

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **019661**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2014.05.30

(21) Номер заявки
200970556

(22) Дата подачи заявки
2007.12.06

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

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ANGPTL3**

(31) **60/873,834**

(32) **2006.12.08**

(33) **US**

(43) **2010.04.30**

(86) **PCT/US2007/025080**

(87) **WO 2008/073300 2008.06.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЛЕКСИКОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Ли Э-Чжан, Ландес Грегори, Хонг
Сеокдзоо, Десай Урви, Пауэлл Дэвид,
Фэн Сяо (US)**

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

(56) **US-A1-20030215451**

US-A1-20030100051

Ono et al. Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiotensin-like 3 (ANGPTL3), ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. J. Biol. Chem. 2003, 278(43): 41804.9: Abstract, pg. 41806, fig. 1

WO-A1-2002101039

US-A-6074873

Buranda et al. Detection of epitope-tagged proteins in flow cytometry: fluorescence resonance energy transfer-based assays on beads with femtomole resolution. Anal. Biochem., 2001, 298(2):151-62; Abstract

WO-A2-9967382

(57) Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с ANGPTL3. Настоящее изобретение также относится к моноклональным антителам, нейтрализующим по меньшей мере одну активность ANGPTL3. Настоящее изобретение также относится к способам лечения расстройства, ассоциированного с нарушением метаболизма липидов, с использованием нейтрализующих моноклональных антител.

B1

019661

**019661
B1**

В настоящей заявке испрашивается преимущество предварительной заявки на патент США № 60/873834, поданной 8 декабря 2006 г., которая вводится в настоящее описание в различных целях посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с ангиопоэтин-подобным белком 3 (ANGPTL3). Настоящее изобретение относится к способам применения моноклональных антител, которые специфически связываются с ангиопоэтин-подобным белком 3 (ANGPTL3). Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим моноклональные антитела, которые специфически связываются с ангиопоэтин-подобным белком 3 (ANGPTL3).

Введение

Ангиопоэтин-подобный белок 3 (ANGPTL3) является консервативным белком у млекопитающих нескольких видов. Li C. (2006) *Curr. Opin. Lipidol.* 17 (2): 152-156. ANGPTL3 содержит N-концевой суперспирализованный домен и C-концевой фибриноген-подобный домен. Conklin D. et al. (1999) *Genomics* 62:477-482. N-концевой суперспирализованный домен опосредует олигомеризацию ANGPTL3. Ge, H. et al. (2005) *J. Lipid Res.* 46(7):1484-1490. Олигомеризованный ANGPTL3 подвергается протеолитическому процессингу *in vivo*, что приводит к отщеплению фибриноген-подобного домена. Ono M. et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278 (43):41804-41809.

ANGPTL3 экспрессируется преимущественно в печени. Koishi R. et al. (2002) *Nat. Genet.* 30 (2):151-157. ANGPTL3, очевидно, ингибирует липопротеин-липазную (ЛПЛ) активность и способствует замедлению клиренса липопротеина очень низкой плотности (ЛОНП). Shimizugawa T. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277 (37): 33742-33748. У мышей со спонтанными KK/San-мутациями имеется инсерция в экзоне 6 гена *Angptl3*, и у таких мышей обнаруживается заметная сывороточная гиполипидемия. Koishi et al. (2002) *Nat. Genet.*, 30 (2): 151-157. Опосредованная аденовирусом экспрессия ANGPTL3 или непосредственное введение ANGPTL3 приводит к устранению гиполипидемии у KK/San-мышей. Koishi et al. (2002) *Nat. Genet.* 30 (2): 151-157. Было обнаружено, что у *Angptl3*-дефицитных мышей, а именно у самцов мышей, которые получали корм, и у самок мышей, которые либо получали корм, либо содержались в условиях голодания, наблюдались пониженные уровни триглицеридов. Koster A. et al., (2005) *Endocrinol.* 146:4943-4950. Было также обнаружено, что у этих мышей, а именно у самцов и у самок мышей, которые получали корм и содержались в условиях голодания, наблюдаются пониженные уровни холестерина. Koster A. et al., (2005) *Endocrinol.* 146:4943-4950. Было обнаружено, что у мышей, страдающих диабетом, индуцированным стрептозотоцином, а именно у *db/db*-мышей и у *ob/ob*-мышей, наблюдается повышенный уровень экспрессии *Angptl3*. Inukai K. et al., (2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 317(4): 1075-1079; Shimamura, M. et al. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 322 (3): 1080-1085.

Описание сущности изобретения

В некоторых своих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, которое связывается с ANGPTL3 и нейтрализует по меньшей мере одну активность ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления моноклональным антителом является мышинное моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональным антителом является гуманизированное моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления указанным моноклональным антителом является человеческое моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления указанное моноклональное антитело снижает уровень по меньшей мере одного липида в сыворотке *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления указанное моноклональное антитело связывается с эпитопом ANGPTL3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело связывается с эпитопом ANGPTL3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело связывается с эпитопом ANGPTL3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления указанное моноклональное антитело связывается с эпитопом ANGPTL3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело включает переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело включает переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело включает переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело включает переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело включает переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66,

торых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 41, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 42, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 43; а легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 50, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 51, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 53, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 54, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 55; а легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 56, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 57, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 71, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 72, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 73; а легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 77, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 78, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 74, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 75, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 76; а легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 80, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 81, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с ANGPTL3 и содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь включает: а) аминокислотную последовательность, представленную в любой одной из SEQ ID NO: 27-34 и 67-70; б) по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, 45 и 46; в) по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, 48 и 49; д) по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, 51 или 52; е) по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, 57 и 58; ф) по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77, 78 и 79; или г) по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80, 81 и 82; где указанное антитело нейтрализует по меньшей мере одну активность ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 44, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 45, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 47, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 48, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 50, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 51, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 56, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 57, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 77, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 78, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела включает CDR1, представленную в SEQ ID NO: 80, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 81, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, которое связывается с ANGPTL3 и нейтрализует по меньшей мере одну активность ANGPTL3, где аффинность указанного антитела по отношению к пептиду, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, по меньшей мере в 3 раза превышает аффинность антитела по отношению к пептиду, имеющему аминокислотную последовательность любой одной из SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 и SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления аффинность указанного антитела по отношению к пептиду, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, по меньшей мере в 3 раза превышает аффинность антитела по отношению к каждой из последовательностей SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, которое связывается с ANGPTL3 и нейтрализует по меньшей мере одну активность ANGPTL3, где указанное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 с K_D менее 50 нМ. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 с K_D менее 30 нМ. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 с K_D менее 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 с K_D менее 5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, описанное выше. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения расстройства, ассоциирующегося с нарушением метаболизма липидов, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу снижения уровня одного или нескольких липидов в сыворотке, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения гипертриглицеридемии, где указанный способ

включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения гиперхолестеринемии, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения ожирения, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения диабета, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения ишемической болезни сердца, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу лечения синдрома нарушения метаболизма, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показаны уровни триглицеридов в сыворотке у мышей, которые получали корм, и у мышей, содержащихся в условиях голодания, через 4 дня после инъекции этим мышам антител 1.315.1, 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1 и контрольного анти-KLH антитела, как описано в примере J.

На фиг. 2 показаны уровни холестерина в сыворотке у мышей, которые получали корм, и у мышей, содержащихся в условиях голодания, через 4 дня после инъекции этим мышам антител 1.315.1, 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1 и контрольного анти-KLH антитела, как описано в примере J.

На фиг. 3 показаны уровни триглицеридов в сыворотке у мышей, которые получали корм, и у мышей, содержащихся в условиях голодания, через 4 дня после инъекции этим мышам анти-ANGPTL3 антитела 4.8.3, анти-ANGPTL4 антитела 14D12 и контрольного анти-KLH антитела, как описано в примере J.

На фиг. 4 показаны уровни холестерина в сыворотке у мышей, которые получали корм, и у мышей, содержащихся в условиях голодания, через 4 дня после инъекции этим мышам анти-ANGPTL3 антитела 4.8.3, анти-ANGPTL4 антитела 14D12 и контрольного анти-KLH антитела, как описано в примере J.

На фиг. 5 показаны уровни триглицеридов в сыворотке у мышей, которые получали корм, и у мышей, содержащихся в условиях голодания, через 4 дня после инъекции этим мышам анти-ANGPTL3 антител 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, анти-ANGPTL4 антитела 14D12 и контрольного анти-KLH антитела, как описано в примере J.

На фиг. 6 показаны уровни холестерина в сыворотке у мышей, которые получали корм, и у мышей, содержащихся в условиях голодания, через 4 дня после инъекции этим мышам анти-ANGPTL3 антител 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, анти-ANGPTL4 антитела 14D12 и контрольного анти-KLH антитела, как описано в примере J.

На фиг. 7 показаны уровни триглицеридов в сыворотке у мышей через 4 дня (верхняя панель) и через 8 дней (нижняя панель) после инъекции этим мышам антител 1.125.1, 1.132.1, 1.173.2, 1.315.1, 1.424.1, 1.431.1 и контрольного анти-KLH антитела, как описано в примере J.

На фиг. 8 показаны уровни триглицеридов в сыворотке у мышей после инъекции различных доз вируса Ad5-hAngptl3T или 2×10^9 вирусных бляшек контрольного вируса, как описано в примере B.

На фиг. 9 показано связывание антител 4.1.1, 4.4.1, 4.6.3, 4.7.1, 4.8.1, 4.8.2, 4.8.3 и 4.9.1 с ANGPTL3SP1, ANGPTL3T и контрольным белком BTS324, как описано в примере H.

На фиг. 10 показано сопоставление путем выравнивания последовательностей переменных областей тяжелой цепи антител 4.7.1 (SEQ ID NO: 19), 4.8.3 (SEQ ID NO: 21) и 4.9.1 (SEQ ID NO: 23). Кроме того, показана консенсусная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 25), а также области последовательностей тяжелой цепи, соответствующих сигнальному пептиду (SP), каркасной области 1 (FWR1), гипервариабельной области (комплементарность-определяющей) области 1 (CDR1), каркасной области 2 (FWR2), гипервариабельной области 2 (CDR2), каркасной области 3 (FWR3), гипервариабельной области 3 (CDR3) и каркасной области 4 (FWR4).

На фиг. 11 показано сопоставление путем выравнивания переменных областей легкой цепи антител 4.7.1 (SEQ ID NO: 27), 4.8.3 (SEQ ID NO: 29) и 4.9.1 (SEQ ID NO: 31). Кроме того, представлена консенсусная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 33), а также области последовательностей легкой цепи, соответствующих сигнальному пептиду (SP), каркасной области 1 (FWR1), гипервариабельной области 1 (CDR1), каркасной области 2 (FWR2), гипервариабельной области 2 (CDR2), каркасной области 3 (FWR3), гипервариабельной области 3 (CDR3) и каркасной области 4 (FWR4).

На фиг. 12 показана ЛПЛ-активность *in vitro* после обработки мышей моноклональными анти-ANGPTL3 антителами 4.9.1, 4.8.3, 1.315.1, 4.7.1 и 1.173.2, как описано в примере L.

На фиг. 13 проиллюстрирована *in vivo* фармакокинетика некоторых мышинных моноклональных анти-ANGPTL3 антител, как описано в примере N.

На фиг. 14 проиллюстрировано связывание антител 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 5.35 и 5.50 с аланин-сканирующими мутантами пептида SP1, как описано в примере H.

На фиг. 15 показаны уровни триглицеридов в сыворотке у мышей через 4 дня (верхняя панель) и 7 дней (нижняя панель) после инъекции антител 5.35 или 5.50, как описано в примере J.

На фиг. 16 показаны уровни холестерина в сыворотке у мышей через 4 дня (верхняя панель) и 7 дней (нижняя панель) после инъекции антител 5.35 или 5.50, как описано в примере J.

На фиг. 17 проиллюстрирована *in vivo* фармакокинетика антител 5.35 и 5.50, как описано в примере N.

На фиг. 18 проиллюстрирована *in vivo* фармакокинетика антител 4.7.1, 4.9.1, 5.35 и 5.50, как описано в примере N.

На фиг. 19 проиллюстрировано снижение уровней триглицеридов и холестерина в сыворотке у AroE-мышей, которым инъецировали антитела 5.35 и 5.50 и контрольное анти-KLN антитело.

Подробное описание различных вариантов изобретения

В данной заявке при употреблении какого-либо существительного в единственном числе также подразумевается, что оно может иметь значение существительного во множественном числе, если это не оговорено особо. В данной заявке употребление единственного числа означает "по меньшей мере один", если это не оговорено особо. В настоящей заявке союз "или" означает "и/или", если это не оговорено особо. Кроме того, термин "включающий", а также другие формы, такие как "включает" и "включенный", имеют неограничивающее значение. Кроме того, такие термины как "элемент" или "компонент" охватывают элементы или компоненты, включающие одну единицу, и элементы или компоненты, включающие более чем одну единицу, если это не оговорено особо.

Заголовки приведенных здесь разделов приводятся лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение описанной здесь сущности изобретения. Все документы или части документов, цитируемых в данной заявке, включая, но не ограничиваясь ими, патенты, патентные заявки, статьи, справочную литературу и монографии, точно и во всей своей полноте вводятся в описание настоящей заявки посредством ссылки и могут быть использованы в любых целях. В том случае, если в одной или в нескольких включенных в описание данной заявки ссылках на литературу и аналогичные материалы приводится определение термина, которое противоречит определению термина в данной заявке, то такие противоречия могут быть урегулированы в соответствии с описанием настоящей заявки.

A. Некоторые определения

Используемые здесь термины "полипептид", "пептид" и "белок" являются взаимозаменяемыми и означают полимер из аминокислотных остатков. Эти термины также означают аминокислотные полимеры, содержащие природные аминокислоты, а также аминокислотные полимеры, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический аналог соответствующей природной аминокислоты. Аминокислотные полимеры могут иметь любую длину.

Используемый здесь термин "антитело" означает интактное антитело или фрагмент антитела, которые конкурируют с интактным антителом за связывание с антигеном. Фрагментами антител являются, но не ограничиваются ими, Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fv-, scFv- и Fd-фрагменты, димерные антитела и другие фрагменты антител, которые сохраняют по меньшей мере часть варибельной области интактного антитела (см., например, Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134). В некоторых вариантах осуществления фрагменты антител получают путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. В некоторых вариантах осуществления фрагменты антител получают с применением техники рекомбинантных ДНК.

Термин "нативный полипептид" означает природный полипептид. Термин "нативное антитело" означает природное антитело.

Термин "моноклональное антитело" означает антитело, происходящее, в основном, из гомогенной популяции антител, которые специфически связываются с одним и тем же эпитопом. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело секретируется гибридомой. В некоторых таких вариантах гибридоме получают с применением некоторых методов, известных специалистам (см., например, Kohler & Milstein (1975) *Nature* 256:495-499). В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело получают методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). В некоторых вариантах осуществления термин "моноклональное антитело" означает фрагмент антитела, выделенный из библиотеки фагового представления (см., например, Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628, и Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597). Описание способов получения различных других моноклональных антител (см., например, руководство Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)).

Термин "химерное антитело" означает антитело, состоящее из компонентов, происходящих по меньшей мере от двух различных источников. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело включает часть антитела, происходящего от первой молекулы, присоединенной ко второй молекуле, например, часть антитела, происходящего от второй молекулы. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело включает часть антитела, происходящего от не человеческого антитела, присоединенного к части антитела, происходящего от человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело включает всю варибельную область или часть варибельной области антитела, происходящего от животного, не являющегося человеком, и присоединенного к константной области антитела, происходящего от человека.

Термин "гуманизированное антитело" означает не человеческое антитело, которое было модифицировано так, чтобы оно имело более близкое сходство (в аминокислотной последовательности) с челове-

ческим антителом. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой тип химерного антитела. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки, находящиеся за пределами антигенсвязывающих остатков вариабельной области не человеческого антитела, являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело конструируют путем замены всей гипервариабельной области (CDR) человеческого антитела или ее части на всю CDR другого антитела или ее часть, такого как не человеческого антитело, обладающее нужной специфичностью связывания с антигеном. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело включает вариабельные области, в которых все или в основном все CDR соответствуют CDR не человеческого антитела, и все или в основном все каркасные области (FR) соответствуют FR человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело также включает константную область (Fc) человеческого антитела.

Термин "человеческое антитело" означает моноклональное антитело, которое содержит последовательности человеческого антитела и не содержит последовательностей антитела, происходящего от животного, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления человеческого антитела может содержать синтетические последовательности, не обнаруженные в нативных антителах. Этот термин не ограничивается каким-либо конкретным методом получения антител. Так, например, в различных вариантах осуществления человеческого антитела может быть получено методом с применением трансгенных мышей, методом фагового представления, с использованием человеческих В-лимфоцитов или рекомбинантными методами.

Термин "нейтрализующее антитело" или "антитело, которое нейтрализует" означает антитело, снижающее по меньшей мере одну активность полипептида, содержащего эпитоп, с которым специфически связывается данное антитело. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело снижает активность *in vitro* и/или *in vivo*.

Термин "антигенсвязывающий сайт" означает часть антитела, способную специфически связываться с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт доставляется одной или несколькими вариабельными областями антитела.

Термин "эпитоп" означает любую полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или с Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах осуществления эпитоп представляет собой область антигена, которая специфически связывается с антителом. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может включать химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорильные или сульфонильные группы. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может обладать специфическими трехмерными структурными свойствами (например, "конформационный" эпитоп) и/или иметь конкретный заряд.

Указание на то, что данный эпитоп является "таким же", как и другой эпитоп, означает, что конкретное антитело специфически связывается с обоими эпитопами. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, имеющие различные первичные аминокислотные последовательности, могут содержать эпитопы, которые являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления эпитопы, которые являются одинаковыми, могут иметь различные первичные аминокислотные последовательности. Считается, что различные антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если они конкурируют за специфическое связывание с этим эпитопом.

Антитело "специфически связывается" с антигеном, если оно преимущественно распознает антиген в сложной смеси белков и/или макромолекул. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с конкретным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело обладает способностью связываться с различными антигенами, при условии, что такие различные антигены содержат этот конкретный эпитоп. В некоторых случаях, например, гомологичные белки от различных видов могут содержать один и тот же эпитоп. В некоторых вариантах осуществления считается, что антитело специфически связывается с антигеном, если константа диссоциации (K_D) составляет ≤ 1 мкМ, в некоторых вариантах осуществления - если константа диссоциации составляет < 100 нМ, а в некоторых вариантах осуществления - если константа диссоциации составляет ≤ 10 нМ.

Термин "ANGPTL3» означает ангиопоэтин-подобный белок 3, имеющий аминокислотную последовательность, происходящую от любого позвоночного или млекопитающего, включая, но не ограничиваясь ими, человека, коров, кур, грызунов, мышей, крыс, свиней, овец, приматов, обезьян и морских свинок, если это не оговорено особо. Этот термин также означает фрагменты и варианты нативного ANGPTL3, которые сохраняют по меньшей мере одну *in vivo* или *in vitro* активность нативного ANGPTL3. Этот термин охватывает полноразмерные непротессированные формы предшественника ANGPTL3, а также зрелые формы, образующиеся в результате посттрансляционного отщепления сигнального пептида, и формы, образующиеся в результате протеолитического процессинга фибриногенового домена. В некоторых вариантах осуществления полноразмерный непротессированный мышинный ANGPTL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 (Genbank reg. № NP_038941). В некоторых вариантах осуществления полноразмерный непротессированный человеческий

ANGPTL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 (Genbank рег. № NP_055310).

Термин "Angptl3" означает нуклеиновую кислоту, кодирующую ANGPTL3.

Термин "ЛПЛ" означает липопротеин-липазу, имеющую аминокислотную последовательность, происходящую от любого позвоночного или млекопитающего, включая, но не ограничиваясь ими, человека, коров, кур, грызунов, мышей, крыс, свиней, овец, приматов, обезьян и морских свинок. В некоторых вариантах осуществления липопротеин-липаза катализирует гидролиз триацилглицерина в хиломикронах и липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП) с образованием диацилглицерина и аниона свободной жирной кислоты. В некоторых вариантах осуществления липопротеин-липаза также обладает способностью гидролизовать диацилглицерин.

Термин "агент" означает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу или экстракт, полученный из биологических материалов.

Термин "антагонист ANGPTL3" означает агент, снижающий активность ANGPTL3.

Термин "агонист ANGPTL3" означает агент, повышающий активность ANGPTL3.

Термин "пациент" включает человека и животных. В некоторых вариантах осуществления пациентом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек.

Термин "фрагмент" эталонного полипептида означает непрерывную последовательность аминокислот любой части эталонного полипептида. Фрагмент может иметь любую длину, но меньшую чем длина эталонного полипептида.

Термин "вариант" эталонного полипептида означает полипептид, имеющий одну или несколько аминокислотных замен, делеций или инсерций по сравнению с эталонным полипептидом.

Термин "консервативная" аминокислотная замена означает замену аминокислот полипептида другой аминокислотой, имеющей аналогичные свойства, такие как размер или заряд. В некоторых вариантах осуществления полипептид, содержащий консервативную аминокислотную замену, сохраняет по меньшей мере одну активность полипептида, не содержащего таких замен. Консервативная аминокислотная замена может включать неприродные аминокислотные остатки, которые обычно вводятся в результате химического пептидного синтеза, а не синтеза в биологических системах. Результатами таких замен являются, но не ограничиваются ими, пептидомиметики и другие реверсивные или инвертированные формы аминокислотных молекул.

Природные остатки могут быть подразделены на классы на основе общих свойств боковых цепей:

- 1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) кислотные: Asp, Glu;
- 4) основные: His, Lys, Arg;
- 5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- 6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Так, например, неконсервативные замены могут включать замену аминокислоты одного из этих классов на аминокислоту другого класса. Такие замененные остатки могут быть введены в области человеческого антитела, гомологичные областям не человеческого антител, или в не гомологичные области молекулы.

