную супрессию уровня ЛПНП-Х). В предпочтительном случае такие антитела также обладают хорошими физико-химическими свойствами, облегчающими разработку, производство или изготовление лекарственных препаратов.

Настоящее изобретение обеспечивает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), причем HCVR включает гипервариабельные участки (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а LCVR содержит CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем аминокислотная последовательность HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 2, аминокислотная последовательность HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 3, аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 4, аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 5, а аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 6, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PCSK9 человека. В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), причем аминокислотная последовательность HCVR представляет собой SEQ ID NO: 7, а аминокислотная последовательность LCVR представляет собой SEQ ID NO: 8, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PCSK9 человека. В еще одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее две вариабельные области тяжелой цепи (HCVR) и две вариабельные области легкой цепи (LCVR), причем аминокислотная последовательность каждой HCVR представляет собой SEQ ID NO: 7, а аминокислотная последовательность каждой LCVR представляет собой SEQ ID NO: 8.

В еще одном конкретном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем аминокислотная последовательность HC представляет собой SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность LC представляет собой SEQ ID NO: 10. В другом конкретном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает антитело, включающее две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), причем аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 10. В другом конкретном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает антитело, включающее две HC и две LC, причем аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 10.

Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтические композиции, включающие антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемые носители, разбавители или вспомогательные вещества. Более конкретно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению дополнительно включает один или несколько дополнительных тера-

пептических агентов.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения гиперлипидемии или гиперхолестеринемии, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению. Настоящее изобретение также обеспечивает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению для применения в терапии. Настоящее изобретение также обеспечивает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению для применения при лечении гиперлипидемии или гиперхолестеринемии. Настоящее изобретение также обеспечивает применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения гиперлипидемии или гиперхолестеринемии.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты и векторам экспрессии, кодирующим антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает антитело, полученное способом, причем указанный способ включает (а) культивирование клетки-хозяина, включающей первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, заданную SEQ ID NO: 9, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую полипептидную последовательность, заданную SEQ ID NO: 10, при условиях, в которых экспрессируется указанная полипептидная последовательность, и (б) выделение из указанной клетки-хозяина антитела, включающего тяжелую цепь и легкую цепь, причем полипептидная последовательность указанной тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 9, а полипептидная последовательность указанной легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 10. Конкретнее, антитело, получаемое указанным способом, включает две тяжелые цепи и две легкие цепи, причем полипептидная последовательность каждой тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 9, а полипептидная последовательность каждой легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 10.

Полноразмерное антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, включающую две тяжелые (H) и две легкие (L) цепи, связанные друг с другом дисульфидными связями. N-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область размером около 100-110 аминокислот, ответственных, в первую очередь, за распознавание антигена гипервариабельными участками (CDR), содержащихся в них. C-концевая часть каждой цепи ограничивает константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. Легкие цепи подразделяются на каппа- или лямбда-, каждая из которых характеризуется определенной константной областью, как известно в данной области техники. Тяжелые цепи подразделяются на гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эpsilon- и определяют изотип антитела - IgG, IgM, IgA, IgD или IgE соответственно. Антитела IgG, кроме того, делятся на подклассы, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Каждый тип тяжелой цепи также характеризуется определенной константной областью с последовательностью, общеизвестной специалистам. "Антигенсвязывающий фрагмент" в настоящем документе относится к Fab-фрагментам, Fab'-фрагментам, F(ab')₂-фрагментам и одноцепочечным Fv-фрагментам, связывающимся с PCSK9 человека. Термин "связываться (или "связывается") с PCSK9 человека" в настоящем документе относится к взаимодействию с эпитопом на PCSK9 человека, представленным аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14. Термин "эпитоп" в настоящем документе относится к отдельному трехмерному сайту на поверхности антигена, распознаваемому антителами или антигенсвязывающими фрагментами согласно изобретению.

CDR перемежаются участками, которые являются более консервативными и называются каркасными участками ("FR"). Каждая вариабельная область легкой цепи (LCVR) и вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Три CDR легкой цепи обозначаются как "LCDR1, LCDR2 и LCDR3", а три CDR тяжелой цепи обозначаются как "HCDR1, HCDR2 и HCDR3". CDR содержат большую часть остатков, участвующих в специфическом взаимодействии с антигеном. Нумерацию и определение положения аминокислотных остатков в CDR в пределах областей LCVR и HCVR антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению можно выполнить в соответствии с общеизвестным правилом нумерации Kabat (LCDR 1-3, HCDR2-3) или в соответствии с Kabat и Chothia (HCDR1).

Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны специалистам в данной области техники, соответствующую информацию можно найти, например, в Harlow and Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, chapters 5-8 and 15. Например, можно иммунизировать мышью PCSK9 человека или ее фрагментами, а затем выделить, очистить и определить аминокислотные последовательности полученных антител с использованием обычных способов, хорошо известных в данной области техники. Антигенсвязывающие фрагменты также можно получить с помощью обычных способов. Антитело или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению сконструированы таким образом, что содержат одну или несколько каркасных областей человека, окружающих участки CDR, полученные из антитела нечеловеческого происхождения. Последовательности каркасной области антител эмбрионального типа человека можно получить в ImMunoGeneTics (IMGT) через их веб-сайт <http://imgt.cines.fr>, или из *The Immunoglobulin Facts Book* Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN

012441351. Конкретные каркасные области легкой цепи эмбрионального типа для использования в составе антитела или антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению включают А3 и О2. Конкретные каркасные области тяжелой цепи эмбрионального типа для использования в составе антитела или антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению включают VН3-21 и VН3-23.