В соответствии с некоторыми вариантами изобретения такие замены могут быть введены с учетом гидропатического индекса аминокислот. Каждая аминокислота имеет свой гидропатический индекс, что обусловлено их гидрофобностью и зарядом. Такими индексами являются изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспарат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

Специалистам известно, что в некоторых случаях, гидропатический индекс аминокислот играет важную роль в сообщении белку интерактивной биологической функции. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Известно, что в некоторых случаях некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами, имеющими аналогичный гидропатический индекс или аналогичное гидропатическое число, и при этом, их биологическая активность сохраняется. В некоторых вариантах осуществления при введении модификаций с учетом гидропатического индекса могут быть сделаны замены аминокислот с гидропатическим индексом в пределах ± 2 . В некоторых вариантах осуществления этот гидропатический индекс находится в пределах ± 1 , а в некоторых вариантах осуществления $\pm 0,5$.

Также очевидно, что замена аминокислот на подобные аминокислоты может быть эффективно осуществлена с учетом гидрофильности, а в частности, если биологически функциональный белок или полипептид предназначен для его применения в иммунологии, например, в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления самая высокая локальная усредненная гидрофильность белка, регулируемая гидрофильностью смежных аминокислот такого белка, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, то есть с биологическими свойствами белка.

Такие аминокислотные остатки могут приобретать нижеследующие величины гидрофильности: ар-

гинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0±1); глутамат (+3,0±1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5±1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4).

В некоторых вариантах осуществления при осуществлении модификаций на основе аналогичных величин гидрофильности могут быть введены замены аминокислот с величинами гидрофильности в пределах ± 2 , в некоторых вариантах осуществления в пределах ± 1 , а в некоторых вариантах осуществления в пределах $\pm 0,5$. На основе гидрофильности можно также идентифицировать эпитопы от первичных аминокислотных последовательностей. Эти области также называются "эпитопными коровыми областями".

Репрезентативные аминокислотные замены представлены в табл. 1.

Таблица 1. Аминокислотные замены

Исходный остаток	Репрезентативные замены
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин
Leu	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, 1,4-диаминомасляная кислота, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин

Специалист в данной области может самостоятельно определить подходящие варианты описанных здесь полипептидов с применением хорошо известных методов. В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области может самостоятельно идентифицировать подходящие области молекулы, которые могут быть заменены без нарушения активности путем доставки областей, которые, как очевидно, не играют важной роли в сообщении такой активности. В некоторых вариантах осуществления можно идентифицировать остатки и части молекул, которые являются консервативными среди аналогичных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления даже в те области, которые могут играть важную роль в сообщении биологической активности или образовании структуры, могут быть введены консервативные аминокислотные замены, не нарушающие биологической активности или не оказывающие негативного влияния на полипептидную структуру.

Кроме того, в соответствии с некоторыми осуществлениями изобретения могут быть проведены исследования структуры-функции, позволяющие идентифицировать остатки в аналогичных полипептидах, которые играют важную роль в сообщении активности или образовании структуры. В некоторых вариантах осуществления, исходя из такого сравнения, могут быть предсказаны аминокислотные остатки в белке, которые соответствуют аминокислотным остаткам, играющим важную роль в сообщении активности аналогичным белкам или образовании структуры этих белков. В соответствии с некоторыми осуществлениями изобретения специалист в данной области может выбрать химически аналогичные аминокислотные замены для каждого предсказанного и играющего важную роль аминокислотного остатка.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения специалист в данной области может также проанализировать трехмерную структуру и аминокислотную последовательность в аналогичных полипептидах. В некоторых вариантах осуществления, исходя из такой информации, специалист в данной области может предсказать трехмерную структуру аминокислотных остатков антитела путем выравнивания аминокислотных остатков антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения специалист в данной области не может внести радикальные модификации в предска-

занные аминокислотные остатки на поверхности белка, поскольку такие остатки могут участвовать в играющих важную роль взаимодействиях с другими молекулами. Кроме того, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, специалист в данной области может получить тестируемые варианты, содержащие одну аминокислотную замену в каждом нужном аминокислотном остатке. В некоторых вариантах осуществления указанные варианты могут быть затем скринированы с помощью известных анализов на активность. В некоторых вариантах осуществления, указанные варианты могут быть использованы для сбора информации о подходящих вариантах. Так, например, в некоторых вариантах осуществления, в том случае, если обнаруживается, что модификация конкретного аминокислотного остатка приводит к нарушению активности, к нежелательному снижению или к какому-либо другому нежелательному изменению активности, то варианты с такими модификациями являются нежелательными. Другими словами, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, исходя из информации, полученной при проведении таких рутинных экспериментов, специалист в данной области может легко определить, в какие именно положения аминокислот не следует вводить дополнительные замены как отдельно, так и в их комбинациях с другими мутациями.

Ряд научных публикаций посвящен предсказаниям вторичной структуры. См., например, Moulton J., *Curr. Opin. Biotechnol.* (1996) 7(4): 422-427; Chou et al., (1974) *Biochemistry*. 13(2): 222-245; Chou et al. (1974) *Biochemistry* 113 (2): 211-222; Chou et al. (1978) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou et al. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; и Chou et al. (1979) *Biophys. J.* 26: 367-384. Кроме того, в настоящее время имеются компьютерные программы, облегчающие предсказание вторичной структуры. Один из методов предсказания вторичной структуры основан на моделировании гомологии. Так, например, два полипептида или белка, которые имеют идентичность последовательностей более чем на 30% или сходство более чем на 40%, часто имеют сходные структурные топологии. Все большее пополнение базы данных структур белка (PDB) значительно облегчает предсказание вторичной структуры, включая предсказание потенциального числа складок в структуре полипептида. См., например, Holm et al. (1999) *Nucl. Acid. Res.* 27 (1): 244-247. Было высказано предположение (Brenner et al., (1997) *Curr. Op. Struct. Biol.* 7 (3): 369-376), что в данном полипептиде или белке существует ограниченное число складок, и что после разрешения значительного числа структур, предсказание структуры может быть гораздо более точным.

Дополнительными методами предсказания вторичной структуры являются "поточная обработка сообщений" (см., например, Jones, D. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7(3):377-387; Sippl et al. (1996) *Structure* 4(1):15-19), "анализ профилей" (см., например, Bowie et al., (1991) *Science* 253:164-170; Gribskov et al., (1990) *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov et al. (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84 (13):4355-4358) и поиск "эволюционной взаимосвязи" (см., например, Holm et al. (1999) *Nucl. Acid. Res.* 27 (1) :244-247; и Brenner et al. (1997) *Curr. Op. Struct. Biol.* 7(3): 369-376 (1997)).

В некоторых осуществлениях изобретения вариант эталонного антитела включает вариант гликозилирования, в котором число и/или тип сайтов гликозилирования были изменены по сравнению с сайтами гликозилирования аминокислотной последовательности эталонного антитела. В некоторых осуществлениях изобретения вариант полипептида содержит большее или меньшее число сайтов N-связанного гликозилирования по сравнению с нативным полипептидом. Сайт N-связанного гликозилирования отличается тем, что он имеет следующую последовательность: Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где аминокислотный остаток, определенный как X, может представлять собой любой аминокислотный остаток за исключением пролина. Замена аминокислотных остатков с получением такой последовательности приводит к созданию потенциально нового сайта для присоединения цепи N-связанного углевода. Альтернативно замены, которые приводят к элиминации этой последовательности, позволяют удалять существующую цепь N-связанного углевода. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к перегруппировке цепей N-связанного углевода, где один или несколько сайтов N-связанного гликозилирования (обычно сайтов, которые являются природными) элиминируются, а вместо них образуются один или несколько новых N-связанных сайтов. Репрезентативными вариантами антител являются цистеиновые варианты, где по сравнению с аминокислотной последовательностью эталонного антитела один или несколько цистеиновых остатков делетированы или заменены другой аминокислотой (например, серином). В некоторых вариантах осуществления цистеиновые варианты могут быть использованы в том случае, если антитела должны быть подвергнуты рефолдингу с образованием биологически активной конформации, например, после выделения нерастворимых телец включения. В некоторых вариантах осуществления цистеиновые варианты имеют меньшее число цистеиновых остатков, чем нативный полипептид. В некоторых вариантах осуществления цистеиновые варианты имеют четное число цистеиновых остатков, что позволяет минимизировать взаимодействия, вызываемые неспаренными цистеинами.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения аминокислотными заменами являются замены, которые (1) приводят к снижению чувствительности к протеолизу, (2) приводят к снижению чувствительности к окислению, (3) приводят к изменению аффинности связывания с образованным белковыми комплексами, (4) приводят к изменению аффинности связывания и/или (4) сообщают таким полипептидам другие физико-химические или функциональные свойства либо приводят к изменению этих свойств. В соответствии с некоторыми вариантами изобретения в природную последовательность (в

некоторых вариантах осуществления в часть полипептида, находящегося за пределами домена(ов), образующего(их) межмолекулярные контакты) могут быть внесены одна или множество аминокислотных замен (в некоторых вариантах осуществления консервативных аминокислотных замен). В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена обычно не оказывает какого-либо значительного влияния на структурные свойства исходной последовательности (например, в некоторых вариантах осуществления замена аминокислоты не должна разрушать спираль, которая присутствует в исходной последовательности, либо она не должна нарушать вторичную структуру других типов, которая характеризует данную исходную последовательность). Примеры некоторых известных вторичных и третичных структур полипептидов описаны, например, в публикациях *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton J. M. et al. (1991) *Nature* 354:105-106.

Термин "процент идентичности" или "% идентичности", если он употребляется по отношению к последовательностям нуклеиновой кислоты, означает процент идентичных нуклеотидов по меньшей мере между двумя полинуклеотидными последовательностями, которые были подвергнуты выравниванию с помощью поисковой программы выравнивания локальных оснований BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). См. Tatusova et al. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250. Программа BLAST (версия 2.2.10) имеется в общедоступной базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI), Bethesda, MD. Для выравнивания двух полинуклеотидных последовательностей используется пакет инструментальных программ "Blast 2 Sequences", в который входит программа "blastn" с установленными параметрами по умолчанию, такими как:

Матрица: не используется
 «Цена» за соответствие: 1
 Штраф за несоответствие: -2
 Штраф за пробел-пропуск: 5
 Штраф за пробел-удлинение: 2
 Выпадение знака Gap_x: 50
 Ожидание: 10,0
 Размер «слова»: 11
 Фильтр: имеется

Термин "процент идентичности" или "% идентичности", если он употребляется по отношению к последовательностям нуклеиновой кислоты, означает процент идентичных аминокислот по меньшей мере между двумя полипептидными последовательностями, которые были подвергнуты выравниванию с помощью поисковой программы выравнивания локальных оснований BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). См. Tatusova et al. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250. Программа BLAST (версия 2.2.10) имеется в общедоступной базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI), Bethesda, MD. Для выравнивания двух полипептидных последовательностей используется пакет инструментальных программ "Blast 2 Sequences", в который входит программа "blastp" с установленными параметрами по умолчанию, такими как:

Матрица: BLOSUM62
 Штраф за пробел-пропуск: 11
 Штраф за пробел-удлинение: 1
 Выпадение знака Gap_x: 50
 Ожидание: 10,0
 Размер «слова»: 3
 Фильтр: имеется

Термин "эффективная доза" или "эффективное количество" означает количество агента, например, нейтрализующего антитело, которое ослабляет симптомы у пациента или дает нужный биологический эффект. В некоторых вариантах осуществления эффективная доза или эффективное количество являются достаточными для снижения по меньшей мере одной активности ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу или эффективное количество определяют, как описано ниже, в части V.G.

Термин "лечение" охватывает терапевтические и профилактические/превентивные меры, если это не оговорено особо. Индивидуумами, нуждающимися в лечении, являются, но не ограничиваются ими, индивидуумы, уже страдающие конкретным состоянием или расстройством, а также индивидуумы, которые подвержены риску развития у них конкретного состояния или расстройства (например, индивидуумы, нуждающиеся в профилактическом/превентивном лечении). Термин "лечение" означает введение пациенту агента в терапевтических и/или профилактических/превентивных целях.

Термин "терапевтическое средство" означает средство, которое может быть введено *in vivo* для достижения терапевтического и/или профилактического/превентивного эффекта.

Термин "терапевтическое антитело" означает антитело, которое может быть введено *in vivo* для достижения терапевтического и/или профилактического/превентивного эффекта.

Термины "выделенная нуклеиновая кислота" и "выделенный полинуклеотид" являются взаимозаменяемыми. Репрезентативными выделенными полинуклеотидами являются, но не ограничиваются ими, геномная ДНК, РНК, кДНК, синтетическая ДНК или РНК или некоторые их комбинации. "Выделенный полинуклеотид" (1) не ассоциируется со всеми полинуклеотидами или с их частью, в которой "выделенный полинуклеотид" встречается в природе, (2) связан с полинуклеотидом, с которым он не ассоциируется в природе, или (3) не присутствует в природе как часть более крупной последовательности.

В. Структура нативных антител и некоторых фрагментов антител

Нативное антитело обычно имеет тетрамерную структуру. Тетрамер обычно включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну легкую цепь (в некоторых вариантах осуществления примерно 25 кДа) и одну тяжелую цепь (в некоторых вариантах осуществления примерно 50-70 кДа). В нативном антителе тяжелая цепь содержит переменную область, V_H , и три константных области, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Домен V_H находится у аминоконца тяжелой цепи, а домен C_{H3} находится у карбоксиконца. В нативном антителе легкая цепь содержит переменную область V_L и константную область C_L . Переменная область легкой цепи находится у аминоконца легкой цепи. В нативном антителе переменные области каждой пары легкая/тяжелая цепь обычно образуют антигенсвязывающий сайт. Константные области обычно ответственны за эффекторную функцию.

Нативные человеческие легкие цепи обычно классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда. Нативные человеческие тяжелые цепи обычно классифицируются как цепи мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон и определяют изотип антитела, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. IgG имеет подклассы, включая, но не ограничиваясь ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая, но не ограничиваясь ими, IgM1 и IgM2. IgA имеет подклассы, включая, но не ограничиваясь ими, IgA1 и IgA2. В нативных человеческих легких и тяжелых цепях, переменные и константные области обычно связаны с областью "J", состоящей примерно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область "D", состоящую примерно из 10 или более аминокислот. См., например, *Fundamental Immunology* (1989) Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y.).

В нативном антителе переменные области обычно имеют одинаковую общую структуру, в которой относительно консервативные каркасные области (FR) связаны друг с другом тремя гиперпеременными областями, также называемыми комплементарность-определяющими областями (CDR). CDR, происходящие от двух цепей каждой пары, обычно расположены на одной цепи с каркасными областями, что позволяет им связываться с конкретным эпитопом. Переменные области легкой и тяжелой цепи, от N-конца до C-конца, обычно содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR на тяжелой цепи обозначаются H1, H2 и H3, а CDR на легкой цепи обозначаются L1, L2 и L3. Обычно CDR3 представляет собой наибольший источник молекулярной переменности в антигенсвязывающем сайте. В некоторых случаях, например, в случае H3, эта область может состоять по меньшей мере из двух аминокислотных остатков или более чем из 26 остатков. Присвоение аминокислот каждому домену обычно осуществляют в соответствии с определениями по Kabat и др. (Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Publication № 91-3242, vol. 1-3, Bethesda, MD); по Чотия (Chothia C. & Lesk A.M. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; или Chothia C. et al. *Nature* 342:878-883 (1989)). В настоящей заявке термин "CDR" означает CDR, происходящую от легкой цепи или тяжелой цепи, если это не оговорено особо.

"Fab"-фрагмент включает одну легкую цепь и C_{H1} и переменную область 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 включает дополнительную константную область, простирающуюся между доменами C_{H1} и C_{H2} . Межцепочечная дисульфидная связь может образовываться между двумя тяжелыми цепями Fab'-фрагмента с образованием молекулы $F(ab')_2$.

"Fv"-фрагмент содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, но не содержит константных областей. Одноцепочечный Fv (scFv)-фрагмент содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, соединенные друг с другом гибким линкером с образованием одной полипептидной цепи, содержащей антигенсвязывающую область. Примеры одноцепочечных антител подробно обсуждаются в WO 88/01649 и в патентах США №№ 4946778 и 5260203. В некоторых случаях одна переменная область (то есть переменная область тяжелой цепи или переменная область легкой цепи) может обладать способностью распознавать антиген и связываться с этим антигеном.

Используемый здесь термин "тяжелая цепь" означает полипептид, содержащий последовательность переменной области тяжелой цепи, взятую отдельно или в комбинации с легкой цепью и достаточную для сообщения этому полипептиду специфичности к данному антигену.

Используемый здесь термин "легкая цепь" означает полипептид, содержащий последовательность переменной области легкой цепи, взятую отдельно или в комбинации с тяжелой цепью и достаточную

для сообщения этому полипептиду специфичности к данному антигену.

С. Некоторые антитела

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с ANGPTL3. В некоторых таких вариантах моноклональными антителами являются нейтрализующие моноклональные антитела, снижающие по меньшей мере одну активность ANGPTL3 *in vivo* и/или *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение уровня по меньшей мере одного липида в сыворотке *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение уровня триглицеридов в сыворотке *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело вызывает снижение уровней общего холестерина *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение уровней свободных жирных кислот (FFA) *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение по меньшей мере двух из этих уровней *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 снижает по меньшей мере трех из этих уровней *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение уровней триглицеридов в сыворотке LDLr-дефицитных мышей *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение уровней общего холестерина у LDLr-дефицитных мышей *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение уровней триглицеридов в сыворотке ApoE-дефицитных мышей *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение уровней общего холестерина у ApoE-дефицитных мышей *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение уровней триглицеридов в сыворотке у db/db-мышей *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 вызывает снижение уровней уровня общего холестерина у db/db-мышей *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые специфически связываются с мышинным ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые специфически связываются с человеческим ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые специфически связываются с тем же самым эпитопом в ANGPTL3 от других видов (то есть к антителам, которые обнаруживают перекрестную реактивность). В некоторых вариантах осуществления антитела специфически связываются с мышинным ANGPTL3 и человеческим ANGPTL3.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые специфически связываются с эпитопом в N-концевом суперспирализованном домене ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые специфически связываются с эпитопом в N-концевом суперспирализованном домене мышинового ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области мышинового ANGPTL3, расположенной от остатка 17 до остатка 240 SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 59). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с областью SP1 мышинового ANGPTL3, расположенной от остатка 32 до остатка 57 SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3, которая включает аминокислоты 34-37 и 40 SEQ ID NO: 1 (аминокислоты 3-6 и 9 SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3, которая включает аминокислоты 33-37 и 40 SEQ ID NO: 1 (аминокислоты 2-6 и 9 SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3, которая включает аминокислоты 34-37, 40 и 42 SEQ ID NO: 1 (аминокислоты 3-6, 9 и 11 SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3, которая включает аминокислоты 34-37 и 40-42 SEQ ID NO: 1 (аминокислоты 3-6 и 9-11 SEQ ID NO: 9).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые специфически связываются с эпитопом в N-концевом суперспирализованном домене человеческого ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области человеческого ANGPTL3, расположенной от остатка 20 до остатка 143 SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с областью SP1 челове-

ческого ANGPTL3, расположенной от остатка 32 до остатка 57 SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3, которая включает аминокислоты 34-37 и 40 SEQ ID NO: 3 (аминокислоты 3-6 и 9 SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3, которая включает аминокислоты 33-37 и 40 SEQ ID NO: 3 (аминокислоты 2-6 и 9 SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3, которая включает аминокислоты 34-37, 40 и 42 SEQ ID NO: 3 (аминокислоты 3-6, 9 и 11 SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующие моноклональные антитела специфически связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3, которая включает аминокислоты 34-37 и 40-42 SEQ ID NO: 3 (аминокислоты 3-6 и 9-11 SEQ ID NO: 10).

В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, с аффинностью, которая по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 7 раз или по меньшей мере в 10 раз превышает аффинность связывания нейтрализующего моноклонального антитела с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность любой одной из SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 и SEQ ID NO: 92. В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, с аффинностью, которая по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 7 раз или по меньшей мере в 10 раз превышает аффинность связывания нейтрализующего моноклонального антитела с каждой из последовательностей SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 и SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления аффинность определяют, как описано в примере H(2).

В некоторых вариантах осуществления нейтрализующими моноклональными антителами являются не человеческие моноклональные антитела. В некоторых таких вариантах осуществления нейтрализующими моноклональными антителами являются моноклональные антитела грызунов. В некоторых таких вариантах осуществления нейтрализующими моноклональными антителами являются мышинные моноклональные антитела. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующими моноклональными антителами являются химерные моноклональные антитела. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующими моноклональными антителами являются гуманизированные моноклональные антитела. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующими моноклональными антителами являются человеческие моноклональные антитела. В некоторых вариантах осуществления химерные, гуманизированные и/или человеческие моноклональные антитела могут быть использованы в качестве терапевтических антител для лечения человека.

В некоторых вариантах осуществления нейтрализующими моноклональными антителами являются фрагменты антител. Репрезентативными фрагментами антител являются, но не ограничиваются ими, Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fv-, scFv- и Fd-фрагменты, димерные антитела и другие фрагменты антител.

В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело связывается с человеческим ANGPTL3 с K_D менее 1 мкМ, менее 500 нМ, менее 300 нМ, менее 200 нМ, менее 100 нМ, менее 75 нМ, менее 50 нМ, менее 30 нМ, менее 25 нМ, менее 20 нМ, менее 15 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ или менее 2 нМ. В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело связывается с человеческим пептидом SP1 с K_D менее 1 мкМ, менее 500 нМ, менее 300 нМ, менее 200 нМ, менее 100 нМ, менее 75 нМ, менее 50 нМ, менее 30 нМ, менее 25 нМ, менее 20 нМ, менее 15 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ или менее 2 нМ. В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, с K_D менее 1 мкМ, менее 500 нМ, менее 300 нМ, менее 200 нМ, менее 100 нМ, менее 75 нМ, менее 50 нМ, менее 30 нМ, менее 25 нМ, менее 20 нМ, менее 15 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ или менее 2 нМ. В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, с K_D менее 1 мкМ, менее 500 нМ, менее 300 нМ, менее 200 нМ, менее 100 нМ, менее 75 нМ, менее 50 нМ, менее 30 нМ, менее 25 нМ, менее 20 нМ, менее 15 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ или менее 2 нМ.

В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 связывается с мышинным ANGPTL3 (SEQ ID NO: 1) с аффинностью, которая по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере в 200 раз превышает аффинность связывания с мышинным ANGPTL4 (SEQ ID NO: 107). В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 связывается с человеческим ANGPTL3 (SEQ ID NO: 3) с аффинностью, которая по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере

ре в 200 раз превышает аффинность связывания с человеческим ANGPTL4 (SEQ ID NO: 108). В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность области SP1 мышинового ANGPTL3 (SEQ ID NO: 9), с аффинностью, которая по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере в 200 раз превышает аффинность связывания с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность области SP1 мышинового ANGPTL4 (SEQ ID NO: 109). В различных вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность области SP1 человеческого ANGPTL3 (SEQ ID NO: 10), с аффинностью, которая по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере в 200 раз превышает аффинность связывания с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность области SP1 человеческого ANGPTL4 (SEQ ID NO: 110).

Настоящее изобретение относится к репрезентативным нейтрализующим моноклональным антителам, обозначенным 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 1.315.1, 5.35 и 5.50. Антитела 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 5.35 и 5.50 связываются с эпитопом в положениях остатков 32-57 мышинового ANGPTL3 или человеческого ANGPTL3 (SEQ ID NO: 9 и 10). В некоторых вариантах осуществления антитела 4.7.1 и 4.9.1 связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3 или человеческого ANGPTL3, которая включает аминокислоты 33-37 и 40 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 (аминокислоты 2-6 и 9 SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления антитела 5.35 и 5.50 связываются с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3 или человеческого ANGPTL3, которая включает аминокислоты 34-37 и 40-42 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 (аминокислоты 3-6 и 9-11 SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления антитело 4.8.3 связывается с эпитопом в области SP1 мышинового ANGPTL3 или человеческого ANGPTL3, которая включает аминокислоты 34-37, 40 и 42 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 (аминокислоты 3-6, 9 и 11 SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10). Антитело 1.315.1 связывается с эпитопом в положениях остатков 42-116 мышинового ANGPTL3 (SEQ ID NO: 61).

Антитела 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 1.315.1, 5.35 и 5.50 нейтрализуют по меньшей мере одну активность ANGPTL3. Таким образом, предполагается, что антитела, которые связываются с эпитопом, связанным по меньшей мере с одним из антител 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 1.315.1, 5.35 и 5.50 (например, в человеческом или мышинном ANGPTL3), также должны обладать нейтрализующей активностью. Некоторые нейтрализующие моноклональные антитела против ANGPTL3 связываются с одним или несколькими пептидами, выбранными из SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13 и 61. Некоторые нейтрализующие моноклональные антитела против ANGPTL3 связываются с одним или несколькими пептидами, выбранными из SEQ ID NO: 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 связывается с пептидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее моноклональное антитело против ANGPTL3 связывается с пептидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 12, и пептидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые связываются с тем же эпитопом, с которым связывается моноклональное антитело 4.7.1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые связываются с тем же эпитопом, с которым связывается моноклональное антитело 4.8.3. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые связываются с тем же эпитопом, с которым связывается моноклональное антитело 4.9.1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые связываются с тем же эпитопом, с которым связывается моноклональное антитело 5.35. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые связываются с тем же эпитопом, с которым связывается моноклональное антитело 5.50. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нейтрализующим моноклональным антителам, которые связываются с тем же эпитопом, с которым связывается моноклональное антитело 1.315.1.

Некоторые нейтрализующие антитела включают тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:20. Некоторые нейтрализующие антитела включают тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:22. Некоторые нейтрализующие антитела включают тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. Некоторые нейтрализующие антитела включают легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28. Некоторые нейтрализующие антитела включают легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30. Некоторые нейтрализующие антитела включают легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32.

Некоторые нейтрализующие антитела включают тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, содержащую аминокислотную по-

следовательность, представленную в SEQ ID NO: 28. Некоторые нейтрализующие антитела включают тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30. Некоторые нейтрализующие антитела включают тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32.

1. Химерные и гуманизированные моноклональные антитела

В некоторых вариантах осуществления не человеческие антитела являются химерными. В некоторых вариантах осуществления мышинные моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим ANGPTL3, являются химерными. Некоторые репрезентативные методы получения химерных антител описаны, например, в публикации Morrison et al. (1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608; Takeda et al. (1985) Nature 314:452-454 и в патентах США №№ 6075181 и 5877397.

В некоторых вариантах осуществления не человеческие антитела являются "гуманизированными". В некоторых вариантах осуществления мышинные моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим ANGPTL3, являются гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления мышинные моноклональные антитела, которые направлены против мышинного ANGPTL3, но которые специфически связываются (то есть перекрестно реагируют) с человеческим ANGPTL3, являются гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела сохраняют специфичность связывания и обладают пониженной иммуногенностью (например, они индуцируют пониженный ответ, заключающийся в продуцировании человеческого антимышиного антитела (НАМА)) при их введении человеку. В некоторых вариантах осуществления гуманизация может быть достигнута с применением определенных методов, включая, но не ограничиваясь ими, присоединение CDR и конструирование человеческих последовательностей, как более подробно описано ниже.

В некоторых вариантах гуманизированных антител одну или несколько гипервариабельных областей (CDR), происходящих от вариабельных областей легкой и тяжелой цепи антитела с нужной специфичностью связывания ("донорного" антитела), присоединяют к человеческим каркасным областям (FR) "акцепторного" антитела.

Репрезентативные методы присоединения CDR описаны, например, в патентах США №№ 6180370, 5693762, 5693761, 5585089 и 5530101; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько CDR от вариабельных областей тяжелой и легкой цепей присоединяют к консенсусным человеческим FR акцепторного антитела. В некоторых вариантах осуществления для создания консенсусных человеческих FR, FR, происходящие от нескольких аминокислотных последовательностей человеческой тяжелой цепи или легкой цепи, сопоставляют путем выравнивания для идентификации консенсусной аминокислотной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления некоторые аминокислоты FR в акцепторном антителе заменяют аминокислотами FR донорного антитела. В некоторых таких вариантах аминокислотами FR донорного антитела являются аминокислоты, которые участвуют в сообщении аффинности связывания донорного антитела с антигеном-мишенью. См., например, патенты США №№ 6180370, 5693762, 5693761, 5585089 и 5530101; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033. В некоторых вариантах осуществления в целях моделирования донорных и/или акцепторных антител для идентификации остатков, которые вероятно участвуют в связывании с антигеном и/или в образовании структуры антигенсвязывающего сайта, используют компьютерные программы, облегчающие отбор остатков, таких как остатки FR, которые должны быть заменены в донорном антителе.

В некоторых вариантах осуществления CDR донорного антитела присоединяют к акцепторному антителу, содержащему человеческую константную область. В некоторых таких вариантах FR также присоединяют к акцептору. В некоторых вариантах осуществления CDR донорного антитела происходят от одноцепочечного Fv-антитела. В некоторых вариантах осуществления FR донорного антитела происходят от одноцепочечного Fv-антитела. В некоторых вариантах осуществления присоединенные CDR в гуманизированном антителе дополнительно модифицируют (например, путем введения аминокислотных замен, делеций или инсерций) для повышения аффинности связывания гуманизированного антитела с антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления присоединенные FR в гуманизированном антителе дополнительно модифицируют (например, путем введения аминокислотных замен, делеций или инсерций) для повышения аффинности связывания гуманизированного антитела с антигеном-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления не человеческие антитела могут быть гуманизированы методом "конструирования человеческих последовательностей". См., например, патенты США №№ 5766886 и 5869619. В некоторых вариантах конструирования человеческих последовательностей, информация о структуре вариабельных доменов антитела (например, информация, полученная в результате моделирования кристаллических структур и/или молекул) может быть использована для оценки вероятности того, что данный аминокислотный остаток в вариабельной области (а) будет участвовать в связывании с антигеном, (b) будет находиться на поверхности антитела (то есть будет доступным для растворителя), или (c) будет скрыт в вариабельной области антитела (то есть будет участвовать в сохранении

структуры вариабельной области). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления получают консенсусные последовательности человеческой вариабельной области для идентификации остатков, которые являются консервативными среди человеческих вариабельных областей. В некоторых вариантах осуществления такая информация позволяет определить, следует ли осуществлять замену аминокислотного остатка в вариабельной области не человеческого антитела.

Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 4.7.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 4.8.3. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 4.9.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 5.35. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 5.50. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 1.315.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 4.7.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 4.8.3. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 4.9.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 5.35. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 5.50. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 1.315.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 4.7.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 4.8.3. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 4.9.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 5.35. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 5.50. Некоторые нейтрализующие антитела содержат тяжелую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 1.315.1.

Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 4.7.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 4.8.3. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 4.9.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 5.35. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 5.50. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела 1.315.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 4.7.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 4.8.3. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 4.9.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 5.35. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 5.50. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере одну CDR антитела 1.315.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 4.7.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 4.8.3. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 4.9.1. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 5.35. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 5.50. Некоторые нейтрализующие антитела содержат легкую цепь, включающую по меньшей мере две CDR антитела 1.315.1.

2. Изотипы антител

В некоторых вариантах осуществления антитело против ANGPTL3 принадлежит к любому изотипу, выбранному из IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления антитело против ANGPTL3 принадлежит к изотипу IgG. В некоторых таких вариантах антитело принадлежит к подклассу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело против ANGPTL3 принадлежит к изотипу IgM. В некоторых таких вариантах осуществления антитело принадлежит к подклассу IgM1 или IgM2. В некоторых вариантах осуществления антитело против ANGPTL3 принадлежит к изотипу IgA. В некоторых таких вариантах антитело принадлежит к подклассу IgA1 или IgA2. В некоторых вариантах осуществления антитело против ANGPTL3 содержит человеческую легкую цепь каппа и человеческую тяжелую цепь IgG1 или IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело против ANGPTL3 содержит мышиную легкую цепь каппа и мышиную тяжелую цепь IgG1 или IgG2.

3. Модифицированные антитела

В различных вариантах осуществления антитело модифицируют для изменения одного или нескольких его свойств. В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело по сравнению с немодифицированным антителом может обладать определенными преимуществами, такими как повы-

шенная стабильность, более длительное пребывание в кровотоке или пониженная иммуногенность (см., например, патент США № 4179337). В некоторых вариантах осуществления антитело модифицируют путем его присоединения к не белковой молекуле. В некоторых вариантах осуществления антитело модифицируют путем изменения статуса гликозилирования антитела, например, путем изменения числа, типа, связи и/или положения присоединения углеводных цепей к данному антителу. В некоторых вариантах осуществления антитело модифицируют так, чтобы оно не было гликозилированным.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько химических молекул связаны с аминокислотным остовом и/или с углеводными остатками антитела. Некоторые репрезентативные методы присоединения химических молекул к антителу известны специалистам. Такими методами являются, но не ограничиваются ими, реакции ацилирования или реакции алкилирования. См., например, EP 0401384; Malik et al. (1992), *Exp. Hematol.*, 20:1028-1035; Francis (1992) *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10, published by Mediscript, Mountain Court, Friern Barnet Lane, London N20 OLD, UK; EP 0154316; EP 0401384; WO 92/16221; WO 95/34326; WO 95/13312; WO 96/11953; WO 96/19459 и WO 96/19459. В некоторых вариантах осуществления любые из этих реакций осуществляют в целях генерирования антитела, которое является химически модифицированным у своего аминоконца.

В некоторых вариантах осуществления антитело связано с детектируемой меткой, такой как ферментативная, флуоресцентная, изотопная или аффинная метка. В некоторых вариантах осуществления антитело модифицируют путем его присоединения к одному или нескольким полимерам.

В некоторых вариантах осуществления антитело присоединено к одному или нескольким водорастворимым полимерам. В некоторых таких вариантах присоединение к водорастворимому полимеру способствует уменьшению вероятности осаждения данного антитела в водной среде, такой как физиологическая среда. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело присоединено к водорастворимому полимеру. В соответствии с некоторыми осуществлениями изобретения специалист в данной области может выбрать подходящий водорастворимый полимер в зависимости от конкретных факторов, включая, но не ограничиваясь ими, такой фактор, как применение конъюгата "полимер/антитело" для лечения данного пациента, и если он применяется, то при выборе учитывается фармакологический профиль антитела (например, время полужизни, доза, активность, антигенность и/или другие факторы).

Некоторыми репрезентативными клинически приемлемыми водорастворимыми полимерами являются, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (ПЭГ); пропиональдегид полиэтиленгликоля; сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля; монометоксиполиэтиленгликоль; карбоксиметилцеллюлоза; декстран; поливиниловый спирт (ПВС); поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан; поли-1,3,6-триоксан; сополимер этилена/ангидрида малеиновой кислоты; поли-β-аминокислоты (гомополимеры или статистические сополимеры); поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль; гомополимеры полипропиленгликоля (ППГ) и другие полиалкиленоксиды; сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида; полиоксиэтилированные полиолы (ПОП) (например, глицерин) и другие полиоксиэтилированные полиолы; полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированная глюкоза, колоновые кислоты или другие углеводные полимеры; и фиколл, декстран или их смеси. Некоторыми репрезентативными ПЭГ являются, но не ограничиваются ими, некоторые формы, которые используются специалистами в данной области для модификации антител, такие как моно-(C₁-C₁₀)алкокси- или арилокси-ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления для такой модификации предпочтение может быть отдано ПЭГ-пропиональдегиду из-за его стабильности в воде.

В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер может иметь любую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер является разветвленным или неразветвленным. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу примерно 2-100 кДа, включая все значения между граничными значениями данного интервала. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу примерно 5-40 кДа. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу примерно 10-35 кДа. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу примерно 15-30 кДа.

В некоторых вариантах осуществления антитело присоединено к ПЭГ (то есть данное антитело является "ПЭГилированным"). В различных вариантах осуществления ПЭГ обладает низкой токсичностью по отношению к млекопитающим. См., например, Carpenter et al. (1971) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18:35-40. Следует отметить, что ПЭГ-аддукт аденозин-дезаминазы был разрешен в Соединенных Штатах для введения человеку в целях лечения тяжелого комбинированного синдрома иммунодефицита. В различных вариантах осуществления ПЭГ может способствовать снижению иммуногенности антител. Так, например, в некоторых вариантах осуществления присоединение ПЭГ к антителу, имеющему не человеческие последовательности, может приводить к снижению антигенности такого антитела при его введении человеку.

В некоторых вариантах осуществления полимер присоединяют к одному или нескольким реакционноспособным аминокислотным остаткам антитела. Некоторыми репрезентативными реакционноспособными аминокислотными остатками являются, но не ограничиваются ими, альфа-аминогруппа аминоконцевой аминокислоты, эпсилон-аминогруппы лизинового бокового цепей, сульфгидрильные группы

цистеиновых боковых цепей, карбоксильные группы аспартильных и глутамильных боковых цепей, альфа-карбоксильная группа карбоксиконцевой аминокислоты, тирозиновые боковые цепи и активированные гликозильные цепи, связанные с некоторыми аспарагиновыми, сериновыми или треониновыми остатками. Некоторые репрезентативные активированные формы ПЭГ ("реагенты ПЭГ"), подходящие для непосредственного взаимодействия с белками, известны специалистам в данной области. Так, например, в некоторых вариантах осуществления, реагентами ПЭГ, подходящими для связывания с аминокруппами, являются, но не ограничиваются ими, активные сложные эфиры карбоновых кислот или карбонатные производные ПЭГ, например производные, в которых уходящими группами являются N-гидроксисукцинимид, п-нитрофенол, имидазол или 1-гидрокси-2-нитробензол-4-сульфонат. В некоторых вариантах осуществления реагенты ПЭГ, содержащие малеимидо- или галогенацетильные группы, используются для модификации сульфгидрильных групп. В некоторых вариантах осуществления реагенты ПЭГ, содержащие аминокруппы, гидразиновые группы и/или гидразидные группы, могут быть использованы в реакциях взаимодействия с альдегидами, образованными в результате окисления углеводных групп в белке периодатом.

В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер имеет по меньшей мере одну реакционноспособную группу. В некоторых вариантах осуществления активированное производное водорастворимого полимера, такого как ПЭГ, получают посредством реакции взаимодействия водорастворимого полимера с активирующей группой. В некоторых вариантах осуществления активирующая группа может быть монофункциональной, бифункциональной или многофункциональной. Некоторыми репрезентативными активирующими группами, которые могут быть использованы для связывания водорастворимого полимера с двумя или более антителами, являются, но не ограничиваются ими, следующие группы: сульфон (например, хлорсульфон, винилсульфон и дивинилсульфон), малеимид, сульфгидрил, тиол, трифторметансульфонат, трезилат, азиридин, оксиран и 5-пиридил. В некоторых вариантах осуществления производное ПЭГ обычно является резистентным к гидролизу в течение длительного периода времени в водных средах при pH примерно 11 или менее. В некоторых вариантах осуществления производное ПЭГ, связанное с другой молекулой, такой как антитело, сообщает этой молекуле резистентность к гидролизу. Некоторыми репрезентативными гомобифункциональными производными ПЭГ являются, но не ограничиваются ими, ПЭГ-бис-хлорсульфон и ПЭГ-бис-винилсульфон (см. WO 95/13312).

D. Некоторые методы получения моноклональных антител

1. Некоторые методы получения гибридом

В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела получают стандартными методами. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела получают гибридомными методами. Некоторые такие методы известны специалистам. См., например, Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495-497; Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* Ch. 6 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). В некоторых таких вариантах подходящих животных, таких как мыши, крысы, хомячки, обезьяны или другие млекопитающие, иммунизируют иммуногеном для продуцирования антитело-секретирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело-секретирующими клетками являются В-клетки, такие как лимфоциты или спленоциты. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты (например, человеческие лимфоциты) иммунизируют *in vivo* для продуцирования антитело-секретирующих клеток. См., например, Borreback et al. (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:3995-3999.

В некоторых вариантах осуществления антитело-секретирующие клетки подвергают слиянию с "иммортилизованной" клеточной линией, такой как клеточная линия миелоидного типа, в результате чего получают гибридомные клетки. В некоторых вариантах осуществления гибридомные клетки, продуцирующие нужные антитела, идентифицируют, например, с помощью ELISA. В некоторых вариантах осуществления такие клетки могут быть затем субклонированы и культивированы стандартными методами. В некоторых вариантах осуществления такие клетки могут быть также культивированы *in vivo* в качестве асцитных опухолей в подходящем животном-хозяине. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела выделяют из среды для культивирования гибридом, из сыворотки или из асцитной жидкости стандартными методами разделения, такими как аффинная хроматография. Руководство по продуцированию гибридом и очистке моноклональных антител в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения приводится, например, в публикации Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* Ch. 8 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

В некоторых вариантах осуществления мышинные моноклональные антитела получают путем иммунизации генетически модифицированных мышей иммуногеном. В некоторых таких вариантах мышами являются ANGPTL3-дефицитные мыши, у которых функция ANGPTL3 частично или полностью отсутствует. В некоторых таких вариантах указанными мышами являются "дефицитные по гену" мыши, у которых отсутствует весь ген, кодирующий ANGPTL3, или его часть. В некоторых вариантах осуществления таких дефицитных по гену мышей иммунизируют мышинным ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления таких дефицитных по гену мышей иммунизируют человеческим ANGPTL3.

В некоторых вариантах осуществления человеческие моноклональные антитела вырабатываются у трансгенных животных (например, у мышей), способных продуцировать человеческие антитела. См., например, патенты США №№ 6075181 А и 6114598 А и WO 98/24893 А2. Так, например, в некоторых

вариантах осуществления человеческие гены иммуноглобулина вводят (например, с использованием дрожжевых искусственных хромосом и человеческих хромосомных фрагментов или путем интеграции в зародышевую линию) мышам, у которых эндогенные гены Ig являются инактивированными. См., например, Jakobovits et al. (1993) *Nature* 362:255-258; Tomizuka et al. (2000) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 97:722-727; и Mendez et al. (1997) *Nat. Genet.* 15:146-156 (описание линии трансгенных мышей Xenomouse II®).

В некоторых вариантах осуществления таких трансгенных мышей иммунизируют иммуногеном. В некоторых таких вариантах получают лимфатические клетки (такие как В-клетки) у мышей, экспрессирующих антитела. В некоторых таких вариантах выделенные таким образом клетки подвергают слиянию с "иммортилизованной" клеточной линией, такой как клеточная линия миелоидного типа, в результате чего получают гибридомные клетки. В некоторых таких вариантах гибридомные клетки скринируют и отбирают для идентификации клеток, которые продуцируют антитела против представляющего интерес антигена. Некоторые репрезентативные методы и трансгенные мыши, подходящие для продуцирования человеческих моноклональных антител, описаны, например, в публикациях Jakobovits et al. (1993) *Nature* 362:255-258; Jakobovits (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:561-566; Lonberg et al. (1995) *Int'l Rev. Immunol.* 13:65-93; Fishwild et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14:845-851; Mendez et al. (1997) *Nat. Genet.* 15:146-156; Green (1999) *iL Immunol. Methods* 231:11-23; Tomizuka et al. (2000) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 97:722-727; и рассматриваются в публикации Little et al. (2000) *Immunol. Today* 21:364-370; и в заявке WO 98/24893. В некоторых вариантах осуществления человеческие моноклональные антитела против ANGPTL3 являются подходящими для их использования в качестве терапевтических антител. См., например, ниже, часть V.G.