Сконструированные антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению можно получить и очистить в соответствии с известными способами. Например, последовательности кДНК, кодирующие тяжелую цепь (например, аминокислотную последовательность, заданную SEQ ID NO: 9) и легкую цепь (например, аминокислотную последовательность, заданную SEQ ID NO: 10), можно клонировать и сконструировать в экспрессирующем векторе GS (глутаминсинтетаза). Сконструированный иммуноглобулин-вектор экспрессии затем можно стабильно трансфицировать в клетки CHO. Специалисту в данной области техники известно, что экспрессия антител у млекопитающего приведет к гликозилированию, обычно по высококонсервативным сайтам N-гликозилирования в Fc-области. Стабильные клоны можно проверить на экспрессию антитела, специфически связывающегося с PCSK9 человека. Положительные клоны можно размножить в бессывороточной культуральной среде для продуцирования антител в биореакторах. Среду, в которую секретируются антитела, можно очистить обычными способами. Например, среду можно нанести на колонку с белком А- или G-сефарозой FF, уравновешенную совместимым буфером, например фосфатно-солевым буфером. Колонку промывают для удаления неспецифически связавшихся компонентов. Связанное антитело элюируют, например, градиентом рН и детектируют фракции антитела, например, методом электрофореза в ДСН-ПААГ, а затем объединяют их. Антитело можно концентрировать и/или подвергнуть стерильной фильтрации с помощью распространенных методик. Растворимые агрегаты и мультимеры можно эффективно удалить с использованием обычных методик, включая эксклюзионную, гидрофобную, ионообменную хроматографию или хроматографию на гидроксипатите. Продукт можно немедленно заморозить, например, при -70°C или лиофилизировать.

Антитела согласно настоящему изобретению являются моноклональными антителами. В настоящем документе термин "моноклональное антитело" или "mАт" относится к антителу, происходящему от единственной копии или клона, включая, например, клон эукариотической, прокариотической клетки или фага, а не к способу, которым оно получено. Моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты можно получить, например, с использованием гибридомных технологий, рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий, например CDR-трансплантации, или их комбинации, или иных технологий, известных в данной области техники.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или нуклеиновая кислота, кодирующая их, представлены в изолированной форме. В настоящем описании термин "изолированный" (выделенный) относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, не содержащим или по существу не содержащим других макромолекулярных соединений, встречающихся в клеточном окружении. В настоящем описании термин "по существу не содержащий" означает, что белок, пептид или нуклеиновая кислота, представляющие интерес, состоят из представленных высокомолекулярных соединений более чем на 80% (в молярном соотношении), предпочтительно более чем на 90% и более предпочтительно более чем на 95%.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению можно применять при лечении пациентов. Термин "лечение" (или "лечить") относится к замедлению, прерыванию, купированию, облегчению, остановке, снижению или обращению развития или тяжести существующего симптома, расстройства, состояния или заболевания. В настоящем описании "пациент" относится к человеку или млекопитающему, не являющемуся человеком, однако предпочтительно относится к человеку. В настоящем описании термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, которое при однократном или многократном введении пациенту обеспечивает желательное воздействие на пациента, подвергаемого лечению. Эффективное количество может легко определить лечащий диагност, как специалист в данной области техники с учетом ряда факторов, например вида млекопитающего; его размера, возраста и общего состояния здоровья; конкретного заболевания; степени или тяжести заболевания; реакции отдельного пациента; конкретного вводимого антитела; режима введения; характеристик биодоступности вводимого препарата; выбранной схемы приема и применения сопутствующих препаратов.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению или включающие их фармацевтические композиции можно вводить парентеральным путем (например, подкожно, внутривенно, внутривнутрино, внутримышечно или трансдермально). Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно получить способами, широко известными в данной области техники (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.); указанные композиции включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. Например, можно получить состав антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению с такими агентами, как цитрат на-

трия, лимонная кислота, полисорбат 80 и сахара, а затем лиофилизировать полученную композицию и хранить ее при 2-8°C. Затем лиофилированная композиция может быть восстановлена в стерильной воде для инъекций перед введением.

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение; в то же время понятно, что примеры приведены в качестве иллюстрации, а не ограничения и что специалист в данной области техники может внести в них различные изменения.

Пример 1. Сконструированное PCSK9-антитело.

Мышь иммунизировали пептидом, включающим укороченный по С-концу фрагмент PCSK9 человека (SEQ ID NO: 17); IgG-антитела, связывающие PCSK9, выделяли и клонировали с помощью стандартных способов. CDR выделенных Fab мыши рандомизировали путем мутагенеза и проводили скрининг сродства полученных антител к PCSK9 человека. Мутации, усиливающие сродство, объединяли и оптимизированные CDR встраивали в каркасные области VH3-21 и A3 тяжелых и легких цепей человека соответственно. Для дальнейшей оптимизации биофизических свойств гуманизованного антитела ввели направленные замены ароматических и гидрофобных аминокислот в последовательности CDR. Кроме того, выполняли скрининг дополнительных мутаций, усиливающих сродство, в рандомизированных библиотеках CDR. Благоприятные мутации CDR объединяли случайным образом и экспрессировали, а затем выполняли скрининг сродства полученных антител к PCSK9 человека. Получили полноразмерное гуманизованное и оптимизированное PCSK9-антитело, содержащее следующие аминокислотные последовательности.

Фрагмент мАт	Аминокислотная последовательность
HCDR1	SEQ ID NO: 1
HCDR2	SEQ ID NO: 2
HCDR3	SEQ ID NO: 3
HCVR	SEQ ID NO: 7
HC	SEQ ID NO: 9
LCDR1	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SEQ ID NO: 5
LCDR3	SEQ ID NO: 6
LCVR	SEQ ID NO: 8
LC	SEQ ID NO: 10

Соответствующие последовательности кДНК, кодирующие аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно представляют собой:

Фрагмент мАт	Кодирующая последовательность кДНК
HC	SEQ ID NO: 11
LC	SEQ ID NO: 12

Пример 2. Экспрессия сконструированного PCSK9-антитела.