2. Некоторые методы представления

В некоторых вариантах осуществления человеческие моноклональные антитела продуцируют методом представления, таким как, например, любой из методов, описанных ниже.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело продуцируют методами фагового представления. Некоторые репрезентативные методы фагового представления антител известны специалистам и описаны, например, в публикации Hoogenboom, *Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications*, from *Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols* (2002) 178:1-37 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). Так, например, в некоторых вариантах осуществления библиотеку антител представляют на поверхности нитчатого фага, такого как нелитический нитчатый фаг fd или M13. В некоторых вариантах осуществления такими антителами являются фрагменты антител, такие как scFv, Fab, Fv, имеющие сконструированные межмолекулярные дисульфидные связи для стабилизации пары V_H - V_L , и димерные антитела. В некоторых вариантах осуществления могут быть затем выбраны антитела с нужной специфичностью связывания. Некоторые репрезентативные варианты методов фагового представления антител более подробно описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления библиотека фагового представления антител может быть получена некоторыми методами, известными специалистам. См., например, Hoogenboom, *Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications*, from *Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols* (2002) 178:1-37 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). В некоторых вариантах осуществления набор переменных генов получают с помощью ПЦР-амплификации геномной ДНК и кДНК, происходящих от мРНК антитело-секретирующих клеток. Так, например, в некоторых вариантах осуществления кДНК получают из мРНК В-клеток. В некоторых вариантах осуществления кДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей, амплифицируют, например, с помощью ПЦР.

В некоторых вариантах осуществления кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи клонируют в подходящий вектор. В некоторых вариантах осуществления кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи произвольно объединяют в процессе клонирования, в результате чего получают библиотеку кДНК, кодирующую различные scFv или Fab. В некоторых вариантах осуществления кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи лигируют, а затем клонируют в подходящий вектор. В некоторых вариантах осуществления кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи лигируют путем постадийного клонирования в подходящий вектор.

В некоторых вариантах осуществления кДНК клонируют в вектор фагового представления, такой как фагмидный вектор. Некоторые репрезентативные фагмидные векторы, такие как pCES1, известны специалистам. В некоторых вариантах осуществления кДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи, присутствуют на одном и том же векторе. Так, например, в некоторых вариантах осуществления кДНК, кодирующую scFv, клонируют в полноразмерный ген III или его часть с сохранением рамки считывания, где указанный ген кодирует минорный белок оболочки фага рIII. В некоторых таких вариантах фагида направляет экспрессию гибрида scFv-pIII на поверхность фага. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, кДНК, кодирующую тяжелую цепь (или легкую цепь), клонируют в полноразмерный ген III или его часть с сохранением рамки считывания, а кДНК, кодирующую легкую цепь (или тяжелую цепь), клонируют в тот же самый вектор ниже сигнальной последовательности. Сигнальная последовательность направляет экспрессию легкой цепи (или тяжелой цепи) в периплазму клетки-хозяина, где тяжелая и легкая цепи подвергаются сборке с образованием Fab-фрагментов.

Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, кДНК, кодирующая тяжелую цепь, и кДНК, кодирующая легкую цепь, присутствуют на отдельных векторах. В некоторых таких вариантах кДНК тяжелой цепи и легкой цепи клонируют по отдельности, одну в фагмиду, а другую в фаговый вектор, где указанные кДНК содержат сигналы для *in vivo* рекомбинации в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантную фагмиду или фаговые векторы вводят в подходящего бактериального хозяина, такого как *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления, осуществляемых с использованием фагмиды, хозяина инфицируют хелперным фагом для доставки структурных белков фага, что позволяет экспрессировать фаговые частицы, несущие гибридный белок "антитело-pIII" на поверхности фага.

В некоторых вариантах осуществления "синтезированные" библиотеки антител конструируют с использованием наборов переменных генов, которые подвергают реаранжировке *in vitro*. Так, например, в некоторых вариантах осуществления отдельные сегменты генов, кодирующих тяжелую или легкую цепи (V-D-J или V-J, соответственно), произвольно объединяют с помощью ПЦР. В некоторых таких вариантах в CDR и, возможно, в FR, может быть внесено дополнительное разнообразие последовательностей, например, с помощью ПЦР с вероятностью ошибки. В некоторых таких вариантах дополнительное разнообразие последовательностей может быть внесено в CDR3, например, в H3 тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления библиотеки представления на "неиммунизованном" или "универсальном" фаге конструируют, как описано выше, с использованием нуклеиновой кислоты, происходящей от неиммунизованного животного. В некоторых вариантах осуществления неиммунизованным животным является человек. В некоторых вариантах осуществления библиотеки представления на "иммунизованном" фаге конструируют, как описано выше, с использованием нуклеиновой кислоты, происходящей от иммунизованного животного. В некоторых вариантах осуществления иммунизованными животными являются человек, крысы, мыши, хомячки или обезьяны. В некоторых вариантах осуществления животных иммунизируют любыми иммуногенами, описанными ниже.

Некоторые репрезентативные универсальные библиотеки фагового представления человеческих антител получают из коммерчески доступных источников. Некоторыми репрезентативными библиотеками являются, но не ограничиваются ими, серии библиотек HuCAL® от MorphoSys AG (Martinstreid/Munich, Germany); библиотеки от Scruell (Leiden, the Netherlands), полученные методами MAbstract®; библиотека Fab-фрагментов n-CoDeR™ от BioInvent (Lund, Sweden); и библиотеки, поставляемые компанией Cambridge Antibody Technology (Cambridge, UK).

В некоторых вариантах осуществления отбор антител, обладающих нужной специфичностью связывания, из библиотеки фагового представления осуществляют путем проведения последовательных стадий "пэннинга". В некоторых вариантах такого "пэннинга" препараты фаговых библиотек обрабатывают антигеном. В некоторых вариантах осуществления комплексы "фаг-антиген" промывают, а несвязанный фаг удаляют. В некоторых вариантах осуществления связанный фаг выделяют, а затем амплифицируют путем инфицирования бактерией *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления фаг, продуцирующий моноклональное антитело, может быть клонирован путем сбора одиночных бляшек. В некоторых вариантах осуществления вышеописанную процедуру повторяют.

В некоторых вариантах осуществления антигеном, используемым в пэннинге, является любой из иммуногенов, описанных ниже. В некоторых вариантах осуществления антиген иммобилизуют на твердом носителе для облегчения очистки антигенсвязывающего фага с помощью аффинной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления антиген подвергают биотинилированию, что позволяет отделять связанный фаг от несвязанного фага с использованием магнитных сфер, покрытых стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления антиген может быть иммобилизован на клетках (для прямого пэннинга), в криосрезах тканей или на мембранах (например, на нейлоновых или нитроцеллюлозных мембранах). Другие варианты некоторых процедур пэннинга могут быть проведены рутинными методами, известными специалистам.

В некоторых вариантах осуществления для продуцирования моноклональных антител используют дрожжевую систему представления. В некоторых таких системах антитело экспрессируется в виде гибридного белка с полноразмерным дрожжевым белком AGA2 или его частью, которые становятся представленными на поверхности стенки дрожжевой клетки. В некоторых вариантах осуществления дрожжевые клетки, экспрессирующие антитела с нужной специфичностью связывания, могут быть затем идентифицированы путем обработки этих клеток флуоресцентно меченым антигеном. В некоторых вариантах осуществления дрожжевые клетки, связывающиеся с антигеном, могут быть затем выделены с помощью проточной цитометрии. См., например, Voder et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:553-557.

3. Некоторые методы осуществления аффинного созревания

В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела по отношению к конкретному антигену повышают путем обеспечения условий аффинного созревания антитела (или "прямой эволюции") *in vitro*. *In vivo* нативные антитела подвергаются аффинному созреванию посредством соматической гипермутации с последующим отбором. Некоторые *in vitro* способы имитируют такой *in vivo* процесс, что позволяет продуцировать антитела, аффинность которых аналогична аффинности нативных антител или

превышает такую аффинность.

В некоторых вариантах аффинного созревания в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариabельную область антитела, обладающего нужной специфичностью связывания, вводят мутации. См., например, Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134; Brekke et al. (2002) *Nat. Reviews* 2: 52-62. В некоторых вариантах осуществления мутации вводят в вариabельную область тяжелой цепи, легкой цепи или обеих этих цепей. В некоторых вариантах осуществления мутации вводят в одну или несколько CDR. В некоторых вариантах осуществления мутации вводят в H3, L3 или в обе эти цепи. В некоторых вариантах осуществления мутации вводят в одну или несколько FR. В некоторых вариантах осуществления библиотеку мутаций создают, например, в виде библиотеки фагового, рибосомного или дрожжевого представления, так, чтобы антитела с повышенной аффинностью могли быть идентифицированы стандартными методами скрининга. См., например, Boder et al. (2000) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 97:10701-10705; Foote et al. (2000) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 97: 10679-10681; Hoogenboom, *Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications*, from *Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols* (2002) 178:1-37 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ) и Hanes et al. (1998) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:14130-14135.

В некоторых вариантах осуществления мутации вводят посредством сайт-специфического мутагена, исходя из информации о структуре антитела, например, антигенсвязывающего сайта. В некоторых вариантах осуществления мутации вводят посредством комбинаторного мутагенеза CDR. В некоторых вариантах осуществления всю последовательность, кодирующую вариabельную область или ее часть, подвергают неспецифическому мутагенезу, например, с использованием клеток-мутаторов *E.coli.*, посредством реаранжировки гомологичных генов или с помощью ПЦР с вероятностью ошибки. В некоторых вариантах осуществления, мутацию вводят методом "перестановки ДНК". См., например, Cramer et al. (1996) *Nat. Med.* 2:100-102; Fermer et al. (2004) *Tumor Biol.* 25:7-13.

В некоторых вариантах осуществления для продуцирования антител с повышенной аффинностью используют "перестановку цепей". В некоторых вариантах перестановки цепей одну из цепей, например легкую цепь, заменяют набором легких цепей, а другую цепь, например, тяжелую цепь, оставляют неизменной для обеспечения специфичности. В некоторых таких вариантах создают библиотеку антител с перестановленными цепями, где неизменная тяжелая цепь экспрессируется в комбинации с каждой легкой цепью, происходящей от набора легких цепей. В некоторых вариантах осуществления такие библиотеки могут быть затем скринированы на антитела с повышенной аффинностью. В некоторых вариантах осуществления тяжелые и легкие цепи последовательно заменяют. В некоторых вариантах осуществления заменяют только вариabельные области тяжелой и/или легкой цепей. В некоторых вариантах осуществления заменяют только часть вариabельных областей, например, CDR тяжелой и/или легкой цепей. См., например, Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134; Brekke et al. (2002) *Nat. Reviews* 2: 52-62; Kang et al. (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88: 11120-11123; Marks et al. (1992) *Biotechnol.* 10: 779-83.

В некоторых вариантах осуществления мышинные моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим ANGPTL3 (включая, но не ограничиваясь ими, мышинные моноклональные антитела, которые продуцируются против мышинного ANGPTL3, но которые специфически связываются (то есть перекрестно реагируют) с человеческим ANGPTL3), подвергают последовательной перестановке цепи. В некоторых вариантах осуществления, например, тяжелую цепь данного мышинного моноклонального антитела объединяют с новым набором человеческих легких цепей и отбирают антитела с нужной аффинностью. В некоторых таких вариантах легкие цепи выбранных антител затем объединяют с новым набором человеческих тяжелых цепей, и отбирают антитела с нужной аффинностью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления отбирают человеческие антитела, обладающие нужной специфичностью и аффинностью связывания с антигеном.

Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, тяжелую цепь данного мышинного моноклонального антитела объединяют с новым набором человеческих легких цепей, и в первом раунде перестановки отбирают антитела с нужной аффинностью. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь исходного мышинного моноклонального антитела объединяют с новым набором человеческих тяжелых цепей, и во втором раунде перестановки отбирают антитела с нужной аффинностью. В некоторых вариантах осуществления человеческие легкие цепи, происходящие от антител, отобранных в первом раунде перестановки, объединяют с человеческими тяжелыми цепями антител, отобранных во втором раунде перестановки. Так, например, в некоторых вариантах осуществления отбирают человеческие антитела, обладающие нужной специфичностью и аффинностью связывания с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления применяют метод "рибосомного представления", который является альтернативой отбору антител с созреванием аффинности. В некоторых вариантах метода рибосомного представления нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, амплифицируют с помощью ОТ-ПЦР, проводимой между стадиями отбора. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления для введения мутаций в нуклеиновую кислоту могут быть использованы полимеразы, участвующие в ПЦР с вероятностью ошибки. Неограничивающий пример такого метода подробно описан в публикации Hanes et al. (1998) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95: 14130-14135.

4. Некоторые рекомбинантные методы

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело получают рекомбинантными методами. См., например, патент США № 4816567. В некоторых таких вариантах нуклеиновую кислоту, кодирующую цепи моноклональных антител, клонируют и экспрессируют в подходящую клетку-хозяина. Так, например, в некоторых вариантах осуществления РНК может быть получена из клеток, экспрессирующих нужное антитело, таких как зрелые В-клетки или гибридомные клетки, стандартными методами. В некоторых вариантах осуществления РНК может быть затем использована для получения кДНК стандартными методами. В некоторых вариантах осуществления кДНК, кодирующую полипептид тяжелой или легкой цепи, амплифицируют, например, с помощью ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. В некоторых вариантах осуществления кДНК клонируют в подходящий экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор затем трансформируют или трансфицируют в подходящую клетку-хозяина, такую как клетка-хозяин, которая эндогенно не продуцирует данное антитело. Некоторыми репрезентативными клетками-хозяевами являются, но не ограничиваются ими, *E. coli*, клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) и миеломные клетки. В некоторых вариантах осуществления, в которых тяжелая и легкая цепи коэкспрессируются в одном и том же хозяине, может быть выделено реконструированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления кДНК, кодирующая тяжелую или легкую цепь, может быть модифицирована. Так, например, в некоторых вариантах осуществления константная область мышшиной тяжелой или легкой цепи может быть заменена константной областью человеческой тяжелой или легкой цепи. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления может быть получено химерное антитело, которое имеет константные области человеческого антитела, но при этом сохраняют специфичность связывания мышшиного антитела.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные антитела могут быть экспрессированы в некоторых клеточных линиях. В некоторых вариантах осуществления последовательности, кодирующие конкретные антитела, могут быть использованы для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами изобретения такая трансформация может представлять собой любой известный метод введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Некоторыми репрезентативными методами являются, но не ограничиваются ими, упаковка полинуклеотида в вирус (или в вирусный вектор) и трансдукция клетки-хозяина вирусом (или вектором), а также осуществление некоторых процедур трансфекции, известных специалистам и описанных в патентах США №№ 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455. В некоторых вариантах осуществления используемая процедура трансформации может зависеть от способности данного хозяина к трансформации. Некоторые репрезентативные методы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих известны специалистам, и такими методами являются, но не ограничиваются ими, опосредуемая декстраном трансфекция, преципитация фосфатом кальция, опосредуемая полибренном трансфекция, слияние протопластов, электропорация, инкапсуляция полинуклеотида(ов) в липосомы и прямая микроинъекция ДНК в ядро.

Некоторые репрезентативные клеточные линии млекопитающих, которые могут быть использованы в качестве экспрессирующих хозяев, известны специалистам, и такими клеточными линиями являются, но не ограничиваются ими, многие immortalized клеточные линии, имеющиеся в Американской коллекции типовых культур (ATCC), включая, но не ограничиваясь ими, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почек детеныша хомячка (ВНК), клетки почек обезьян (COS), человеческие клетки гепатоцеллюлярной карциномы (например, Hep G2) и ряд других клеточных линий. В некоторых вариантах осуществления клеточные линии могут быть отобраны путем определения клеток, которые продуцируют высокие уровни антител, специфически связывающихся с ANGPTL3.

Е. Некоторые полипептидные иммуногены

В некоторых вариантах осуществления, для продуцирования антител, животных иммунизируют иммуногеном. В некоторых вариантах осуществления таким иммуногеном является полипептид, содержащий ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления иммуногеном является полипептид, содержащий фрагмент ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления таким иммуногеном является полипептид, содержащий N-концевой суперспирализованный домен ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления таким иммуногеном является полипептид, содержащий область SP1 ANGPTL3.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген включает мышшиный ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления иммуноген включает человеческий ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления иммуноген включает мышшиный ANGPTL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген включает человеческий ANGPTL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления иммуноген включает фрагмент мышшиного ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления иммуноген включает фрагмент SEQ ID NO: 1 от остатка 17 до остатка 240. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит SEQ ID NO: 1 от остатка 32 до остатка 57. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В

некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит фрагмент человеческого ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит фрагмент SEQ ID NO: 3 от остатка 20 до остатка 243. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит фрагмент SEQ ID NO: 1 от остатка 32 до остатка 57. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит любой пептид, состоящий примерно из 10-20 смежных аминокислот от остатка 17 до остатка 240 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит любой пептид, состоящий примерно из 10-20 смежных аминокислот от остатка 20 до остатка 243 SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит один или несколько пептидов, выбранных из SEQ ID NO: 9, 10, 12, 13, 59, 60 и 61. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит пептид, выбранный из SEQ ID NO: 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления иммуноген включает пептид, содержащий одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 59 и 60. В некоторых вариантах осуществления иммуноген включает пептид, содержащий SEQ ID NO: 12, 13 и 61. В некоторых вариантах осуществления выбирают пептид, который, вероятно, является иммуногенным. В некоторых таких вариантах выбранный пептид, вероятно, является гидрофильным и/или находится на поверхности нативного ANGPTL3 и имеет определенную укладку. Репрезентативный метод отбора подходящих иммуногенных пептидов описан, например, в руководстве Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* Ch. 11.14 (John Wiley & Sons, NY); и Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* Ch. 5 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Для того чтобы определить, является ли пептидный сегмент белка гидрофильным, а поэтому он находится на поверхности белка, существуют определенные репрезентативные алгоритмы, известные специалистам в данной области. В некоторых таких алгоритмах для достижения указанных предсказаний используется информация о первичной последовательности белка. Некоторые такие алгоритмы разработаны на основе метода, описанного, например, Hopp & Woods (1981) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 78:3824-3828, или Kyte & Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157: 105-132. Для предсказания вторичной структуры белка на основе информации о первичной аминокислотной последовательности белка существуют некоторые репрезентативные алгоритмы, известные специалистам. См., например, Corrigan et al. (1982) *Comput. Programs Biomed.* 3: 163-168. Некоторые такие алгоритмы разработаны на основе метода, описанного, например, Chou & Fasman (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 25-276. В некоторых вариантах осуществления пептидные сегменты, которые, как было предсказано, образуют α -витки, а поэтому они могут находиться на поверхности белка, могут быть выбраны в качестве иммуногенов.

В некоторых вариантах осуществления животное иммунизируют иммуногеном и одним или несколькими адъювантами. В некоторых вариантах осуществления адъювант используют для повышения иммунного ответа в зависимости от вида хозяина. Некоторыми репрезентативными адъювантами являются, но не ограничиваются ими, адъювант Фрейнда (полный и неполный), минеральные соли, такие как гидроксид алюминия или фосфат алюминия, поверхностно-активные вещества, хитозан, лизолецитин, полиолы плюроники, полианионы, пептиды, масляные эмульсии и человеческие адъюванты, которые могут быть использованы, такие как BCG (бацилла Кальметта-Герена) и *Corynebacterium parvum*. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ на иммуноген, например пептидный иммуноген, может быть увеличен посредством присоединения иммуногена к другой иммуногенной молекуле или "белку-носителю". Некоторыми репрезентативными белками-носителями являются, но не ограничиваются ими, гемоцианин лимфы улитки (KLH), столбнячный токсид, дифтерийный токсид, овальбумин, холерный токсид и их иммуногенные фрагменты. Репрезентативный метод присоединения пептидных иммуногенов к белкам-носителям описан, например, в руководстве Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* Ch. 11.15 (John Wiley & Sons, NY) и Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* Ch. 5 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

В некоторых вариантах осуществления любой из вышеописанных иммуногенов может быть получен стандартными рекомбинантными методами. Так, например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий мышинный или человеческий ANGPTL3, или фрагмент этого полинуклеотида, могут быть клонированы в подходящий экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор затем вводят в подходящую клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления полипептид затем выделяют из клетки-хозяина стандартными методами. Некоторые репрезентативные методы экспрессии рекомбинантных белков описаны, например, в руководстве Ausubel et al. (1991) *Current Protocols in Molecular Biology* Ch. 16 (John Wiley & Sons, NY).

F. Некоторые анализы

1. Некоторые анализы на связывание

В некоторых вариантах осуществления антитела подвергают скринингу на связывание с ANGPTL3 с применением некоторых рутинных методов детектирования связывания антитела с антигеном. Так,

например, в некоторых вариантах осуществления способность моноклонального антитела связываться с ANGPTL3 анализируют стандартными методами иммуноблоттинга, такими как Вестерн-блот-анализ. См., например, Ausubel et al. (1992) *Current Protocols in Molecular Biology* Ch. 10.8 (John Wiley & Sons, NY); Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). В некоторых вариантах осуществления ANGPTL3, используемый в таких анализах, может быть либо изолированным, либо он может присутствовать в сложной смеси белков и/или макромолекул.

В некоторых вариантах осуществления способность моноклонального антитела связываться с ANGPTL3 анализируют с помощью анализа на конкурентное связывание, который позволяет оценивать способность антитела-кандидата конкурировать с известным анти-ANGPTL3 антителом за связывание с ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления известным анти-ANGPTL3 антителом является любое из моноклональных антител, описанных ниже в части VI.J. В некоторых вариантах осуществления анализ на конкурентное связывание осуществляют с помощью ELISA. См., например, Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* Ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

В некоторых вариантах осуществления анализ на связывание проводят для количественной оценки кинетики связывания (например, константы скорости) или аффинности связывания (например, константы ассоциации или диссоциации) антитела против ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления кинетику или аффинность связывания определяют в "твердой фазе" с использованием иммобилизующего антигена (например, ANGPTL3) на твердом носителе. Иммобилизованный антиген "захватывает" антитело из раствора. В некоторых вариантах осуществления кинетику или аффинность связывания определяют в "твердой фазе" с использованием иммобилизующего антитела (например, антитела против ANGPTL3) на твердом носителе. Иммобилизованное антитело "захватывает" антиген из раствора.

В некоторых вариантах осуществления кинетику связывания или аффинность связывания определяют методами на основе ELISA. В некоторых вариантах осуществления кинетику связывания или аффинность связывания определяют биосенсорным методом, таким как метод поверхностного плазмонного резонанса Biacore (Biacore, Piscataway, NJ). Некоторые такие методы известны специалистам в данной области. См., например, McCafferty et al. (eds.) (1996) *Antibody Engineering: A Practical Approach* (IRL, Oxford, UK); Goldberg et al. (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5:278-281; Karlsson et al. (1991) *J. Immunol. Methods* 145:229-240; Malmqvist (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5:282-286, а обзорное описание см. в публикации Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, from *Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols* (2002) 178:1-37 at 19 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ).

В некоторых вариантах осуществления определяют кинетику связывания или аффинность связывания Fab-фрагмента, который специфически связывается с ANGPTL3. В некоторых случаях Fab-фрагменты не обладают способностью к мультимеризации. Однако, в некоторых случаях, мультимеризация может затруднять определение кинетики связывания и аффинности связывания в "твердофазных" методах. См., например, Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, from *Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols* (2002) 178:1-37 at 19 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент, который специфически связывается с ANGPTL3, может быть использован в анализе на связывание, в котором антиген иммобилизован на твердом носителе, таком как, например, анализ ELISA или Biacore. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагменты получают из интактного антитела, которое специфически связывается с ANGPTL3, с применением ферментативных методов. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагменты получают путем экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих Fab-фрагменты, в системе рекомбинантной экспрессии, такой как система, описанная выше в части V.D.3.

В некоторых вариантах осуществления кинетику связывания или аффинность связывания антитела против ANGPTL3 определяют методами с использованием жидкой фазы. В таких методах кинетику или аффинность связывания определяют для комплекса "антитело-антиген" в растворе. Некоторые такие методы известны специалистам в данной области. Неограничивающим примером такого метода является "кинетический анализ на исключение" или "KinExA". См., например, Blake et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:27677-27685; Drake et al. (2004) *Anal. Biochem.* 328:35-43 (сравнение "твердофазного" метода Biacore и метода с использованием жидкой фазы KinExA). В некоторых вариантах осуществления оборудование для проведения KinExA поставляется компанией Savidyne Instruments, Inc. (Boise, ID).

В некоторых вариантах осуществления кинетику связывания или аффинность связывания поливалентного антитела или антитела, которое подвергается мультимеризации, определяют методом с использованием жидкой фазы. В некоторых случаях кинетику связывания или аффинность связывания поливалентного антитела или антитела, которое подвергается мультимеризации, определяют с помощью анализа в жидкой фазе.

В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания анти-ANGPTL3 антитела, измеренная по его K_D , составляет 10^{-6} М или менее. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания анти-ANGPTL3 антитела составляет примерно 10^{-7} М, примерно 10^{-8} М или примерно 10^{-9} М или менее. В некоторых вариантах осуществления анти-ANGPTL3 антитело может быть использовано в ка-

честве терапевтического антитела. См., например, Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания, составляющая менее чем 10^{-9} М (например, аффинность связывания в пределах от примерно 500 до примерно 0,5 пМ, включая, но не ограничиваясь ими, аффинность связывания от примерно 100 до примерно 5 пМ), может быть достигнута, например, с применением методов аффинного созревания. См., например, Boder et al. (2000) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 97: 10701-10705. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания анти-ANGPTL3 антитела составляет менее чем примерно 5×10^{-8} М.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело против мышинового ANGPTL3 подвергают скринингу на специфическое связывание с человеческим ANGPTL3 с применением некоторых рутинных методов детектирования, например, методов, описанных в настоящей заявке. Способность моноклонального антитела связываться (то есть "перекрестно реагировать") с мышинным и человеческим ANGPTL3 указывает на присутствие одного и того же эпитопа в мышинном и человеческом ANGPTL3. В некоторых вариантах методов детектирования, которые проводят в денатурирующих условиях (например, в вестерн-блот-анализе), способность перекрестно реагировать означает, что мышинное моноклональное антитело связывается с одним и тем же самым "линейным" эпитопом в мышинном и человеческом ANGPTL3. В некоторых вариантах методов детектирования, которые проводят в не денатурирующих условиях, способность перекрестно реагировать означает, что мышинное моноклональное антитело связывается с одним и тем же самым эпитопом (например, с линейным эпитопом или с конформационным эпитопом) в мышинном и человеческом ANGPTL3.

2. Некоторые методы картирования эпитопов

В различных вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается моноклональное антитело, идентифицируют с помощью любого из различных анализов. Некоторые репрезентативные анализы описаны, например, в публикации Morris, *Methods in Molecular Biology*, vol. 66: *Epitope Mapping Protocols* (1996) (Humana Press, Totowa, NJ). Так, например, картирование эпитопов может быть достигнуто с помощью анализов на экспрессию генных фрагментов или анализов с использованием пептидов. В некоторых вариантах анализов на экспрессию генных фрагментов, например, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты ANGPTL3, экспрессируют в прокариотических клетках и выделяют. В некоторых вариантах осуществления способность моноклонального антитела связываться с этими фрагментами затем оценивают, например, посредством иммунопреципитации или иммуноблоттинга. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты ANGPTL3, транскрибируют и транслируют *in vitro* в присутствии радиоактивных аминокислот. Затем радиоактивно меченые фрагменты ANGPTL3 тестируют на связывание с моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления фрагменты ANGPTL3 получают путем протеолитической фрагментации. В некоторых вариантах осуществления эпитоп идентифицируют с использованием библиотек рандомизированных пептидов, представленных на поверхности фага или дрожжей. В некоторых вариантах осуществления эпитоп идентифицируют путем тестирования библиотеки перекрывающихся синтетических пептидных фрагментов ANGPTL3 на связывание с моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления эпитоп идентифицируют с помощью анализа на конкурентное связывание, такого как анализ, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может быть затем определен методом аланин-сканирующего мутагенеза, например, как описано ниже.

3. Некоторые анализы на конкурентное связывание

В некоторых вариантах осуществления идентифицируют моноклональные антитела, которые связываются с тем же самым эпитопом ANGPTL3, с которым связывается представляющее интерес моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления такие моноклональные антитела идентифицируют путем картирования эпитопа, например, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления такие моноклональные антитела идентифицируют с помощью рутинных анализов на конкурентное связывание. См., например, Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). В неограничивающем репрезентативном анализе на конкурентное связывание ANGPTL3 или его фрагмент иммобилизуют на лунках многолуночного планшета. В некоторых вариантах осуществления представляющее интерес моноклональное антитело метят флуоресцентной меткой (в некоторых вариантах флуоресцеинизотиоцианатом) с применением стандартных методов. В некоторых вариантах осуществления в лунки добавляют смеси представляющего интерес меченого моноклонального антитела и немеченого тестируемого моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления флуоресценцию в каждой лунке количественно оценивают для определения уровня блокирования связывания представляющего интерес меченого моноклонального антитела немеченым тестируемым моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела, предположительно, имеют общий эпитоп, если каждое антитело блокирует связывание другого антитела на 50% или более. Репрезентативные анализы на конкурентное связывание также описаны, например, в публикации Morris, *Methods in Molecular Biology* Vol.66: *Epitope Mapping Protocols* (1996) (Humana Press, Totowa, NJ). Неограничивающий репрезентативный анализ на конкурентное связывание описан ниже в части VI.O.

4. Некоторые анализы на идентификацию нейтрализующих антител

В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела скринируют на антитела, которые являются нейтрализующими, то есть снижают активность ANGPTL3 *in vivo* и/или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления активностью ANGPTL3 является способность ANGPTL3 ингибировать ЛПЛ. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело идентифицируют по его способности повышать ЛПЛ-активность в присутствии ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело, по сравнению с контрольным антителом, повышает ЛПЛ-активность по меньшей мере примерно на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95%. Некоторые репрезентативные анализы на определение ЛПЛ-активности *in vivo* и *in vitro* известны специалистам.

В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело, которое снижает активность ANGPTL3 *in vivo*, идентифицируют по его способности снижать уровень по меньшей мере одного липида в сыворотке. Некоторыми репрезентативными сывороточными липидами являются, но не ограничиваются ими, триглицериды, холестерин и свободные жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело по сравнению с контрольным антителом снижает уровень по меньшей мере одного липида в сыворотке по меньшей мере примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95%. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело, которое снижает активность ANGPTL3 *in vivo*, идентифицируют по его способности нейтрализовать некоторые побочные эффекты, обусловленные приемом пищи, содержащей жир, или сообщать толерантность к таким побочным эффектам. Некоторыми репрезентативными побочными эффектами являются, но не ограничиваются ими, увеличение массы тела, ожирение, непереносимость глюкозы (гипергликемия), инсулинорезистентность (гиперинсулинемия), стеатоз печени (жирная печень) и аккумуляция липидов в клетках мышечной ткани.

G. Некоторые фармацевтические композиции и способы лечения с использованием нейтрализующих моноклональных антител

В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело может быть использовано в качестве терапевтического антитела. Некоторыми репрезентативными нейтрализующими антителами, используемыми в качестве терапевтических антител, являются, но не ограничиваются ими, химерные антитела, гуманизированные антитела и человеческие антитела. Применение некоторых антител в качестве терапевтических средств известно специалистам в данной области. Так, например, с середины 1980-х гг. Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA) было разрешено к применению свыше двенадцати антител в качестве терапевтических средств. См., например, Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134; Gura (2002) *Nature* 417: 584-586; Brekke et al. (2002) *Nat. Reviews* 2: 52-62. Некоторыми антителами, применение которых было разрешено FDA, являются антитела, которые могут быть использованы для лечения различных раковых заболеваний, воспалений и вирусных инфекций, а также для предупреждения отторжения трансплантата. См., например, Gura (2002) *Nature* 417: 584-586; Brekke et al. (2002) *Nat. Reviews* 2: 52-62. Кроме того, в настоящее время, клинические испытания проходят свыше двенадцати антител. См., например, Brekke et al. (2002) *Nat. Reviews* 2: 52-62.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения расстройства, ассоциированного с нарушением метаболизма липидов, где указанный способ включает введение эффективного количества нейтрализующего антитела против ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения острого заболевания, ассоциированного с нарушением метаболизма липидов, где указанный способ включает введение эффективного количества нейтрализующего антитела против ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения хронического заболевания, ассоциированного с нарушением метаболизма липидов, где указанный способ включает введение эффективного количества нейтрализующего антитела против ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления способ лечения расстройства, ассоциированного с нарушением метаболизма липидов, также включает введение эффективного количества нейтрализующего антитела против ANGPTL4. См., например, публикацию PCT № WO 2006/074228.

Используемый здесь термин "нарушение метаболизма липидов" включает, но не ограничивается ими, расстройства, которые могут приводить к развитию вторичной гиперлипидемии (включая гипертриглицеридемию и гиперхолестеринемию). Некоторыми репрезентативными расстройствами, ассоциированными с нарушением метаболизма липидов, являются, но не ограничиваются ими, атеросклероз, дислипидемия, гипертриглицеридемия (включая гипертриглицеридемию, индуцированную лекарственными средствами, гипертриглицеридемию, индуцированную диуретиками, гипертриглицеридемию, индуцированную употреблением алкоголя, гипертриглицеридемию, индуцированную действием агента, блокирующего β -адренергические рецепторы, гипертриглицеридемию, индуцированную эстрогенами, гипертриглицеридемию, индуцированную глюкокортикоидами, гипертриглицеридемию, индуцированную ретиноидами, гипертриглицеридемию, индуцированную циметидином, и наследственную гипертриглицеридемию), острый панкреатит, ассоциированный с гипертриглицеридемией, хиломикронный синдром, хиломикронемия, заболевание, ассоциированное с дефицитом Apo-E, заболевание, ассоциированное с дефицитом или с недостаточной активностью ЛПЛ; гиперлипидемия (включая наследственную

комбинированную гиперлипидемию), гиперхолестеринемия, подагра, ассоциированная с гиперхолестеринемией, ксантома (подкожные отложения холестерина), заболевание коронарной артерии (также называемое ишемической болезнью сердца), воспаление, ассоциированное с заболеванием коронарной артерии; рестеноз, заболевания периферических сосудов и инсульт. Некоторыми репрезентативными нарушениями метаболизма липидов являются, но не ограничиваются ими, расстройства, ассоциированные с изменением массы тела, такие как ожирение, метаболический синдром, включая независимые компоненты метаболического синдрома (например, центральное ожирение, заболевание, ассоциированное с изменением содержания сахара в крови натошак/преддиабет/диабет, гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия и гипертензия), гипотиреоз, уремия и другие состояния, ассоциированные с увеличением массы тела (включая быстрое увеличение массы тела), потерей массы тела, длительной потерей массы тела или с риском увеличения массы тела после ее потери. Некоторыми репрезентативными расстройствами, ассоциированными с нарушением метаболизма липидов, являются, но не ограничиваются ими, родственные расстройства, ассоциированные с нарушением уровня сахара в крови, такие как диабет, гипертензия и синдром поликистоза яичника, ассоциированный с инсулинорезистентностью. Некоторыми репрезентативными расстройствами, ассоциированными с нарушением метаболизма липидов, являются, но не ограничиваются ими, заболевание, ассоциированное с трансплантацией почек, нефротический синдром, синдром Кушинга, акромегалия, системная красная волчанка, дисглобулинемия, липодистрофия, гликогеноз типа I и болезнь Аддисона.

Расстройствами, ассоциированными с нарушением метаболизма липидов, являются, но не ограничиваются ими, вторичная гипертриглицеринемия (ГТГ, включая, но не ограничиваясь ею, ГТГ типа I, V и IV), включая, но не ограничиваясь ими, ГТГ, ассоциированная с нарушением питания (включая, но не ограничиваясь ими, заболевание, ассоциированное с чрезмерным употреблением алкоголя) и приемом лекарственных средств (включая, но не ограничиваясь ими, экзогенный эстроген, тамоксифен, ретиноиды, тиазиды, хлорталидон, бета-блокаторы, ингибиторы протеазы (включая, но не ограничиваясь ими, ритонавир), а также вливанием пропופола и парентеральными вливаниями липидов)), расстройства, ассоциированные с нарушением метаболизма (включая, но не ограничиваясь ими, диабет, осложнения при беременности, хроническая почечная недостаточность, гипотиреоз, наследственная гиперлипидемия и панкреатит).

Расстройствами, ассоциированными с нарушением метаболизма липидов, являются, но не ограничиваются ими, нарушения липидного обмена, ассоциированные с нарушением функции сосудов; нарушения липидного обмена, ассоциированные с пролиферативными заболеваниями, включая, но не ограничиваясь ими, новообразования (включая, но не ограничиваясь ими, рак предстательной железы, почек, печени, молочной железы, яичника, легких и поджелудочной железы); расстройства, возникающие в результате воспаления, включая, но не ограничиваясь ими, расстройства, ассоциированные, например, с инфекционными заболеваниями; заболевания, ассоциированные с заживлением ран; синдромы иммунодефицита (СПИД и другие синдромы, включая, но не ограничиваясь ими, синдромы, ассоциированные с нарушением развития организма), образование рубцов, атеросклероз, рестеноз и отторжение трансплантата, аутоиммунные расстройства и хронические воспалительные заболевания и расстройства, которыми являются, но не ограничиваются ими, заболевания, включая, но не ограничиваясь ими, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, и расстройства, включая, но не ограничиваясь ими, болезнь Крона, колит, воспалительное заболевание кишечника, острый артрит, включая болезнь Лайма, инсулинзависимый диабет, специфические аутоиммунные заболевания органов, рассеянный склероз, тиреозит Хашимото и болезнь Грейвса; синдром Сьегрена, контактный дерматит, псориаз, склеродермия, реакция "трансплантат против хозяина", саркоидоз, малярия, сепсис, панкреатит, атопические состояния, включая, но не ограничиваясь ими, астму и аллергию, включая, но не ограничиваясь ими, аллергический ринит, аллергии желудочно-кишечного тракта, включая, но не ограничиваясь ими, пищевые аллергии, эозинофилию, конъюнктивит и гломерулонефрит; расстройства, ассоциированные с нарушением свертывания крови, эндотоксический шок и другие опосредуемые воспалением расстройства, такие как апноэ во сне и бессонница.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения расстройства, ассоциированного с нарушением метаболизма липидов, где указанный способ включает введение эффективного количества антитела против ANGPTL3 и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство вводят в эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является другое антитело против ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является нейтрализующее антитело против ANGPTL4. См., например, публикацию РСТ № WO 2006/074228. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, не являющееся антителом. В некоторых вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является средство, которое снижает уровень одного или нескольких липидов в сыворотке. Некоторыми дополнительными репрезентативными терапевтическими средствами являются, но не ограничиваются ими, ингибиторы синтеза холестерина (статины), такие как ингибиторы HMG-CoA-редуктазы (например, ловастатин, сим-

вастатин, правастатин и флувастатин); секвестранты желчных кислот, такие как холистирамин и другие смолы; ингибиторы секреции липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), такие как ниацин; липофильные антиоксиданты, такие как пробукол; ингибиторы ацил-СоА-холестерин-ацилтрансферазы; антагонисты фарнезоидного рецептора X; активаторы белка, активирующего расщепление регуляторного белка, связывающегося со стиолом (SCAP); ингибиторы белка-переносчика микросомных триглицеридов (МТР) и АроЕ-родственный пептид. В некоторых вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является средство, повышающее уровень липопротеинов высокой плотности (ЛВП). Неограничивающими примерами таких средств являются, но не ограничиваются ими, ингибиторы белка-переносчика холестерилового эфира (СЕТР).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей эффективное количество антитела против ANGPTL3 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, солюбилизатор, эмульгатор, консервант и/или адъювант. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество антитела против ANGPTL3 и эффективное количество по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в комбинации с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адъювантом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство выбирают из описанных выше средств.

В некоторых вариантах осуществления вещества, применяемые для приготовления фармацевтических композиций, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает вещества, которые могут быть использованы для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, чистоты, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости диссоциации или высвобождения, адсорбции или пенетрации данной композиции. В некоторых вариантах осуществления веществами, подходящими для приготовления такой композиции, являются, но не ограничиваются ими, аминокислоты (например, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин и лизин); противомикробные средства; антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, сульфит натрия и бисульфит натрия); буферы (например, борат, бикарбонат, трис-НСl, цитраты, фосфаты и другие органические кислоты); агенты, придающие объем (например, маннит и глицин); хелатообразующие агенты (например, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); агенты, образующие комплексы (например, кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин и гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды, дисахариды и другие углеводы (например, глюкоза, манноза и декстрины); белки (например, сывороточный альбумин, желатин и иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (например, поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (например, натрия); консерванты (например, хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимерозал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота и пероксид водорода); растворители (например, глицерин, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль); спирты ряда сахаров (например, маннит и сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (например, плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты (например, полисорбат 20 и полисорбат 80), тритон, трометамин, лецитин, холестерин и тилоксапал); агенты, повышающие стабильность (например, сахароза и сорбит); агенты, повышающие тоничность (например, галогениды щелочных металлов (например, хлорид натрия или калия), маннит и сорбит); носители для доставки; разбавители; наполнители; и фармацевтические адъюванты. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).

В некоторых вариантах осуществления антитело против ANGPTL3 или другая терапевтическая молекула связаны с носителем, увеличивающим время полужизни таких молекул. Некоторые репрезентативные носители, увеличивающие время полужизни таких молекул, известны специалистам. Некоторыми такими носителями являются, но не ограничиваются ими, Fc-домен, полиэтиленгликоль и декстран. Некоторые такие носители описаны, например, в опубликованной заявке РСТ № WO 99/25044.

В некоторых вариантах осуществления оптимальная фармацевтическая композиция может быть получена самим специалистом в данной области в зависимости, например, от нужного способа введения, формы доставки и желаемой дозы. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, см. выше. В некоторых вариантах осуществления такие композиции могут оказывать влияние на физическое состояние, стабильность, скорость *in vivo* высвобождения или скорость *in vivo* клиренса нейтрализующего антитела.

В некоторых вариантах осуществления основной наполнитель или носитель в фармацевтической композиции, по своей природе, может быть водным или безводным. Так, например, в некоторых вариантах осуществления подходящими наполнителями или носителями могут быть вода для инъекции, физиологический раствор или искусственная цереброспинальная жидкость, в которые могут быть добавлены другие вещества, обычно используемые в композиции для парентерального введения. Некоторыми репрезентативными носителями являются, но не ограничиваются ими, нейтрально забуференный физиологический раствор и физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат трис-буфер с pH примерно 7,0-8,5

или ацетатный буфер с рН примерно 4,0-5,5, которые могут также включать сорбит или его подходящий заменитель. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая антитело против ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, может быть получена для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей нужную степень чистоты, с необязательными технологическими добавками (Remington's Pharmaceutical Sciences, см. выше), в форме лиофилизованного осадка или водного раствора. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая антитело против ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, может быть приготовлена в виде лиофилизата с использованием соответствующих наполнителей, таких как сахароза.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию выбирают для парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию выбирают для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, для перорального введения. Некоторые репрезентативные методы получения фармацевтически приемлемых композиций известны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления компоненты композиции присутствуют в концентрациях, которые являются подходящими для данного участка введения. В некоторых вариантах осуществления для поддержания композиции при физиологическом рН или при несколько более низких рН, обычно при рН в пределах примерно от 5 до 8, используются буферы.

В некоторых вариантах осуществления, в которых рассматривается парентеральное введение, фармацевтическая композиция может быть получена в форме апиrogenного парентерально приемлемого водного раствора, содержащего нужное антитело против ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие дополнительных терапевтических средств, в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления носителем для парентерального введения является стерильная дистиллированная вода, в которой антитело против ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, получают в виде соответствующим образом консервированного стерильного изотонического раствора. В некоторых вариантах осуществления препарат может включать композицию нужной молекулы с агентом, таким как микросферы для инъекций, биологически разлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), сферы или липосомы, которые могут быть приготовлены для регулируемого или пролонгированного высвобождения продукта, который затем может быть доставлен с помощью депо-инъекции. В некоторых вариантах осуществления может быть также использована гиалуриновая кислота, которая может увеличивать время пребывания препарата в кровотоке. В некоторых вариантах осуществления для введения нужной молекулы могут быть использованы имплантируемые устройства, содержащие лекарственное средство для доставки.