Сконструированное антитело к PCSK9 согласно примеру 1 можно экспрессировать в стабильно трансфицированных клетках линии CHO. Глутаминсинтетазный (GS) вектор экспрессии, содержащий кДНК SEQ ID NO: 11 (кодирующую аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 9) и SEQ ID NO: 12 (кодирующую аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 10), использовали для трансфекции линии клеток китайского хомячка CHOK1SV (Lonza Biologies PLC, Slough, Великобритания) путем электропорации. Указанный вектор экспрессии кодировал ранний SV (вирус обезьян 40E) промотор и ген GS. Экспрессия GS обеспечивала биохимический синтез глутамина, аминокислоты, необходимой клеткам CHOK1SV. После трансфекции клетки подвергали массовому отбору с использованием 50 мкМ L-метионинсульфоксимином (MSX). Для увеличения жесткости отбора использовали ингибирование GS с помощью MSX. Клетки с кДНК вектора экспрессии, встроенной в транскрипционно активные области генома клетки-хозяина, можно отобрать путем сравнения с клетками CHOK1SV дикого типа, экспрессирующими эндогенный уровень GS. Жидкую культуру подвергали клонированию одиночных клеток с использованием технологии флуоресцентной сортировки клеток (FACS); клонированные линии клеток размножали и подвергали скринингу экспрессии сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1.

Пример 3. Эпитопное связывание.

PCSK9-связывающий эпитоп IgG мыши (из которого было получено сконструированное антитело к PCSK9 из примера 1) определяли путем экстракции эпитопа и масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом и сужали до области в пределах линейной аминокислотной последовательности 160-181 каталитического домена PCSK9 человека (нумерация аминокислот основана на полноразмерной последовательности PCSK9 человека, включая сигнальный пептид размером 28 аминокислот). Взаимодействие сконструированного антитела в соответствии с примером 1 с указанным эпитопом каталитического домена PCSK9 человека подтверждали оценкой его связывания с синтетическими пептидами, соответствующими остаткам 160-181 (табл. 1). Сконструированное антитело в соответствии с примером 1 связывало пептид 160-181 с более высоким сродством, чем интактную PCSK9 человека, причем различие было обусловлено повышенной скоростью ассоциации (k_{on}). Скорость диссоциации (k_{off}) менее чем в 2 раза превышала аналогичный параметр интактной PCSK9, что указывало на близкую силу взаимодействия (после связывания). Кроме того, данные показывают, что почти все детерминанты связывания содержатся в указанной линейной области PCSK9. Связывание сконструированного антитела в соответствии с примером 1 с пептидом 166-181 было значительно слабее, чем с пептидом 160-181, что демонстрировало роль аминокислоты (или нескольких аминокислот) в области 160-165. Связывание сконструированного антитела в соответствии с примером 1 с пептидом 163-174 было значительно сильнее, чем с пептидом 166-181, что также указывало на вклад остатков 163-165.

Таблица 1

Кинетика связывания и сродство антитела в соответствии с примером 1 к пептидам, соответствующим последовательностям каталитического домена PCSK9 человека

Фрагмент PCSK9	Последовательность	k_{on} (1/М с)	k_{off} (1/с)	K_D (нМ)
зрелая hPCSK9 С-концевой His*	(SEQ ID NO: 13)	8,67E +04	1,50E-04	1,8
hPCSK9 160- 181**	RITPPRYRADEYQPPDGGSLVE (SEQ ID NO: 14)	1,45E +06	2,42E-04	0,17
hPCSK9 166- 181**	YRADEYQPPDGGSLVE (SEQ ID NO: 15)	4,58E +06	1,56E-01	34
hPCSK9 163- 174**	PPRYRADEYQPP (SEQ ID NO: 16)	2,75E +06	8,31E-03	3,0

*Использовали зрелую форму hPCSK9, не содержащую сигнальный пептид размером 28 аминокислот и содержащую С-концевой His-маркер.

**Номера аминокислот присваивали в соответствии с полной PCSK9 человека, включающей сигнальный пептид размером 28 аминокислот.

Пример 4. Кинетика связывания и сродство.

Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), широко известный в данной области техники, использовали для оценки кинетики связывания и сродства тестируемого антитела к PCSK9 к PCSK9 человека, яванского макака, мыши, крысы и кролика. При использовании буфера с физиологическими параметрами (ионной силой и pH) и температурой (37°C) сконструированное антитело в соответствии с примером 1 связывалось с PCSK9 человека со средней константой ассоциации (k_{on}) $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и средней константой диссоциации (k_{off}) $1,2 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Средняя K_D связывания PCSK9 человека со сконструированным антителом в соответствии с примером 1 составила приблизительно 11 нМ. Сконструированное антитело в соответствии с примером 1 связывалось с PCSK9 яванского макака со средней скоростью ассоциации (k_{on}) $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и средней скоростью диссоциации (k_{off}) $2,5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, что обеспечивало K_D связывания с PCSK9 яванского макака приблизительно 25 нМ. В табл. 2 показана сводная информация по дополнительным результатам, полученным для сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 с использованием PCSK9 мыши, крысы и кролика. Приведенные данные показывают, что сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 связывалось с PCSK9 как человека, так и яванского макака с наномолярным сродством при физиологических pH, ионной силе и температуре.

Таблица 2

Кинетика связывания и сродство антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 к PCSK9 человека, яванского макака, мыши, крысы и кролика

Антиген	K_{on}	K_{off}	K_D	n
	Среднее \pm CO $M^1c^{-1} (10^5)$	Среднее \pm CO $c^{-1} (10^{-3})$	Среднее \pm CO нМ	
PCSK9 человека*	1,2 \pm 0,46	1,2 \pm 0,18	11 \pm 2,9	6
PCSK9 яванского макака*	1,1 \pm 0,51	2,5 \pm 0,79	25 \pm 6,8	4
PCSK9 мыши*	NB	NB	NB	3
PCSK9 крысы*	NB	NB	NB	2
PCSK9 кролика*	NB	NB	NB	3

"NB" Связывание не обнаружено.