В некоторых вариантах осуществления может быть приготовлена фармацевтическая композиция, предназначенная для введения путем ингаляции. В некоторых вариантах осуществления антитело против ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, может быть приготовлено в виде сухого порошка для ингаляции. В некоторых вариантах осуществления раствор для ингаляции, содержащий антитело против ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, может быть приготовлен вместе с пропеллентом для доставки в виде аэрозоля. В некоторых вариантах осуществления растворы могут быть введены путем распыления.

В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат может быть введен перорально. В некоторых вариантах осуществления антитело ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, подходящего для введения таким способом, может быть приготовлено в виде смеси с носителями, либо в отсутствие носителей, обычно используемых для приготовления твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы. В некоторых вариантах осуществления капсулы могут быть предназначены для высвобождения активной части композиции в область желудочно-кишечного тракта в условиях максимизации ее биологической доступности и минимизации пресистемной деградаци. В некоторых вариантах осуществления, для облегчения абсорбции антитела против ANGPTL3 в присутствии или в отсутствие дополнительных терапевтических средств, может быть включено по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления могут быть также использованы разбавители, ароматизаторы, низкоплавкие воски, растительные масла, замасливатели, суспендирующие агенты, дезинтеграторы для таблеток и/или связующие агенты.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает эффективное количество антитела против ANGPTL3, в сочетании по меньшей мере с одним терапевтическим средством, или в его отсутствие, а также в смеси с нетоксичными носителями, подходящими для изготовления таблеток. В некоторых вариантах осуществления растворы в виде унифицированной лекарственной формы могут быть приготовлены путем растворения таблеток в стерильной воде или в другом подходящем носителе. Некоторыми репрезентативными примерами наполнителей являются, но не ограничиваются ими, инертные разбавители (например, карбонат кальция, карбонат натрия, бикарбонат натрия, лактоза и фос-

фат кальция); связующие вещества (например, крахмал, желатин и аравийская камедь) и замасливающие агенты (например, стеарат магния, стеариновая кислота и тальк).

Для специалиста в данной области очевидно, что могут быть приготовлены и другие фармацевтические композиции, включая препараты, содержащие антитело против ANGPTL3, в сочетании по меньшей мере с одним дополнительным фармацевтическим средством, или в его отсутствие, в виде препаратов с пролонгированным или регулируемым высвобождением. Некоторыми репрезентативными препаратами с пролонгированным или регулируемым высвобождением являются, но не ограничиваются ими, липосомные носители, биологически разлагаемые микрочастицы, пористые сферы и депо-инъекции. Некоторые репрезентативные методы получения некоторых композиций известны специалистам. В некоторых вариантах осуществления препаратами с пролонгированным высвобождением могут быть полупроницаемые полимерные матрицы в форме сформованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Некоторыми репрезентативными матрицами пролонгированного высвобождения являются, но не ограничиваются ими, полиэфиры, гидрогели, полилактиды (см., например, патент США № 3773919 и EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (см., например, Sidman et al. (1983) *Biopolymers* 22:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (см., например, Langer et al. (1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 и Langer (1982) *Chem. Tech.* 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., см. выше) и поли-D(-)-3-гидроксимасляная кислота (EP 133988). В некоторых вариантах осуществления композиции пролонгированного высвобождения могут включать липосомы, которые в некоторых вариантах осуществления могут быть получены любыми из некоторых методов, известных специалистам. См., например, Eppstein et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692; EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, которая может быть использована для *in vivo* введения, обычно является стерильной. В некоторых вариантах осуществления такая стерильность может быть достигнута путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. В некоторых вариантах осуществления, в том случае, если указанная композиция является лиофилизованной, стерилизация с применением этого метода может быть проведена либо до, либо после лиофилизации и разведения. В некоторых вариантах осуществления композиция для парентерального введения может храниться в лиофилизованной форме или в виде раствора. В некоторых вариантах осуществления композиции для парентерального введения обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, в пакет или флакон с раствором для внутривенного введения, имеющий крышку, протыкаемую иглой для подкожных инъекций.

В некоторых вариантах осуществления после приготовления фармацевтической композиции она может храниться в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или дегидратированного или лиофилизованного порошка. В некоторых вариантах осуществления такие композиции могут храниться либо в готовой форме, либо в форме (например, лиофилизованной), которую разводят перед введением.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к наборам для приготовления унифицированной разовой дозы лекарственной формы. В некоторых вариантах осуществления каждый набор может содержать первый контейнер, включающий осушенный белок, и второй контейнер, включающий водную композицию. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает наборы, содержащие однокамерные или многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы, заполненные жидкостью, и шприцы, заполненные лиофилизатом).

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции, которая может быть применена в терапии и которая содержит антитело против ANGPTL3 в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, зависит, например, от условий и целей лечения. Для специалиста в данной области очевидно, что соответствующие дозы, используемые для лечения в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, могут варьироваться в зависимости, частично, от доставляемой молекулы, показаний, для которых используется антитело против ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, способа введения и комплекции пациента (массы тела, поверхности организма или размера органа) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. В некоторых вариантах осуществления для достижения оптимального терапевтического эффекта, врач-клиницист может подобрать нужную дозу и изменить способ введения. В некоторых вариантах осуществления типичная доза, в зависимости от вышеупомянутых факторов, может составлять от примерно 0, 1 мг/кг массы тела пациента до примерно 100 мг/кг или более. В некоторых вариантах осуществления доза может составлять от 0,1 до примерно 100 мг/кг, от 1 до примерно 100 мг/кг или от 5 до примерно 100 мг/кг, включая все численные значения (включая дроби) в любых вышеупомянутых интервалах. В некоторых вариантах осуществления доза составляет от примерно 10 до примерно 60 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления доза составляет примерно 10 мг/кг массы тела, примерно 20 мг/кг массы тела, примерно 30 мг/кг массы тела, примерно 40 мг/кг массы тела, примерно 50 мг/кг массы тела или примерно 60 мг/кг массы тела.

В некоторых вариантах осуществления дозу нейтрализующего антитела против ANGPTL3 для человека определяют с учетом эффективной дозы того же самого антитела для мышей. В некоторых вари-

антах осуществления дозу нейтрализующего антитела против ANGPTL3 для человека определяют, как описано в руководстве "Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers" U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, and Center for Drug Evaluation and Research (CDER), July 2005 (Pharmacology and Toxicology). В некоторых вариантах осуществления доза нейтрализующего антитела против ANGPTL3 для человека составляет от 0,07 г до 7 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза нейтрализующего антитела против ANGPTL3 для человека составляет от 0,1 до 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза нейтрализующего антитела против ANGPTL3 для человека составляет от 0,1 мг/кг до 2 мг/кг. В различных вариантах осуществления нейтрализующее антитело против ANGPTL3 вводят пациенту два раза в неделю, один раз в неделю, один раз через каждые две недели или один раз в месяц.

В некоторых вариантах осуществления подходящая доза может быть определена самим специалистом, например, на основе информации, полученной в исследованиях на животных.

В некоторых вариантах осуществления частота введения доз зависит от фармакокинетических параметров антитела против ANGPTL3 и от любых других дополнительных терапевтических средств, если они присутствуют в данном препарате. В некоторых вариантах осуществления врач-клиницист может вводить композицию до тех пор, пока введение данной дозы не будет приводить к достижению нужного эффекта. Поэтому, в некоторых вариантах осуществления, композиция может быть введена в виде разовой дозы, либо в виде двух или более доз (которые могут содержать, а могут и не содержать одинаковое количество нужной молекулы) в течение определенного периода времени, либо в виде непрерывного вливания с помощью устройства для имплантации или катетера. В некоторых вариантах осуществления дополнительная коррекция соответствующей дозы может быть осуществлена рутинным способом самим специалистом в данной области и находиться в пределах его компетенции. В некоторых вариантах осуществления соответствующие дозы могут быть определены на основе соответствующих данных зависимости "доза-ответ". В некоторых вариантах осуществления пациент получает одну дозу фармацевтической композиции, содержащей антитело против ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления пациент получает фармацевтическую композицию, содержащую антитело против ANGPTL3, в виде одной, двух, трех или четырех доз в день. В некоторых вариантах осуществления пациент получает фармацевтическую композицию, содержащую антитело против ANGPTL3, в виде одной, двух, трех, четырех, пяти или шести доз в неделю. В некоторых вариантах осуществления пациент получает фармацевтическую композицию, содержащую антитело против ANGPTL3, в виде одной или двух доз в месяц.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в соответствии с известными методами, например перорально, путем внутривенной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, интрацеребральной инъекции (вовнутрь паренхимы), интрацеребровентрикулярной инъекции, внутримышечной инъекции, внутриглазной инъекции, интраартериальной инъекции, инъекции в воротную вену или инъекции в участок поражения, с использованием систем пролонгированного высвобождения или устройств для имплантации. В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть введены путем инъекции ударной дозы или непрерывно путем вливания, или с помощью устройства для имплантации.

В некоторых вариантах осуществления композиция может быть введена местно путем имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, на котором абсорбирована или в котором инкапсулирована нужная молекула. В некоторых вариантах осуществления, в которых используется устройство для имплантации, такое устройство может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, и доставка нужной молекулы может быть осуществлена путем диффузии, введения ударной дозы с пролонгированным высвобождением или непрерывного введения.

В некоторых вариантах осуществления может оказаться желательным использование фармацевтической композиции, содержащей антитело против ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства *ex vivo*. В некоторых таких случаях клетки, ткани и/или органы, взятые у пациента, обрабатывают фармацевтической композицией, содержащей антитело против ANGPTL3, в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, после чего клетки, ткани и/или органы имплантируют обратно пациенту.

В некоторых вариантах осуществления антитело против ANGPTL3 в присутствии или в отсутствие по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства доставляют путем имплантации некоторых клеток, которые были генетически сконструированы с применением таких методов, как методы, описанные в настоящей заявке, для экспрессии и секреции полипептидов. В некоторых вариантах осуществления такими клетками могут быть клетки животного или человека, и такие клетки могут быть аутологичными, гетерологичными или ксеногенными. В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть иммортализованными. В некоторых вариантах осуществления, для уменьшения вероятности иммунного ответа, клетки могут быть инкапсулированы в целях предотвращения их инфильтрации в окружающие ткани. В некоторых вариантах осуществления материалы для инкапсуляции обычно являются биосовместимыми, полупроницаемыми полимерными оболочками или мембранами, что позволяет высвобождать белковый(ые) продукт(ы) и при этом предотвращать деструкцию клеток под действием иммунной системы пациента или других вредных факторов действия окружающих тканей.

Н. Некоторые способы детектирования и диагностики

В некоторых вариантах осуществления антитела против ANGPTL3 используют для обнаружения присутствия ANGPTL3 *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления уровень ANGPTL3 *in vivo* коррелирует с патологическим состоянием пациента, таким как нарушение липидного метаболизма, что позволяет диагностировать указанное состояние у данного пациента. Некоторые репрезентативные патологические состояния, которые могут быть диагностированы с использованием антитела против ANGPTL3, указаны выше.

Некоторые репрезентативные методы детектирования известны специалистам, и такими методами являются, но не ограничиваются ими, ELISA, радиоиммуноанализ, иммуноблоттинг, вестерн-блот-анализ, иммунофлуоресцентный анализ и иммунопреципитация. В некоторых вариантах осуществления антитела против ANGPTL3 являются модифицированными так, что в результате этого они могут быть непосредственно детектированы, например, путем присоединения метки к данному антителу. Некоторые репрезентативными метками являются, но не ограничиваются ими, флуорофоры, хромофоры, радиоактивные атомы, электронноплотные реагенты, ферменты и лиганды. В некоторых вариантах осуществления антитела против ANGPTL3 детектируют с использованием меченого "второго" антитела, которое связывается с антителами определенного класса (например, с козым антимышинным антителом).

I. Некоторые методы скрининга на антагонисты и агонисты ANGPTL3

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу скрининга агента, который связывается с ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления способ скрининга включает обработку ANGPTL3 одним или несколькими агентами-кандидатами в подходящих условиях и оценку связывания ANGPTL3 с одним или несколькими агентами-кандидатами. В некоторых вариантах осуществления способ скрининга включает использование антитела против ANGPTL3 в анализе на конкурентное связывание. В некоторых вариантах осуществления используют первую связывающую смесь, содержащую антитело против ANGPTL3 и ANGPTL3. Затем измеряют уровень связывания ANGPTL3 с указанным антителом в первой связывающей смеси (M_0). Также используют вторую связывающую смесь, содержащую антитело, ANGPTL3 и скринируемый агент. Затем измеряют уровень связывания ANGPTL3 с антителом во второй связывающей смеси (M_1). Уровень связывания в первой связывающей смеси сравнивают с уровнем связывания во второй связывающей смеси, например, путем вычисления отношения M_1/M_0 . Считается, что агент обладает способностью связываться с ANGPTL3, если уровень связывания антитела с ANGPTL3 во второй связывающей смеси меньше, чем уровень связывания антитела с ANGPTL3 в первой связывающей смеси. В некоторых вариантах осуществления агент, который связывается с ANGPTL3, вызывает снижение уровня связывания антитела с ANGPTL3 по меньшей мере примерно на 10% (то есть $M_1/M_0 < 0,9$), по меньшей мере примерно на 30% (то есть $M_1/M_0 < 0,7$), по меньшей мере примерно на 50% (то есть $M_1/M_0 < 0,5$), по меньшей мере примерно на 70% (то есть $M_1/M_0 < 0,3$), по меньшей мере примерно на 80% (то есть $M_1/M_0 < 0,2$), по меньшей мере примерно на 90% (то есть $M_1/M_0 < 0,1$) или по меньшей мере примерно на 95% (то есть $M_1/M_0 < 0,05$).

В некоторых вариантах осуществления ANGPTL3, используемый в любом из способов скрининга, описанных выше, представляет собой N-концевой суперспирализованный домен ANGPTL3 или его фрагмент. На основании наблюдений заявителей, из которых следует то, что некоторые антитела, связывающиеся в N-концевом суперспирализованном домене ANGPTL3, могут снижать уровни триглицеридов и холестерина в сыворотке *in vivo*, можно сделать вывод, что агент (например, антитело или агент, не являющийся антителом), идентифицированный в способе скрининга как агент, связывающийся с N-концевым суперспирализованным доменом ANGPTL3, является кандидатом-антагонистом активности ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления агент (например, антитело или агент, не являющийся антителом), идентифицированный в способе скрининга как агент, связывающийся с областью SP1 в N-концевом суперспирализованном домене ANGPTL3, является кандидатом-антагонистом активности ANGPTL3.

В некоторых вариантах осуществления антагонистическая активность подтверждается тем, что антагонист-кандидат нейтрализует активность ANGPTL3 в анализе *in vivo* или *in vitro*. Некоторые репрезентативные анализы описаны в настоящей заявке. Специалист в данной области может выбрать и/или адаптировать соответствующий анализ из числа описанных здесь и/или известных анализов. В некоторых вариантах осуществления антагонисты ANGPTL3 используются для лечения расстройств, ассоциированных с нарушением метаболизма липидов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам скрининга агентов, которые связываются с фибриногеновым доменом ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления агент, который связывается с фибриногеновым доменом ANGPTL3, может повышать активность ANGPTL3. Таким образом, агент (например, антитело или агент, не являющийся антителом), идентифицированный в способе скрининга как агент, связывающийся с фибриногеновым доменом ANGPTL3, является кандидатом-агонистом активности ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления агонистическая активность подтверждается тем, что агонист-кандидат повышает активность ANGPTL3 в анализе *in vitro* или *in vivo*. Некоторые репрезентативные анализы описаны в настоящей заявке. Специалист в дан-

ной области может выбрать и/или адаптировать соответствующий анализ из числа известных анализов или анализов, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления агонист ANGPTL3 используют для лечения некоторых расстройств, ассоциированных с избыточной потерей массы, таких как нервная анорексия, нервная булимия и кахексия (истощение), ассоциированные с такими заболеваниями, как рак, кистозный фиброз и СПИД.

Некоторыми репрезентативными агентами, которые могут быть скринированы на связывание с ANGPTL3, являются, но не ограничиваются ими, антитела, небольшие молекулы (например, органические соединения, металлоорганические соединения, соли органических и металлоорганических соединений, сахараиды, аминокислоты, нуклеозиды и нуклеотиды), аптамеры, пептиды и пептидомиметики. Некоторыми репрезентативными пептидами являются растворимые пептиды, которые включают, но не ограничиваются ими, члены рандомизированных пептидных библиотек (см., например, Lam et al. (1991) *Nature* 354:82-84; Houghten et al. (1991) *Nature* 354:84-86) и члены комбинаторных библиотек химических молекул, состоящих из аминокислот с D- и/или L-конфигурацией; и фосфопептиды, которыми являются, но не ограничиваются ими, члены рандомизированных или частично расщепленных упорядоченных фосфопептидных библиотек (см., например, Songyang (1993) *Cell* 72:767-778).

В некоторых вариантах осуществления технологии компьютерного моделирования и поиска позволяют идентифицировать соединения или модифицировать уже идентифицированные соединения, которые связываются с ANGPTL3. Некоторыми репрезентативными системами молекулярного моделирования являются, но не ограничиваются ими, программы CHARMM и QUANTA (Polygen Corporation, Waltham, MA). Программа CHARMM позволяет осуществлять минимизацию энергии и определять динамику молекул. Программа QUANTA позволяет осуществлять конструирование, графическое моделирование и анализ молекулярной структуры. QUANTA позволяет осуществлять интерактивное конструирование, модификацию, визуализацию и анализ взаимодействия молекул друг с другом.

J. Нуклеиновые кислоты-антагонисты ANGPTL3

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая снижает уровень экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ANGPTL3, кодирует мышинный ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ANGPTL3, кодирует человеческий ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления выделенной нуклеиновой кислотой является антисмысловая нуклеиновая кислота. В некоторых таких вариантах антисмысловой нуклеиновой кислотой является одноцепочечная молекула ДНК, которая стимулирует расщепление мРНК-мишени по механизму, действующему на основе РНКазы Н. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой нуклеиновой кислотой является олигонуклеотид длиной примерно 8-30 нуклеотидов (включая все численные значения между граничными значениями данного интервала). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой нуклеиновой кислотой является олигонуклеотид длиной примерно 18-26 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления термин "антисмысловая нуклеиновая кислота" охватывает молекулу РНК, которая снижает уровень экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени по механизму интерференции РНК (РНКи). Некоторыми репрезентативными молекулами РНК, подходящими для их использования в РНКи, являются, но не ограничиваются ими, короткие интерферирующие РНК (киРНК), микро-РНК (миРНК), небольшие некодирующие РНК (ннРНК) и небольшая модулирующая РНК (нмРНК). Описание некоторых репрезентативных механизмов РНКи и молекул РНК, используемых в РНКи, можно найти, например, в публикации Novina et al. (2004) *Nature* 430: 161-164.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к киРНК, которая снижает уровень экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления киРНК представляет собой олигонуклеотид длиной примерно 18-26 нуклеотидов (включая все величины длин нуклеотидов между граничными значениями данного интервала). В некоторых вариантах осуществления киРНК представляет собой олигонуклеотид длиной примерно 20-24 нуклеотида или олигонуклеотид длиной примерно 21-23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления киРНК представляет собой двухцепочечную РНК. В некоторых вариантах осуществления киРНК индуцирует расщепление молекулы мРНК-мишени, комплементарной антисмысловой цепи киРНК. См., например, Novina et al. (2004) *Nature* 430: 161-164.

На активность антисмысловой нуклеиновой кислоты, такой как антисмысловая молекула ДНК или киРНК, часто влияет вторичная структура мРНК-мишени. См., например, Vickers et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:7108-7118. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антисмысловую нуклеиновую кислоту выбирают так, чтобы она была комплементарна области мРНК-мишени, которая является доступной для спаривания оснований. В некоторых вариантах осуществления подходящую область мРНК-мишени идентифицируют путем осуществления скрининга методом "прогулки по геному", например, путем эмпирического тестирования ряда антисмысловых олигонуклеотидов на их способность гибридизоваться с различными областями мРНК-мишени и/или снижать уровень экспрессии мРНК-мишени. См., например, Vickers et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:7108-7118; Hill et al. (1999) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21: 728-737. В некоторых вариантах осуществления подходящую область мРНК-мишени

идентифицируют с использованием компьютерной программы или родственного алгоритма предсказания вторичной структуры мРНК в целях обнаружения областей мРНК-мишени, которые не гибридизуются с любыми другими областями мРНК-мишени. См., например, Hill et al. (1999) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21: 728-737. В некоторых вариантах осуществления для идентификации подходящей области мРНК-мишени используют комбинацию обоих вышеупомянутых методов. См., например, Hill et al. (1999) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21: 728-737.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу снижения активности ANGPTL3 путем снижения уровня экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает снижение уровня экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей ANGPTL3, в клетках *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает введение антисмысловой нуклеиновой кислоты, снижающей уровень экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей ANGPTL3, в клетку *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ANGPTL3, кодирует человеческий ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ANGPTL3, кодирует мышинный ANGPTL3.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения расстройства, ассоциированного с нарушением метаболизма липидов, например, любого из расстройств, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает введение пациенту эффективного количества антисмысловой нуклеиновой кислоты, снижающей экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловую нуклеиновую кислоту доставляют в орган, в котором экспрессируется нуклеиновая кислота, кодирующая ANGPTL3.

ANGPTL3 экспрессируется, главным образом, в печени. Oike Y. et al. (2005) *TRENDS Mol. Med.* 11(10):473-479. У мышей кратковременное голодание, очевидно, не влияет на экспрессию. Oike Y. et al. (2005) *TRENDS Mol. Med.* 11 (10):473-479. Однако, после кормления мышей кормом, содержащим холестерин, уровень экспрессии повышается, и этот уровень также повышается у некоторых мышей с моделью ожирения и диабета (например, у db/db- и ob/ob-мышей) и мышей с диабетом типа I, индуцированным стрептозотоцином, что дает основание предположить, что ANGPTL3 может участвовать в развитии дислипидемии при диабете и метаболическом синдроме. Oike Y. et al. (2005) *TRENDS Mol. Med.* 11 (10):473-379. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антисмысловую нуклеиновую кислоту доставляют в печень. Некоторые репрезентативные методы *in vivo* введения антисмысловых нуклеиновых кислот и пролонгированной доставки антисмысловых нуклеиновых кислот *in vivo*, включая пролонгированную доставку в конкретные органы, такие как печень, описаны, например, в публикации Khan et al. (2004) *J. Drug Targeting* 12:393-404. В некоторых вариантах осуществления пролонгированная доставка достигается путем введения антисмысловой нуклеиновой кислоты, которая инкапсулирована в биологически разлагаемом полимере или содержится в этом полимере в какой-либо другой форме. Так, например, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая нуклеиновая кислота может содержаться в микросферах из полигликолевой кислоты (PLGA) (например, 0,5-20 мкм; MW=3000). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нуклеиновая кислота конъюгирована с липофильной молекулой. См. Khan et al. (2004) *J. Drug Targeting* 12: 393-404.

VI. Примеры

A. Содержание мышей и исследования режимов питания

Исследования, проводимые на мышах, осуществляли в соответствии с нормами, установленными Федеральными регуляторными органами. Мыши содержались при 24°C с постоянным циклом смены дня и ночи: 12 ч-день/12 ч-ночь, и имели свободный доступ к воде и корму для грызунов (калорийность -22% жира) (продукт № 5021; Purina, St. Louis, MO), как указано ниже. Мыши, называемые ниже "мышами, которые содержались в условиях голодания", не получали корма в течение 16 ч.

В. *In vivo* сверхэкспрессия человеческого ANGPTL3 у мышей кДНК, кодирующую полноразмерный человеческий ANGPTL3 (SEQ ID NO: 6), встраивали в Ad E1-делетированную область аденовирусного вектора pFAD, в результате чего кДНК находилась под контролем промотора цитомегаловируса. См. Hitt et al., "Construction and propagation of human adenovirus vectors", in *Cell Biology: A Laboratory Handbook Vol. 1*, pp. 500-512 (J. E. Celis, ed., 2nd ed. 1998). Полученную конструкцию, Ad5-hAngptl3T, использовали для инфицирования клеток CHO. "Пустой" вирус Ad5 также использовали для инфицирования клеток CHO в качестве контроля. Экспрессию человеческого ANGPTL3 подтверждали с помощью Вестерн-блот-анализа инфицированных экстрактов из клеток CHO.

Ad5-hAngptl3T инъецировали мышам C57BL/6J в хвостовую вену в следующих дозах: 2×10^9 в.б. (вирусных бляшек), 1×10^9 в.б., 5×10^8 в.б., 2×10^8 в.б. "Пустой" вектор Ad5 инъецировали мышам C57BL/6J в хвостовую вену в дозе 2×10^9 вирусных бляшек (в.б.) в качестве контроля. Каждая группа включала пять мышей. Через четыре дня у мышей, инфицированных аденовирусом, брали пробы крови, и в течение этого времени мышам обычно давали корм (то есть мыши не содержались в условиях голодания). Уровни триглицеридов в сыворотке измеряли с помощью устройства Cobas Integra 500 (Roche, Basel, Switzerland).

Результаты представлены на фиг. 8. В этом эксперименте у мышей, инфицированных 2×10^9 в.б. или 1×10^9 в.б. Ad5-hAngptl3T, уровни триглицеридов в сыворотке были значительно выше, чем у мышей, инфицированных "пустым" вектором Ad5, используемым в качестве контроля.

С. Получение и очистка мышиноного и человеческого ANGPTL3

Для экспрессии рекомбинантного мышиноного ANGPTL3 клетки CHO инфицировали $1,5 \times 10^{11}$ в.б. рекомбинантного аденовируса Ad5-mAngptlT. Ad5-mAngptlT экспрессирует мышинный ANGPTL3 с His₆-меткой у С-конца (между ANGPTL3 и His₆-меткой находится глициновый остаток), обозначаемый mANGPTL3T (SEQ ID NO: 2). Через 16-24 ч среду заменяли бессывороточной средой (средой EX-CELL 325-PF CHO, 14335, JRH, Lenexa, KS). После этого кондиционированную среду собирали, а затем в течение всех 5 процедур сбора через каждые 24-36 ч указанную среду заменяли свежей бессывороточной средой.

Кондиционированную среду (1 л) загружали в 10-12-миллилитровую колонку со смолой, образующей хелатный комплекс с никелем (R801-Q1, Invitrogen, Carlsbad, CA). Колонку промывали 5 колоночными объемами буфера для промывки (10 мМ имидазола, 20 мМ трис, pH 7,8, 500 мМ NaCl). Связанный mANGPTL3T элюировали элюирующим буфером (500 мМ имидазол, 20 мМ трис, pH 7,8, 500 мМ NaCl) и собирали в 1,5-мл фракции. Присутствие mANGPTL3T в собранных фракциях определяли с помощью вестерн-блот-анализа и простого окрашивания синим красителем. Фракции, содержащие mANGPTL3T, объединяли, разделяли на аликвоты и замораживали при -70°C .

Для экспрессии рекомбинантного человеческого ANGPTL3 клетки CHO инфицировали $1,5 \times 10^{11}$ в.б. рекомбинантного аденовируса Ad5-hAngptlT. Ad5-hAngptlT экспрессирует человеческий ANGPTL3 с His₆-меткой у С-конца (между ANGPTL3 и His₆-меткой находится глициновый остаток), обозначаемый hANGPTL3T (SEQ ID NO: 4). hANGPTL3T экспрессировали и очищали, как описано выше для mANGPTL3T.

Д. Получение и очистка rN'-mANGPTL3T и rN'-hANGPTL3T

Полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоты 17-240 мышиноного ANGPTL3, клонировали в экспрессионный вектор pET22b(+) (Novagen). Этот вектор кодирует N-концевую лидерную последовательность pelB, а также С-концевую His-метку. Полученный экспрессионный вектор называется pET-N'-mANGPTL3T. После трансляции белка и удаления всех аминокислот, за исключением 11 аминокислот последовательности pelB, N'-mANGPTL3T имела последовательность, показанную в SEQ ID NO:7.

Эта последовательность содержит 11 аминокислот последовательности pelB, за которыми следуют аминокислоты 17-240 мышиноного ANGPTL3 (подчеркнуты в табл. 7), а за ними находится линкер из 2 аминокислот и His₆-метка.

Аналогичным образом, полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоты 20-243 человеческого ANGPTL3, клонировали в экспрессионный вектор pET22b(+) (Novagen). Этот вектор кодирует N-концевую лидерную последовательность pelB, а также С-концевую His-метку. Полученный экспрессионный вектор был обозначен pET-N'-hANGPTL3T. После трансляции белка и удаления всех аминокислот, за исключением 11 аминокислот последовательности pelB, N'-hANGPTL3T имел последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. Эта последовательность содержит 11 аминокислот последовательности pelB, за которыми следуют аминокислоты 20-243 мышиноного ANGPTL3 (подчеркнуты в табл. 7), а за ними находится линкер из 2 аминокислот и His₆-метка.

N'-mANGPTL3T или N'-hANGPTL3T были экспрессированы и очищены из E.coli следующим образом. 10 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл хлорамфеникола и 100 мкг/мл карбенициллина, инокулировали одной pET-N'-mANGPTL3T-трансформированной колонией E.coli. Эту культуру инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем 10 мл культуры переносили в 500 мл среды LB, не содержащей антибиотиков, и инкубировали при 37°C до тех пор, пока OD₆₀₀ не достигала 0,6 (примерно в течение 2 ч). Затем добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ, и культуру инкубировали со встряхиванием при 200 об/мин и при 30°C в течение 4 ч. После этого культуру помещали на 5 мин на лед. Клетки осаждали путем центрифугирования при 8000 об/мин на роторе JLA/6.25 в течение 15 мин. Затем клеточный осадок ресуспендировали в 50 мл буфера для лизиса (50 мМ трис, pH 7,5, 0,5 М NaCl, 1% тритон X-100, 1× смеси ингибиторов протеазы (Roche) и 0,25 мл PMSF (0,1 М в изопропанол)). Затем лизированные клетки центрифугировали при 9700 об./мин на роторе JA25.5 в течение 30 мин. Супернатант удаляли, а затем осветляли путем центрифугирования при 28000 об/мин на роторной установке SW28 в течение 30 мин. После этого рекомбинантные N'-mANGPTL3T или N'-hANGPTL3T могут быть выделены из осветленного супернатанта с помощью хроматографии на Probond (Ni) (Invitrogen).

Для выделения рекомбинантного N'-mANGPTL3T или N'-hANGPTL3T из нерастворимого осадка, оставшегося после центрифугирования лизированных клеток, осадок промывали 30 мл буфера для лизиса и центрифугировали при 9700 об./мин на роторе JA25.5. Стадию промывки повторяли два раза, а всего проводили три промывки. Затем нерастворимый белок, присутствующий в осадке, растворяли в 10 мл денатурирующего буфера (50 мМ трис, pH 8,0, 6 М гуанидин-HCl). После этого раствор центрифугировали на роторе JA25.5 при 28000 об./мин в течение 30 мин. Затем супернатант загружали на колонку с 5

мл смолы Probond. Эту колонку промывали 50 мл промывочного буфера (50 мМ трис, pH 8,0, 1 М NaCl, 8 М мочевины, 15 мМ имидазола). Рекombинантный белок подвергали рефолдингу на колонке в градиенте 50 мл промывочного буфера → ренатурирующего буфера (50 мМ трис, pH 8,0, 1 М NaCl, 0,5% Твин 20). Затем рекombинантный белок элюировали элюирующим буфером (ренатурирующим буфером, содержащим 250 мМ имидазола). Фракции, содержащие рекombинантный белок, собирали и диализовали против буфера для хранения (50 мМ трис, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 0,2% Твин 20). Очищенный N'-mANGPTL3T или N'-hANGPTL3T разделяли на аликвоты и хранили при -70°C.

Е. Получение и очистка SP1 и SP2-KLH

Очищенный SP1 (SEQ ID NO: 9 и 10) and SP2-KLH (SEQ ID NO: 62) закупали у фирмы Sigma Genosys (The Woodlands, Texas). Последовательности области SP1 ANGPTL3 мыши и человека являются одинаковыми. SP2-KLH получали путем присоединения цистеина к COOH-концу SP1, а затем конъюгирования гемодианина лимфы улитки с пептидом посредством цистеина стандартными методами, известными специалистам.

Ф. Продукция моноклональных антител против ANGPTL3 у Angptl3-дефицитных мышей

Моноклональные антитела, которые перекрестно реагируют с человеческим и мышиным ANGPTL3, были продуцированы у Angptl3-дефицитных мышей трех групп из 5-8 мышей, каждой из которых вводили различные серии инъекций антигена. Животных группы 1 примировали mANGPTL3T (SEQ ID NO: 2), продуцированным и очищенным как описано выше. Животным группы 1 также вводили четыре ударных дозы mANGPTL3T. Перед сбором лимфоидной ткани вводили последнюю ударную дозу mANGPTL3T. Животных группы 2 примировали rN'-hANGPTL3T (SEQ ID NO: 8), продуцированным и очищенным как описано выше. Животным группы 2 вводили одну ударную дозу rN'-mANGPTL3T (SEQ ID NO: 7), продуцированного и очищенного как описано выше, а затем три раза вводили mANGPTL3T (SEQ ID NO: 2). Перед сбором лимфоидной ткани вводили последнюю ударную дозу hANGPTL3T (SEQ ID NO: 4). Животных группы 3 примировали hANGPTL3T (SEQ ID NO: 4), продуцированным и очищенным как описано выше, а затем вводили одну ударную дозу hANGPTL3T, после чего вводили две ударные дозы синтетического пептида SP2-KLH (SEQ ID NO: 62), продуцированного и очищенного как описано выше. Перед сбором лимфоидной ткани двум животным группы 3 с высоким титром вводили последнюю ударную дозу SP2-KLH (SEQ ID NO: 62). Остальным животным группы 3 (называемой группой 4) вводили четыре дополнительных ударных дозы синтетического пептида SP2-KLH (SEQ ID NO: 62), продуцированного и очищенного, как описано выше. Перед сбором лимфоидной ткани животным группы 4 вводили последнюю ударную дозу SP2-KLH (SEQ ID NO: 62).

Каждую мышь примировали, и этим животным вводили ударные дозы, как описано ниже. Каждую мышь внутрибрюшинно примировали 40 мкг очищенного антигена в полном адьюванте Фрейнда. Через две недели мышам внутрибрюшинно вводили ударную дозу 30 мкг очищенного антигена в неполном адьюванте Фрейнда (IFA), после чего еще через две недели мышам снова внутрибрюшинно вводили ударную дозу 20 мкг очищенного антигена в IFA. Альтернативно, могут быть использованы адьюванты на основе хитозана. См., например, патенты США №№ 5912000, 5965144 и 5980912. Через одну неделю после введения второй ударной дозы титры сыворотки измеряли с помощью ELISA, как описано ниже, с использованием планшетов, покрытых антигеном mANGPTL3. Через две недели после введения второй ударной дозы мышам внутрибрюшинно вводили ударную дозу 10 мкг очищенного антигена в IFA. Через одну неделю после введения третьей ударной дозы титры сыворотки снова измеряли с помощью ELISA, как описано выше. Мышам группы 4 непрерывно внутрибрюшинно вводили ударные дозы до достижения высоких титров. После достижения высоких титров последние ударные дозы вводили с использованием примированного антигена (группы 1 и 2) или антигена в ударной дозе (группы 3 и 4). Последнюю ударную дозу вводили приблизительно через 2,5 недели после введения предпоследней ударной дозы, а затем внутривенно вводили 10 мкг очищенного антигена.

Через три дня после введения последней ударной дозы у иммунизированных мышей собирали спленоциты, и эти спленоциты подвергали слиянию с миеломными клетками (NS1) с использованием ПЭГ1500 в качестве агента для слияния. Полученные продукты слияния клеток разводили в гибридной среде и высевали в 96-луночные планшеты для культивирования тканей. Через 1 день к гибридным культурам добавляли среду HAT. При необходимости среду заменяли каждые три или четыре дня.

После отбора и культивирования, проводимого в течение 10-14 дней, гибридомы скринировали с помощью ELISA. Гибридомы, выделенные у мышей группы 1, скринировали с использованием mANGPTL3T, hANGPTL3T и N'-hANGPTL3T. Гибридомы, выделенные у мышей группы 2, скринировали с использованием mANGPTL3T и hANGPTL3T. Гибридомы, выделенные у мышей группы 3 и 4, скринировали с использованием hANGPTL3T и синтетического пептида, представляющего собой область SP1 ANGPTL3.

ELISA осуществляли, как описано ниже.

Г. ELISA-методы

Антитела скринировали на связывание с антигеном с помощью ELISA. Антитела, выделенные у животных каждой группы, скринировали на связывание с mANGPTL3T, hANGPTL3T, N'-hANGPTL3T

и/или с пептидом SP1 hANGPTL3. 96-луночные планшеты Nunc Maxi-Sorp ImmunoPlates™ (Nunc #446612, Roskilde, Denmark) сенсibilizировали путем добавления 50 мкл на лунку 2,5 мкг/мл раствора mANGPTL3T, hANGPTL3T, N'-hANGPTL3T и/или пептида SP1 hANGPTL3 в сенсibilizированном буфере (карбонат-бикарбонатном буфере BupH™, Pierce #28382, Rockford, IL) в течение ночи при 4°C. Затем сенсibilizированный буфер удаляли, и планшет блокировали путем добавления 250 мкл на лунку блокирующего буфера (1% Blocker™ BSA, Pierce #37525, в PBS) в течение двух часов при комнатной температуре. После этого в лунки добавляли 50 мкл супернатанта гибридомы (неразведенного или разведенного в блокирующем буфере) или выделенного анти-ANGPTL3 антитела (неразведенного или разведенного в блокирующем буфере), и смесь инкубировали по меньшей мере в течение одного часа при комнатной температуре. Лунки четыре раза промывали PBS/твином 20. Затем в лунки добавляли 100 мкл разведенного (1:5000-1:10000) ПХ-конъюгированного козьего антитела против мышиных IgG (Pierce #31446), и смесь инкубировали в течение одного часа при 37°C. Лунки шесть раз промывали PBS/твином 20. Анти-ANGPTL3 антитело детектировали путем добавления в лунки 50 мкл раствора ТМБ (тетраметилбензидина) (в наборе с субстратом ImmunoPure™ TMB Substrate Kit, Pierce #34021) в течение 5-10 мин. Планшеты считывали с помощью спектрофотометрии при 450 нм на микропланшете-ридере (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Н. Эпитопное картирование моноклональных антител 1. Связывание антитела с некоторыми пептидами ANGPTL3 Шесть антител, выделенных у мышей группы 1, тестировали с помощью ELISA-анализа с "захватом" антител, который проводили на связывание с тремя различными пептидами, состоящими из 50 аминокислот, и находящимися у N-конца мышиного ANGPTL3, и с N'-mANGPTL3T. Тестируемые антитела обозначали 1.251.1, 1.132.1, 1.173.2, 1.315.1, 1.424.1 и 1.431.1. Эти антитела тестировали на связывание с пептидом S¹⁷-G⁶⁶ (SEQ ID NO: 11), пептидом D⁴²-E⁹¹ (SEQ ID NO: 12), пептидом Q⁶⁷-M¹¹⁶ (SEQ ID NO: 13) и N'-mANGPTL3T (SEQ ID NO: 7).

Результаты этого эксперимента представлены в табл. 2.

Таблица 2. Антитело, связывающееся с пептидами ANGPTL3

Антитело	Мышиный пептид ANGPTL3			
	S ¹⁷ -G ⁶⁶	D ⁴² -E ⁹¹	Q ⁶⁷ -M ¹¹⁶	N'-mANGPTL3T
1.251.1	-	+	-	+
1.132.1	-	-	-	-
1.173.2	-	+	+	+
1.315.1	-	+	-	+
1.424.1	-	+	-	+
1.431.1	-	-	-	-

Ни одно из тестируемых антител не связывалось с пептидом S¹⁷-G⁶⁶. Антитела 1.251.1, 1.173.1, 1.315.1 и 1.424.1 связывались с пептидом D⁴²-E⁹¹ и с N'-mANGPTL3T. Антитело 1.173.1 также связывалось с пептидом Q⁶⁷-M¹¹⁶. Антитела 1.132.1 и 1.431.1 не связывались ни с одним из тестируемых пептидов и с N'-mANGPTL3T, что позволяет предположить, что указанные антитела связываются с эпитопом, находящимся за пределами области, расположенной между S¹⁷ и D²⁴⁰ mANGPTL3.

Восемь антител из группы 3 тестировали с помощью анализа ELISA с "захватом" антител на связывание с синтетическим пептидом, имеющим последовательность области SP1 ANGPTL3 (обозначаемой ANGPTL3 SP1) EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL (SEQ ID NOS:9 и 10) и полноразмерного His-меченного человеческого ANGPTL3T:

MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDLSLSPKSRFAMLDDVKI
 LANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKKEEKEKLRRTTYKLQV
 KNEEVKNMSLELNSKLESLLLEEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKTFVEKQ
 DNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEI
 RNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNE
 TWENYKYGFGRLDGEFWLGLLEKIYSIVKQSNYVLRLELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTL
 HLVAITGNVPNAIPENKDLVFWSTWDHAKAGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAK
 SKPERRRGLSWKSNQGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEGHNNNNNN

(SEQ ID NO: 4), и

полноразмерного человеческого ANGPTL3 (с использованием ANGPTL3T, продуцированного как описано выше) (SEQ ID NO: 3). В качестве контроля использовали неродственный рекомбинантный белок.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 9. Антитела 4.1.1, 4.4.1, 4.8.1 и 4.8.3 связывались с ANGPTL3 SP1 лучше, чем полноразмерный ANGPTL3T. Антитела 4.7.1 и 4.9.1 связывались как с ANGPTL3 SP1, так и с ANGPTL3T. Антитело 4.6.3 связывалось с полноразмерным ANGPTL3T, но не связывалось с ANGPTL3 SP1. И наконец, антитело 4.8.2 связывалось со всеми протестированными белками, включая контрольный белок.

Антитела из группы 4 тестировали на связывание с hANGPTL3T и с пептидом hANGPTL3 SP1 (данные не приводятся). Антитела 5.35 и 5.50 связывались с обоими антигенами и были выбраны для дальнейшего анализа.

2. Аланин-сканирующий мутагенез пептида SP1

Эпитопы для антител 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 5.35 и 5.50 были затем определены с использованием аланин-сканирующего мутагенеза пептида SP1. Пептид SP1 дикого типа имеет последовательность EPKSR-FAMLDDVKILANGLLQLGHGL (SEQ ID NO: 9). Была получена серия из 26 мутантов, в которой каждая из 26 аминокислот пептида SP1 дикого типа была заменена аланином, как показано в табл. 3.