*Анализ выполняли при 37°C.

**Анализ выполняли при 25°C.

Пример 5. Ингибирование связывания PCSK9 с рецептором ЛПНП.

PCSK9 регулирует уровень ЛПНП-Х в плазме, снижая содержание LDLR в печени, что приводит к снижению поглощения ЛПНП гепатоцитами. Каталитический домен PCSK9 является областью, связывающейся с LDLR. Таким образом, ожидается, что антитела, распознающие каталитический домен PCSK9, ингибируют связывание PCSK9 с LDLR.

Для определения влияния тестируемого антитела к PCSK9 на связывание PCSK9 с рецептором ЛПНП использовали формат AlphaLISA®. Рекombинантную полноразмерную PCSK9, используемую в анализе, экспрессировали как белок с С-концевым HIS-маркером в стабильной линии клеток 293 эмбриональной почки человека (HEK) (Qian et al., J. Lipid Res. 48: 1488-1498, 2007). Рекombинантный внеклеточный домен рецептора ЛПНП экспрессировали как белок с С-концевым FLAG-маркером в транзитентно трансфицированных клетках HEK 293E (Qian et al., J. Lipid Res. 48: 1488-1498, 2007). мАт мыши к PCSK9, связывавшееся с С-концевым доменом PCSK9 человека, экспрессировали в клетках HEK 293 и очищали на аффинной колонке с белком G, а затем на Superdex 200. Моноклональное антитело ANTI-FLAG® BioM2 (Sigma) является очищенным моноклональным IgG1-антителом мыши, ковалентно связанным с биотином гидразидной связью. ANTI-FLAG BioM2 распознает последовательность FLAG на N-конце, Met-N-конце или C-конце гибридных FLAG-белков. ANTI-FLAG BioM2 можно обнаружить с помощью конъюгатов авидина или стрептавидина. Моноклональное антитело ANTI-FLAG BioM2 поставлялось в растворе 50% глицерина, 10 мМ фосфата натрия, pH 7,25, 150 мМ NaCl, содержащем 0,02% азид натрия, и хранилось при температуре -20°C.

Эксперименты AlphaLISA® проводили в 384-луночных белых планшетах ProxiPlate (Perkin Elmer) с использованием 25 мМ HEPES; pH 7,5, 100 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl₂, 0,5% TX-100, 0,1% казеина, 1 мг/мл декстрана-500 и 0,05% Proclin-300 в качестве буфера. В анализе использовали донорные гранулы со стрептавидином AlphaLISA® Streptavidin Donor Beads (Perkin Elmer) и мАт мыши против PCSK9, конъюгированное с акцепторными гранулами AlphaLISA® Acceptor beads. Когда гранулы располагались в непосредственной близости друг от друга за счет взаимодействия партнеров по связыванию - PCSK9 и LDLR, происходил перенос синглетного кислорода с донорной гранулы на акцепторную гранулу. При возбуждении лазером при 680 нм синглетный кислород возбуждает акцепторную гранулу, что приводит к световому излучению. Акцепторные гранулы связывали с мАт мыши к PCSK9 за счет восстановительного аминирования, используя NaBH₃CN (Sigma), и хранили при 4°C. Акцепторные гранулы, конъюгированные с мАт против PCSK9 (22 мкг/мл) предварительно нагружали 2,22 нМ PCSK9 в течение 1 ч. Донорные гранулы (44 мкг/мл) предварительно нагружали 5,55 нМ ANTI-FLAG® BioM2 и 2,22 нМ LDLR, содержащего FLAG-маркер, в течение 1 ч.

После предварительной загрузки в ProxiPlate, содержащий 9 мкл каждой смеси гранул (конечная концентрация PCSK9 и LDLR = 1 нМ), добавляли 2 мкл тестируемого антитела к PCSK9 или контрольного IgG с помощью полностью автоматизированного Multimek (Beckman) и оставляли связываться в течение ночи при комнатной температуре. Сигнал AlphaLISA® (событий в секунду) измеряли с помощью Envision Turbo (Perkin Elmer). Все эксперименты с анализом AlphaLISA® проводили в условиях

низкой освещенности. При осуществлении процедур, по существу, так, как описано выше, связывание PCSK9 человека с LDLR в анализе AlphaLISA® возрастало в зависимости от концентрации PCSK9. Добавление сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 (тестируемого PCSK9-антитела) вызывало зависимое от концентрации полное ингибирование связывания PCSK9 с LDLR при средней IC_{50} приблизительно 90 пМ. Контрольный IgG4 не оказывал влияния в ходе анализа. Результаты указанного анализа продемонстрировали, что сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 ингибировало связывание PCSK9 с LDLR.

Пример 6. Ингибирование функции PCSK9 в клетках HepG2.

Для определения влияния тестируемого антитела к PCSK9 на плотность LDLR на гепатоцитах клетки HepG2 человека культивировали в колбах T75 с поли-D-лизиновым покрытием. Через 24 ч клетки высевали в количестве 5000 клеток/лунку в 100 мкл среды DMEM/F-12 (3:1), содержащей 5% (об./об.) сыворотки человека, истощенной по липопротеинам (LPDS; Intracel) в 96-луночные черные планшеты с поли-D-лизиновым покрытием (Vecton-Dickinson). После инкубирования в течение ночи в среде, содержащей LPDS, клетки инкубировали с 69 нМ (5 мкг/мл) рекомбинантной PCSK9 человека с C-концевым HIS-маркером и тестируемым PCSK9-антителом или контрольным IgG4-антителом в концентрациях от 2,6 до 1333 нМ в течение 2 ч. Все этапы инкубирования выполняли при 37°C. Мониторинг уровня LDLR осуществляли с использованием LDLR-антитела (Progen), флуоресцентно меченого Zenon® Alexa Fluor® 488 и при помощи набора для мечения IgG2b мыши Mouse IgG2b Labeling Kit (Invitrogen). Клетки инкубировали с детекторным антителом в течение 90 мин при комнатной температуре, а затем фиксировали в течение 10 мин с использованием фиксатора, не содержащего формалина (Prefer; ANATECH, Ltd), с последующей пермеабиллизацией в 0,01% тритоне X-100. Клетки окрашивали 10 мкг/мл пропидий-йодида (Invitrogen) для определения общего количества клеток. Количественную оценку сигнала LDLR осуществляли с помощью лазерного сканирующего флуоресцентного микропланшетного цитометра с детектором флуоресценции Acumen Explorer™ (TTP LabTech).

При осуществлении процедур, по существу, как описано выше, PCSK9 человека вызывала снижение LDLR на клетках HepG2 в зависимости от концентрации, причем EC_{50} составляла 18 нМ. Сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 (тестируемое PCSK9-антитело) ингибировало PCSK9-индуцированную супрессию LDLR на клетках HepG2, причем IC_{50} составляла 104 нМ. Контрольный IgG4 человека был относительно неактивен при концентрациях до 1333 нМ. Указанные данные продемонстрировали, что сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 ингибировало PCSK9-опосредованное разрушение LDLR.

Пример 7. Ингибирование PCSK9-индуцированного снижения поглощения ЛПНП.

Для определения влияния тестируемого антитела к PCSK9 на поглощение ЛПНП клетки HepG2 высевали в количестве 5000 клеток/лунку в 100 мкл среды DMEM/F-12 (3:1) с 5% LPDS человека в 96-луночные черные планшеты с поли-D-лизиновым покрытием и инкубировали при 37° С в атмосфере 5% CO_2 в течение 18 ч. PCSK9 человека (69 нМ) добавляли к клеткам с тестируемым PCSK9-антителом или контрольным IgG4 человека или без них в концентрациях от 2,6 до 1333 нМ и предварительно инкубировали с клетками в течение 2 ч при 37°C. После добавления 100 нг/лунку флуоресцентно меченого ЛПНП (BODIPY-LDL, Invitrogen) клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Клетки фиксировали в фиксаторе, не содержащем формалина (Prefer; ANATECH, Ltd.) в течение 20 мин при комнатной температуре. После двукратной промывки клеток ФБР клетки пермеабиллизовали буфером ФБР, содержащем 0,01% тритон X-100, в течение 15 мин при комнатной температуре и окрашивали 10 мкг/мл пропидий-йодида для определения общего количества клеток. Поглощение ЛПНП определяли с использованием лазерного сканирующего флуоресцентного микропланшетного цитометра Acumen Explorer™ и выражали в процентах флуоресцентных клеток по отношению к общему количеству клеток. Ответ тестируемого антитела к PCSK9 или контрольного IgG выражали в виде процентного ингибирования PCSK9, т.е. процента восстановления максимального поглощения ЛПНП в отсутствие PCSK9 по сравнению с исходным поглощением ЛПНП-Х в присутствии только PCSK9. Кроме того, рассчитывали соответствующие значения IC_{50} для ингибирования PCSK9-индуцированного снижения поглощения ЛПНП.

При осуществлении процедур, по существу, как описано выше, PCSK9 человека вызывала снижение поглощения ЛПНП клетками HepG2 в зависимости от концентрации, причем EC_{50} составляла 32 нМ. Сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 (тестируемое PCSK9-антитело) обращало PCSK9-индуцированное ингибирование, что приводило к усилению поглощения ЛПНП, в то время как контрольный IgG не вызывал обращения ингибирования. Конкретно, сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 продемонстрировало среднее максимальное процентное ингибирование PCSK9 на 84% при среднем значении IC_{50} 194 нМ. Указанные данные продемонстрировали, что сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 ингибировало PCSK9-индуцированное снижение поглощения ЛПНП.

Пример 8. Эффективность *in vivo*.

Для определения фармакокинетических (ФК) и фармакодинамических (ФД) эффектов тестируемого антитела к PCSK9 *in vivo* тестируемое антитело можно ввести здоровым яванским макакам и затем определить различные ФК- и ФД-параметры. Например, тестируемое антитело к PCSK9 можно внутривенно или подкожно ввести здоровым, не подвергавшимся ранее воздействию PCSK9 яванским макакам и затем измерить концентрацию тестируемого антитела в сыворотке с использованием сэндвич-твердофазного ИФА с IgG человека. Концентрации в сыворотке, полученные в различные моменты времени после введения антитела, можно использовать для определения различных ФК-параметров тестируемого антитела, включая $T_{1/2}$, C_{max} , ППК и клиренс в плазме (CL). Аналогично, тестируемое антитело к PCSK9 можно внутривенно или подкожно ввести здоровым наивным яванским макакам и затем измерить концентрацию ЛПНП-Х в сыворотке с использованием автоматического анализатора (Direct LDL-C Plus, 2nd Gen., Roche Diagnostics).

Осуществляя процедуры, по существу, как описано выше, оценивали фармакокинетику сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 у здоровых яванских макаков после однократного внутривенного введения в дозе 1, 5 или 15 мг/кг и после однократного подкожного введения в дозе 5 мг/кг. Фармакокинетические параметры, определенные в ходе указанных исследований, представлены ниже в табл. 3.

Таблица 3

Фармакокинетические параметры сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 у яванских макаков

Внутривенно (n = 4 / группу)						
Доза (мг/кг)	$T_{1/2}$ (d)	C_{max} (мкг/мл)	ППК _{общая} (ч * мкг/мл)	CL (мл/ч/кг)		
1	5,4 ± 1,0	19,8 ± 1,1	2218 ± 222	0,45 ± 0,04		
5	7,3 ± 1,3	107,3 ± 3,2	14378 ± 1374	0,35 ± 0,04		
15	8,4 ± 3,0	260,3 ± 45,0	57290 ± 16535	0,28 ± 0,07		

Подкожно (n = 3 / группу)						
Доза (мг/кг)	T_{max} (сут)	C_{max} (мкг/мл)	$T_{1/2}$ (d)	ППК _{общая} (ч * мкг/мл)	CL/F (мл/ч/кг)	%F
5	2,7 ± 0,6	32,4 ± 1,9	5,4 ± 0,7	11575 ± 1345	0,44 ± 0,05	81

ЛПНП в сыворотке измеряли после введения сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 в двух независимых исследованиях. В обоих исследованиях свидетельства супрессии ЛПНП-Х были заметны в течение 24 ч после введения сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1. После внутривенного (в/в) введения антитела в соответствии с примером 1 в дозе 5 мг/кг наблюдали максимальное среднее снижение ЛПНП-Х на 60% (исследование 1) и на 25% (исследование 2). При в/в введении 5 мг/кг средняя супрессия ЛПНП-Х поддерживалась в течение приблизительно 8 недель (исследование 1) и 2 недель (исследование 2). В исследовании 2 отмечено умеренное влияние дозы (1-15 мг/кг) на величину супрессии ЛПНП-Х (25-35%). Влияние дозы на продолжительность супрессии ЛПНП-Х было более очевидным. При подкожном введении (5 мг/кг) сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 эффективно обеспечивало супрессию уровня ЛПНП-Х, причем величина супрессии была аналогична таковой после внутривенного введения. Влияние сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 на холестерин липопротеинов высокой плотности в любой дозе отсутствовало.

Пример 9. Физико-химические свойства сконструированного PCSK9-антитела.

Кроме того, обнаружено, что сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 обладало хорошей растворимостью, химической стабильностью и физической стабильностью.

А. Растворимость.

Для удобства приема желательна достаточно высокая растворимость. Например, доза 1 мг/кг при введении посредством 1,0-мл инъекции пациенту весом 100 кг требует растворимости, равной 100 мг/мл. Кроме того, желательно сохранение антитела в мономерном состоянии без образования высокомолекулярных (ВМС) агрегатов при высокой концентрации. Для определения растворимости тестируемого антитела указанное антитело можно диализовать в (1) 10 мМ цитрат, pH 6; (2) 10 мМ цитрат, pH 6, 150 мМ NaCl и (3) фосфатно-солевой буфер (ФБР) pH 7,4. Затем восстановленный диализат можно анализировать путем аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC) с целью измерения процентного содер-

жания ВМС. Затем тестируемое антитело можно концентрировать в 4-мл центрифужном концентраторе при ~25°C до предела растворимости или свободного объема концентратора. При достижении свободного объема, концентрацию регистрировали как \geq . Затем концентрированное антитело можно анализировать методом эксклюзионной хроматографии для измерения процентного содержания ВМС. Для определения обратимости увеличения % ВМС при концентрировании концентрированный образец можно разбавить до 1 мг/мл и исследовать методом эксклюзионной хроматографии.

При осуществлении процедур, по существу, как описано выше, сконструированное антитело к PCSK9 в соответствии с примером 1 проявляло растворимость более 128 мг/мл при всех протестированных условиях. Кроме того, при высоких концентрациях имел место лишь низкий уровень ВМС.

Таблица 4

Процент ВМС-соединений в образцах для исследования растворимости, определенным методом эксклюзионной хроматографии				
	% ВМС (дизайнат)	% (концентрат)	% (разбавление)	1 ВМС (мг/мл)
10 мМ цитрат, рН 6	0,75 %	1,60 %	0,93 %	
10 мМ цитрат, 150 мМ NaCl рН 6	0,62 %	1,39%	0,90 %	
ФБР, рН 7,4	0,94 %	2,00 %	1,34%	

В. Химическая стабильность.

Химическая стабильность облегчает разработку составов препарата с достаточным сроком хранения. Для оценки химической стабильности тестируемого антитела можно изготовить составы указанного антитела в концентрации 1 мг/мл в 10 мМ цитратном буфере при рН 4, 5, 6 или 7. Затем составленные образцы инкубировали в течение 4 недель при 4, 25 и 40°C в рамках исследования ускоренного разложения. Изменения зарядового профиля антитела, отражающие химические изменения, можно оценить с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ) в соответствии со стандартными процедурами. При осуществлении процедур практически в соответствии с вышеприведенным описанием анализ химической стабильности сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 позволили получить следующие результаты.

Таблица 5

Химическая стабильность, определенная с помощью КИЭФ		
	Изменения % основного пика через 4 недели (по сравнению с 4° С)	
	(хранение при 25° С)	(хранение при 40° С)
10 мМ цитрат, рН 5	-0,4	NT
10 мМ цитрат, рН 6	-4,1	-24,7
10 мМ цитрат, рН 7	-7,7	NT

Результаты показывают, что через 4 недели хранения при 25°C % основного пика снижался лишь на 4,1 процентных пункта в составе с рН 6 (рН, часто используемом при изготовлении составов антител), что указывает на достаточную химическую стабильность сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 для облегчения разработки растворов с адекватным сроком хранения. Кроме того, указанное антитело также проявляло хорошую химическую стабильность при рН 5 и, в меньшей степени, при рН 7, что указывает на характеристики стабильности антитела, потенциально обеспечивающие изготовление составов в диапазоне рН.

С. Физическая стабильность.

Для оценки физической стабильности тестируемого антитела можно изготовить составы указанного антитела с концентрацией белка 1 мг/мл в 10 мМ цитратном буфере при рН 4, 5, 6 или 7 (или 10 мМ трис, рН 8). Затем образцы инкубировали в течение 4 недель при 4, 25 и 40°C в рамках исследования ускоренного разложения. После инкубирования оценивали физическую стабильность методом эксклюзионной хроматографии (SEC), отделявшей желательное мономерное антитело от агрегированного высокомолекулярного (ВМС) антитела.

В табл. 6 приведена сводная информация по результатам анализа физической стабильности сконструированного антитела к PCSK9 в соответствии с примером 1 после выполнения процедур, по существу,

как описано выше. Данные показывают, что при pH 5, 6 и 7 изменения содержания ВМС на протяжении 4 недель при 25 или 40°C составляли менее 1%, что указывает на хорошую физическую стабильность и устойчивость к самоассоциации и агрегации.

Таблица 6
Процент ВМС в образцах при оценке физической стабильности

	% ВМС, определенный с помощью SEC				
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
Исходный образец	0,26	0,32	0,40	0,50	1,31
25С в течение 4 недель	0,37	0,44	0,51	0,66	2,10
40С в течение 4 недель	20,34	1,15	1,02	1,32	3,41

Последовательности

HCDR1 - гипервариабельный участок 1 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1):

GFPFKLGVMV

HCDR2 - гипервариабельный участок 2 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 2):

TISSGGGYTYYPDSVKG

HCDR3 - гипервариабельный участок 3 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 3):

EGISFQGGTYTYVMDY

LCDR1 - гипервариабельный участок 1 легкой цепи (SEQ ID NO: 4):

RSSKLLHRNGITYSY

LCDR2- гипервариабельный участок 2 легкой цепи (SEQ ID NO: 5):

QLSNLAS

LCDR3 - гипервариабельный участок 1 легкой цепи (SEQ ID NO: 6):

YQNLELPLT

HCVR - переменная область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 7):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFPFKLGMVWVRQAPGKGLEWVSTISSGGGY
TYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGISFQGGTYTYVMDY
WGQGLTVTVSS

LCVR - переменная область легкой цепи (SEQ ID NO: 8):

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKLLHRNGITYSYWYLQKPGQSPQLLIYQLSNLA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQNLELPLTFGQGTKVEIK

HC - тяжелая цепь (SEQ ID NO: 9):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFPFKLGMVWVRQAPGKGLEWVSTISSGGGY
TYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGISFQGGTYTYVMDY
WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC

PPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
 DGSFFLYRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

LC - легкая цепь (SEQ ID NO: 10):

DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSKSLLRNGITYSYWYLQKPGQSPQLLIYQLSNLA
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQNLELPLTFGQGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

кДНК тяжелой цепи (HC) (SEQ ID NO: 11):

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCGTTCAGTAAGCTCGGCATGGTTTGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTGGTGG
 TTACACATACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCCAGAGACAATG
 CCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGT
 ATATTACTGTGCGAGAGAAGGAATTAGCTTTCAGGGTGGCACCTACACTTATGTTA
 TGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC
 CCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGC
 CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGTGGA
 ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGA
 CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGAC
 CTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
 GAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGG
 GACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACTCTCATGATCTCCCGG
 ACCCCTGAGGTACCGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCC
 AGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGG
 GGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCCAGCGTCTCACCGTCTGCACC
 AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCC
 GTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG
 GTGTACACCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGA
 CCTGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAAT
 GGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCT
 CCTTCTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAA

TGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGA
GCCTTCCCTGTCTCTGGGTTGA

кДНК легкой цепи (LC) (SEQ ID NO: 12)

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTACCCCTGGAGAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTTTACATCGTAATGGCATCACTTATTC
GTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATCAGCTGT
CCAACTTGCCTCAGGAGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGAT
TTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCTA
TCAAAATTAGAACTTCCGCTCACGTTCCGCCAGGGCACCAAGGTGGAAAATCAAA
CGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAACTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGT
CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGCTAA

hPCSK9 (SEQ ID NO: 13)

RAQEDGDYEELVLAALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEE
THLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYI
EEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVT
DFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNQCQKG
TVSGTLIGLEFIRKSQLVQVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQLRARAGVVLVTAAGN
FRDDACLSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTFNFGRCVDFAPGEDIIGASSDCS
TCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQLIHFSKDVINEAWFPEDQR
VLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSQPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRS
GKRRGERMEAQGGKLVCAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMG
RVHCHQQGHVLTGCSHWVEEDLGTHTKPPVLRPRGPNQCVGHREASIHASCCHAPG
LECKVKEHGIPAPQEQTVAACEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDS
TTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQDVHHHHHHH

hPCSK9 160-181 (SEQ ID NO: 14)

RITPPRYRADEYQPPDGGSLVE

hPCSK9 166-181 (SEQ ID NO: 15)

YRADEYQPPDGGSLVE

hPCSK9 163-174 (SEQ ID NO: 16)

PPRYRADEYQPP

hPCSK9, укороченная по С-концу (SEQ ID NO: 17)

QEDEDGDYEELVLAALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEETH
LSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEE
DSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVT
FENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNQCQKGT
VSGTLIGLEFIRKSQLVQVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQLRARAGVVLVTAAGNF
RDDACLSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTFNFGRCVDFAPGEDIIGASSDCST
CFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPEL

<110> ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ
<120> АНТИТЕЛА К РССК9 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ
<130> X19477
<150> 61/535625
<151> 2011-09-16
<160> 17
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая
<400> 1

Gly Phe Pro Phe Ser Lys Leu Gly Met Val
1 5 10

<210> 2
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая
<400> 2

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая
<400> 3

Glu Gly Ile Ser Phe Gln Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Val Met Asp Tyr

024430

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Lys Leu
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ile Ser Phe Gln Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Val Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

- <210> 8
- <211> 112
- <212> БЕЛОК
- <213> Искусственная
- <220>
- <223> Синтетическая
- <400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Ser Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Leu Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

024430

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Asn
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9
<211> 451
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Lys Leu
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ile Ser Phe Gln Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Val Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
130 135 140

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

024430

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

024430

aggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggctgctgg tcaaggacta cttccccgaa
480

ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct
540

gtcctacagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc
600

ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaaac caaggtggac
660

aagagagttg agtccaaata tggccccca tgcccaccct gcccagcacc tgaggccgct
720

gggggacat cagtcttct gttccccca aaaccaagg aactctcat gatctcccg
780

acccctgagg tcacgtgctt ggtggtggac gtgagccagg aagacccga ggtccagttc
840

aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caagccgcg ggaggagcag
900

ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggtgaac
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc
1020

atctcctcagg ccaaggaggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag
1080

gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctccccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga aagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc
1260

agggtgcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggttga
1356

<210> 12
<211> 660
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая

<400> 12

024430

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc
60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctctta catcgtaatg gcatcactta ttcgtattgg
120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atcagctgtc caaccttgcc
180
tcaggagtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc
240
agcagggtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgct atcaaaatct agaacttccg
300
ctcacgttcg gccagggcac caagtgga atcaaacgga ctgtggctgc accatctgtc
360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg
420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa
480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaac acaaagtcta cgctgcgaa
600
gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgctaa
660

<210> 13
<211> 672
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая

<400> 13

Arg Ala Gln Glu Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Arg Ser Glu Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr
20 25 30

Thr Ala Thr Phe His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly
35 40 45

Thr Tyr Val Val Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu
50 55 60

024430

Arg Thr Ala Arg Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu
65 70 75 80

Thr Lys Ile Leu His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val
85 90 95

Lys Met Ser Gly Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val
100 105 110

Asp Tyr Ile Glu Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp
115 120 125

Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln
130 135 140

Pro Pro Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser
145 150 155 160

Ile Gln Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp
165 170 175

Phe Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala
180 185 190

Ser Lys Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly
195 200 205

Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val
210 215 220

Leu Asn Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu
225 230 235 240

Glu Phe Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val
245 250 255

Val Leu Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala
260 265 270

Cys Gln Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly
275 280 285

024430

Asn Phe Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu
 290 295 300

Val Ile Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu
 305 310 315 320

Gly Thr Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro
 325 330 335

Gly Glu Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val
 340 345 350

Ser Gln Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala
 355 360 365

Ala Met Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg
 370 375 380

Gln Arg Leu Ile His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp
 385 390 395 400

Phe Pro Glu Asp Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu
 405 410 415

Pro Pro Ser Thr His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val
 420 425 430

Trp Ser Ala His Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Val Ala Arg
 435 440 445

Cys Ala Pro Asp Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser
 450 455 460

Gly Lys Arg Arg Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val
 465 470 475 480

Cys Arg Ala His Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala
 485 490 495

Arg Cys Cys Leu Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro
 500 505 510

Pro Ala Glu Ala Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly
 515 520 525

024430

His Val Leu Thr Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly
530 535 540

Thr His Lys Pro Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys
545 550 555 560

Val Gly His Arg Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro
565 570 575

Gly Leu Glu Cys Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu
580 585 590

Gln Val Thr Val Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser
595 600 605

Ala Leu Pro Gly Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn
610 615 620

Thr Cys Val Val Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser
625 630 635 640

Glu Gly Ala Val Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu
645 650 655

Ala Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln Asp Val His His His His His His
660 665 670

<210> 14
<211> 22
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая

<400> 14

Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp
1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Val Glu
20

<210> 15
<211> 16

024430

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 15

Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 16

Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro
 1 5 10

<210> 17
 <211> 376
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 17

Gln Glu Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Ser Glu Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala
 20 25 30

Thr Phe His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr
 35 40 45

Val Val Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr
 50 55 60

Ala Arg Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys
 65 70 75 80

Ile Leu His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met
 85 90 95

024430

Ser Gly Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr
 100 105 110

Ile Glu Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu
 115 120 125

Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro
 130 135 140

Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln
 145 150 155 160 165

Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu
 165 170 175

Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys
 180 185 190

Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp
 195 200 205

Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn
 210 215 220

Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe
 225 230 235 240

Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu
 245 250 255

Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln
 260 265 270

Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe
 275 280 285

Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile
 290 295 300

Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr
 305 310 315 320

Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu
 325 330 335

Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln
 340 345 350

Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met
 355 360 365

Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu
 370 375

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), причем HCVR включает гипервариабельные участки (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а LCVR включает CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем аминокислотная последовательность HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 2, аминокислотная последовательность HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 3, аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 4, аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 5, а аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 6, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PCSK9 человека.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), отличающийся тем, что аминокислотная последовательность HCVR представляет собой SEQ ID NO: 7, а аминокислотная последовательность LCVR представляет собой SEQ ID NO: 8.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, включающее две HCVR и две LCVR, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность каждой HCVR представляет собой SEQ ID NO: 7, а аминокислотная последовательность каждой LCVR представляет собой SEQ ID NO: 8.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), отличающийся тем, что аминокислотная последовательность HC представляет собой SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность LC представляет собой SEQ ID NO: 10.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, включающее две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), отличающийся тем, что аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 10.

6. Антитело для лечения гиперлипидемии или гиперхолестеринемии, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, причем аминокислотная последовательность каждой тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность каждой легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 10.

7. Фармацевтическая композиция для лечения гиперлипидемии или гиперхолестеринемии, включающая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

8. Способ лечения гиперлипидемии или гиперхолестеринемии, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.1.

9. Способ лечения гиперлипидемии или гиперхолестеринемии, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела по п.6.