Таблица 3. Мутантные пептиды SP1

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
SP1	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	9
мутант 1	A PKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	83
мутант 2	E AKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	84
мутант 3	EP A SRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	85
мутант 4	EPK A RFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	86
мутант 5	EPKSA F AMLDDVKILANGLLQLGHGL	87
мутант 6	EPKSR A AMLDDVKILANGLLQLGHGL	88
"мутант 7"	EPKSRF A MLDDVKILANGLLQLGHGL	9
мутант 8	EPKSRFA A LDDVKILANGLLQLGHGL	89
мутант 9	EPKSRFAM A DDVKILANGLLQLGHGL	90
мутант 10	EPKSRFAML A DDVKILANGLLQLGHGL	91
мутант 11	EPKSRFAMLD A VKILANGLLQLGHGL	92
мутант 12	EPKSRFAMLDD A KILANGLLQLGHGL	93
мутант 13	EPKSRFAMLDDV A ILANGLLQLGHGL	94
мутант 14	EPKSRFAMLDDVK A LANGLLQLGHGL	95
мутант 15	EPKSRFAMLDDVKI A ANGLLQLGHGL	96
"мутант 16"	EPKSRFAMLDDVKIL A NGLLQLGHGL	9
мутант 17	EPKSRFAMLDDVKIL A AGLLQLGHGL	97
мутант 18	EPKSRFAMLDDVKILAN A LLQLGHGL	98
мутант 19	EPKSRFAMLDDVKILANG A LQLGHGL	99
мутант 20	EPKSRFAMLDDVKILANGL A QLGHGL	100
мутант 21	EPKSRFAMLDDVKILANGLL A LGHGL	101
мутант 22	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQ A GHGL	102
мутант 23	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQL A HGL	103
мутант 24	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLG A GL	104
мутант 25	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGH A L	105
мутант 26	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHG A	106

У "мутанта 7" и "мутанта 16" в положениях 7 и 16 присутствует аланин, как и в последовательности дикого типа. Поэтому эти "мутанты" имеют последовательность пептида SP1 дикого типа, и не были подвергнуты мутагенезу.

Антитела 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 5.35 и 5.50 были протестированы с помощью анализа ELISA с "захватом" антитела на связывание с синтетическими пептидами, представленными в табл. 3 (за исключением пептидов "мутант 7" и "мутант 16"), следующим образом. Аланиновые мутанты получали с использованием генного кластера Flag-SUMO-SP1 с помощью ПЦП, проводимой посредством точкового мутагенеза. "Flag" представляет собой метку flag, а "SUMO" представляет собой небольшой модификатор, родственной убихитину. Каждый мутант подвергали трансляции *in vitro*, и концентрацию нормализовали с помощью вестерн-блоттинга с использованием моноклонального антитела против flag M1. Уровень связывания антитела с каждым мутантом определяли с применением ELISA-метода, описанного ниже. Пептид SP1 дикого типа и каждый мутантный пептид отдельно захватывали в лунках ELISA-планшета, который был сенсibilизирован моноклональным антителом против flag M1. Затем в лунки добавляли биотинилированное антитело (4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 5.35 или 5.50). Связывание антитела с пептидом детектировали с использованием ПХ-конъюгированного стрептавидина (Pierce #21124), проявленного с использованием

ТМВ, как обсуждается в примере G.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 14. В каждой из гистограмм, представленных на этой фигуре, пептид SP1 дикого типа обозначен "0" и расположен на самом конце каждой гистограммы справа. Как видно из этого эксперимента, эпитоп для антител 4.7.1 и 4.9.1 включает аминокислоты 2-6 и 9 пептида SP1 (аминокислоты 33-37 и 40 мышиноного ANGPTL3; аминокислоты 33-37 и 40 человеческого ANGPTL3). Как видно из этого эксперимента, эпитоп для антител 5.35 и 5.50 включает аминокислоты 3-6 и 9-11 пептида SP1 (аминокислоты 34-37 и 40-42 мышиноного ANGPTL3; аминокислоты 34-37 и 40-42 человеческого ANGPTL3). Как видно из этого эксперимента, эпитоп для антитела 4.8.3 включает аминокислоты 3-6, 9 и 11 пептида SP1 (аминокислоты 34-37, 40 и 42 мышиноного ANGPTL3; аминокислоты 34-37, 40 и 42 человеческого ANGPTL3). Таким образом, было обнаружено, что все нейтрализующие антитела 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 5.35 и 5.50 связываются с эпитопом в области SP1 ANGPTL3, которая включает аминокислоты 34-37 и 40 ANGPTL3.

I. Определение изотипа

Изотипы антител 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 5.35, 5.50 и 1.315.1 определяли стандартными методами. Антитела 4.7.1 и 5.50 имеют изотип IgG2b; антитела 4.8.3, 1.315.1 и 5.35 имеют изотип IgG2a, а антитело 4.9.1 имеет изотип IgG1.

Предсказанное время полужизни антитела IgG2b в сыворотке составляет от 3 до 3,5 дней. Предсказанное время полужизни антитела IgG2a в сыворотке составляет от 6 до 12 дней. Предсказанное время полужизни антитела IgG1 в сыворотке составляет от 8 до 11 дней.

J. In vivo введение моноклональных антител против ANGPTL3

Моноклональные антитела против ANGPTL3 вводили мышам для того, чтобы определить, могут ли такие антитела эффективно снижать уровни триглицеридов и/или холестерина у мышей. В первом эксперименте 8-недельным мышам-альбиносам C57, которые получали стандартный корм (корм "chow-fed»), инъецировали 30 мкг моноклонального антитела в объеме 10 мкл на грамм массы тела. Анти-ANGPTL3 антитела, протестированные в этом эксперименте, обозначали 1.315.1, 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1. В качестве контроля вводили анти-KLN антитело. Пяти мышам инъецировали каждое из этих антител. Через четыре дня определяли уровни триглицеридов и холестерина в сыворотке мышей, которые получали корм, и мышей, содержащихся в условиях голодания.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 1 и 2. На фиг. 1 показаны уровни триглицеридов через четыре дня после введения антител 1.315.1, 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1 и анти-KLN антитела мышам, которые получали корм, и мышам, которые содержались в условиях голодания. После очистки антитела 4.7.1 собирали два пика. Каждый из этих пиков вводили мышам отдельно (4.7.1-P1 и 4.7.1-P2). Введение всех четырех анти-ANGPTL3 антител приводило к статистически значимому снижению уровня триглицеридов в сыворотке у мышей, которые получали корм, по сравнению с мышами, которым вводили анти-KLN антитело. Однако в этом эксперименте ни одно из этих анти-ANGPTL3 антител не вызывало снижения уровней триглицеридов в сыворотке у мышей, которые содержались в условиях голодания. Действительно, в этом эксперименте антитело 4.7.1 вызывало повышение уровней триглицеридов в сыворотке у мышей, содержащихся в условиях голодания.

На фиг. 2 показаны уровни холестерина через четыре дня после введения антител 1.315.1, 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1 и анти-KLN антитела мышам, которые получали корм, и мышам, которые содержались в условиях голодания. Как описано выше, в этом эксперименте были протестированы два отдельных пика антитела 4.7.1. И в этом случае, введение всех антител приводило к статистически значимому снижению уровня холестерина в сыворотке у мышей, которые получали корм, по сравнению с мышами, которым вводили анти-KLN антитело. Однако в этом эксперименте ни одно из этих анти-ANGPTL3 антител не вызывало снижения уровней холестерина в сыворотке у мышей, которые содержались в условиях голодания.

Во втором эксперименте 8-недельным мышам-альбиносам C57, которые получали корм "chow-fed", инъецировали 30 мкг моноклонального антитела в объеме 10 мкл на грамм массы тела. В этом эксперименте было протестировано анти-ANGPTL3 антитело 4.8.3. Анти-KLN антитело вводили в качестве контроля. Кроме того, для сравнения тестировали анти-ANGPTL4 антитело 14D12. См., например, публикацию PCT № WO 2006/074228. Пяти мышам инъецировали каждое из этих антител. Через четыре дня измеряли уровни триглицеридов и холестерина в сыворотке животных, которые получали корм, и животных, которые содержались в условиях голодания.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 3 и 4. На фиг. 3 показаны уровни триглицеридов в сыворотке мышей, получавших корм, и мышей, содержащихся в условиях голодания, которым вводили анти-ANGPTL3 антитело 4.8.3, анти-ANGPTL4 антитело 14D12 или анти-KLN антитело. В этом эксперименте антитело 4.8.3 вызывало статистически значимое снижение уровней триглицеридов в сыворотке у мышей, получавших корм, и мышей, содержащихся в условиях голодания. С другой стороны, в этом эксперименте антитело 14D12 вызывало статистически значимое снижение уровней триглицеридов в сыворотке только у мышей, содержащихся в условиях голодания.

На фиг. 4 показаны уровни холестерина в сыворотке мышей, которые получали корм, и мышей, которые содержались в условиях голодания, и которым вводили анти-ANGPTL3 антитело 4.8.3, анти-

ANGPTL4 антитело 14D12 или анти-KLH антитело. В этом эксперименте антитело 4.8.3 способствует статистически значимому снижению уровней холестерина в сыворотке у мышей, которые получали корм, и мышей, которые содержались в условиях голодания. С другой стороны, в этом эксперименте антитело 14D12 способствует статистически значимому снижению уровней холестерина в сыворотке только у мышей, содержащихся в условиях голодания.

В третьем эксперименте 8-недельным мышам-альбиносам C57, которые получали стандартный корм (корм "chow-fed"), инъецировали 30 мкг моноклонального антитела в объеме 10 мкл на грамм массы тела. В этом эксперименте были протестированы анти-ANGPTL3 антитела 4.7.1, 4.8.3 и 4.9.1. Анти-KLH антитело вводили в качестве контроля. Кроме того, для сравнения тестировали анти-ANGPTL4 антитело 14D12. Десяти мышам инъецировали каждое из этих антител. Через четыре дня измеряли уровни триглицеридов и холестерина в сыворотке животных, которые получали корм, и животных, которые содержались в условиях голодания.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 5 и 6. На фиг. 5 показаны уровни триглицеридов, измеренные через четыре дня после введения им антител 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 14D12 и анти-KLH антитела мышам, которые получали корм, и мышам, которые содержались в условиях голодания. В этом эксперименте анти-ANGPTL3 антитела 4.8.3 и 4.9.1 вызывали статистически значимое снижение уровней триглицеридов в сыворотке у мышей, которые получали корм. Неспособность антитела 4.7.1 снижать уровни триглицеридов у животных, которые получали корм, может быть частично обусловлена присутствием антитела IgG2b, которое, как было предсказано, имеет время полужизни в сыворотке только 3-3,5 дней. В этом эксперименте анти-ANGPTL3 антитела 4.7.1, 4.8.3 и 4.9.1, а также анти-ANGPTL4 антитело 14D12 вызывало снижение уровней триглицеридов в сыворотке у мышей, которые содержались в условиях голодания.

На фиг. 6 показаны уровни холестерина, измеренные через четыре дня после введения антител 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 14D12 и анти-KLH антитела мышам, которые получали корм, и мышам, которые содержались в условиях голодания. В этом эксперименте анти-ANGPTL3 антитела 4.7.1, 4.8.3 и 4.9.1, а также анти-ANGPTL4 антитело 14D12 вызывали снижение уровней холестерина в сыворотке у мышей, которые получали корм. Однако в этом эксперименте только анти-ANGPTL3 антитело 4.9.1 и анти-ANGPTL4 антитело 14D12 вызывали снижение уровней холестерина в сыворотке у мышей, которые содержались в условиях голодания.

В четвертом эксперименте 8-недельным мышам-альбиносам C57, которые получали стандартный корм (корм "chow-fed"), инъецировали 30 мкг моноклонального антитела в объеме 10 мкл на г массы тела. В этом эксперименте были протестированы анти-ANGPTL3 антитела 1.125.1, 1.132.1, 1.173.2, 1.315.1, 1.424.1 и 1.431.1. Анти-KLH антитело вводили в качестве контроля. Каждая группа содержала пять мышей. Через четыре дня и через 8 дней измеряли уровни триглицеридов в сыворотке животных, которые получали корм, и животных, которые содержались в условиях голодания.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 7. В этом эксперименте антитело 1.315.1 вызывало статистически значимое снижение уровней триглицеридов в сыворотке через 4 дня и через 8 дней.

В пятом эксперименте 8-10-недельным мышам-альбиносам C57, которые получали стандартный корм (корм "chow-fed"), инъецировали 0, 3, 10, 30 или 90 мкг моноклонального антитела в объеме 10 мкл на грамм массы тела. В этом эксперименте были протестированы анти-ANGPTL3 антитела 5.35 и 5.50. Пяти мышам инъецировали каждое из этих антител в каждой дозе. Через четыре дня и через семь дней измеряли уровни триглицеридов и холестерина в сыворотке животных, которые получали корм.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 15 и 16. На фиг. 15 представлены уровни триглицеридов в сыворотке через четыре дня и через семь дней после инъекции мышам различных количеств антител 5.35 и 5.50. В этом эксперименте оба антитела 5.35 и 5.50 вызывали снижение уровней триглицеридов в сыворотке через четыре дня после инъекции мышам 30 или 90 мг/кг антитела. В этом эксперименте антитело 5.50 также способствовало снижению уровней триглицеридов в сыворотке через четыре дня после инъекции мышам 3 или 10 мг/кг антитела. В этом эксперименте через семь дней еще наблюдалось снижение уровней триглицеридов в сыворотке у мышей, которым инъецировали 10, 30 или 90 мг/кг антитела 5.50, однако по прошествии семи дней дальнейшее снижение уровней триглицеридов в сыворотке продолжалось только у мышей, которым вводили 90 мг/кг антитела 5.35.

На фиг. 16 представлены уровни холестерина в сыворотке у мышей, которым инъецировали различные количества антител 5.35 и 5.50. В этом эксперименте у мышей, которым инъецировали 30 или 90 мг/кг антитела 5.35 или 10, 30 или 90 мг/кг антитела 5.50, через 4 дня наблюдалось снижение уровня холестерина в сыворотке. У мышей, которым инъецировали 90 мг/кг антитела 5.35 или 90 мг/кг антитела 5.50, через семь дней уровни холестерина в сыворотке продолжали снижаться.

К. Введение моноклональных антител против ANGPTL3 ApoE-дефицитным мышам

Было обнаружено, что у ApoE-дефицитных мышей развивалась спонтанная гиперхолестеринемия. См., например, Piedrahita et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(10): 4471-5 и Zhang et al. (1992) Science 258 (5081): 468-71. Для того чтобы определить, могут ли некоторые моноклональные антитела против ANGPTL3 вызывать снижение уровней холестерина и триглицеридов в сыворотке у ApoE-

дефицитных мышей, был проведен следующий эксперимент. Трём группам из восьми 14-недельных ApoE-дефицитных мышей (Taconic Animal Models, штамм B6.129P2-Apo^{tm1UncN11}) внутривенно инъецировали 30 мг/кг анти-KLN антитела, 30 мг/кг антитела 5.35 или 30 мг/кг антитела 5.50. Каждой мышце вводили одну инъекцию на день 0 и одну инъекцию на день 4. Все мыши получали стандартный корм (корм "chow-fed"). У каждой мыши, которая получала корм, уровни триглицеридов и уровни холестерина в сыворотке определяли на день 0 (перед инъекцией), день 4, день 8 и день 12.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 19. На 4-й день антитело 5.35 вызывало снижение уровней триглицеридов в сыворотке на 36%. Такое снижение продолжалось в течение еще 8 дней, но прекращалось на 12-й день. На 4-й день антитело 5.50 вызывало снижение уровней триглицеридов в сыворотке на 60%. Такое снижение продолжалось в течение еще 8 дней, и такие значительно пониженные уровни триглицеридов в сыворотке сохранялись еще 12 дней.

Антитело 5.35 вызывало снижение уровней холестерина на 17%, хотя такое снижение достигалось только на 8-й день эксперимента, и несколько снижалось через 12 дней. Антитело 5.50 вызывало снижение уровней холестерина на 4-й день, и такое снижение продолжалось на 8-й и 12-й день эксперимента, а в конце эксперимента оно достигало в целом 30%.

Эти результаты показали, что антитела 5.35 и 5.50 вызывали снижение уровней триглицеридов и холестерина в сыворотке у ApoE-мышей. В этом эксперименте более эффективное снижение уровней триглицеридов и уровней холестерина в сыворотке обнаруживало антитело 5.50, что может быть обусловлено более продолжительным временем полужизни этого антитела в сыворотке.

L. In vitro введение моноклональных антител против ANGPTL3

Влияние мышинового моноклонального анти-ANGPTL3 антитела на ЛПЛ-активность тестировали с помощью анализа *in vitro*. Для получения ЛПЛ-кондиционированной среды клетки HEK293F (экспрессионная система Freestyle™ 293) (Invitrogen, Carlsbad, CA) трансфицировали ЛПЛ-экспрессирующим вектором, включающим ДНК, кодирующую ЛПЛ, с С-концевой меткой FLAG в плазмиде IRES puro (Clontech, Mountain View, CA).

Трансформированные клетки культивировали в среде для отбора (в среде Freestyle™ 293 System (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), в которую был добавлен 1хпенициллин-стрептомицин-глутамин (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 2,4 мкг/мл пурамицина). Клетки пронумеровывали и осаждали путем центрифугирования. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в свежей среде Freestyle™ 293, содержащей 1×GPS, без пурамицина, при концентрации 1×10^6 клеток/мл. После инкубирования в течение 48 ч кондиционированную среду, содержащую ЛПЛ, собирали из клеточной культуры, разделяли на 5 мл-аликвоты, а затем замораживали при -70°C и хранили до использования.

ЛПЛ-активность в кондиционированной среде анализировали путем добавления к аликвотам кондиционированной среды 200 мг/дл Intralipid® (Pharmacia & Upjohn), 12 mM глюкозы, 5 единиц/мл гепарина и 200 мкл 5% мышинной сыворотки (как источника Apo C-II). Затем эту среду инкубировали при 37°C . Образцы собирали через 2, 4 и 6 ч, а затем сразу замораживали при -70°C и хранили до проведения анализов. ЛПЛ-кондиционированную среду анализировали на ЛПЛ-активность путем измерения уровней FFA с использованием неразведенной кондиционированной среды и кондиционированной среды, разведенной в отношениях 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 и 1:32. Уровни FFA определяли через 2, 4 и 6 ч с использованием набора Wako FFA (Wako Chemical USA, Inc., Richmond, VA).

Также определяли способность моноклональных антител нейтрализовать активность ANGPTL3 *in vitro* анализе на ЛПЛ-активность. В анализе на ЛПЛ-активность *in vitro* измеряли уровни FFA с использованием набора Wako FFA (Wako Chemical USA, Inc., Richmond, VA). Отдельные анализы на ЛПЛ-активность проводили в присутствии 25 нМ мышинового ANGPTL3 и четырех концентраций (0,8, 2, 10 и 50 мкг/мл) каждого из 5 моноклональных антител (антител 4.9.1, 4.8.3, 1.315.1, 4.7.1 и 1.173.2). Результаты представлены на фиг. 12. Для каждого антитела нейтрализующая активность была продемонстрирована по способности антитела повышать ЛПЛ-активность, то есть "спасать" ЛПЛ от ее ингибирования под действием ANGPTL3. Нейтрализующая активность была определена как процент увеличения ЛПЛ-активности в присутствии ANGPTL3 и анти-ANGPTL3 антитела по отношению к ЛПЛ-активности в присутствии только ANGPTL3. Четыре антитела (4.9.1, 4.8.3, 1.315.1 и 4.7.1) обладали способностью "спасать" ЛПЛ-активность более чем на 50% в зависимости от их концентрации. Полученный результат показал, что эти антитела обладают способностью "спасать" ЛПЛ-активность посредством нейтрализации активности ANGPTL3. В противоположность этому, антитело 1.173.2 не обладало какой-либо значимой способностью "спасать" ЛПЛ-активность, а поэтому оно служило в качестве внутреннего негативного контроля.

M. Аффинность связывания моноклональных антител против ANGPTL3

Константы аффинности антител 4.7.1, 4.8.3 и 4.9.1 по отношению к N^h-hANGPTL3T и hANGPTL3T и константы аффинности антител 4.7.1, 4.9.1, 5.35 и 5.50 по отношению к пептиду SP1 определяли с использованием системы BIACORE® 3000 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). BIACORE® 3000 представляет собой систему биомолекулярного анализа в реальном времени для детектирования и количественной оценки взаимодействий "белок-белок" с применением метода поверхностного плазмонного резонанса. С

помощью системы BIACORE® 3000, в соответствии с инструкциями производителей, определяли ниже следующие константы аффинности: константу равновесной диссоциации (K_D), константу скорости ассоциации (k_{on}) и константу скорости диссоциации (k_{off}).

Каждую константу аффинности антител 4.7.1, 4.8.3 и 4.9.1 по отношению к белковым антигенам N'-hANGPTL3T и hANGPTL3T определяли следующим образом. Поверхность чипа BIACORE CM5 покрывали белковым антигеном путем присоединения 10 мкг/мл N'-hANGPTL3T или 20 мкг/мл hANGPTL3T к поверхности чипа с использованием набора для связывания с амином (продукт № BR-1000-50, GE Healthcare, Uppsala Sweden). Фазы ассоциации и диссоциации, которые использовали для определения констант k_{on} и k_{off} , получали путем первой инъекции Fab-фрагмента антитела (приготовленного с использованием набора для получения Fab (продукт № 44885, Pierce, Rockford, IL 61105) в соответствии с инструкциями производителя) в систему BIACORE® 3000, имеющую чип с покрытием, нанесенным на его поверхность, в течение 2 минут при скорости потока 30 мкл/мин. Концентрации тестируемых Fab-фрагментов составляли 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ, 3,125 нМ, 1,5625 нМ, 0,78125 нМ и 0 нМ. Фазу инъекции использовали для определения константы скорости ассоциации или k_{on} . После каждой инъекции Fab-фрагмент подвергали диссоциации из белкового антигена путем пропускания через буфер BIACORE HBS-EP (продукт № BR-1001-88, GE Healthcare, Uppsala Sweden) в течение 5 мин на комплексе антиген-Fab, находящемся на поверхности чипа BIACORE CM5. Эту фазу диссоциации использовали для определения константы скорости диссоциации или k_{off} . Перед следующей инъекцией поверхность чипа BIACORE регенерировали путем инъекции 10 мМ HCl при скорости потока 100 мкл/мин в течение 30 с. Сенсорограммы BIACORE для анализа данных получали путем вычитания профиля неспецифического связывания эталонной поверхности (иммобилизованной эквивалентными уровнями неродственных белков) из профилей Fab-специфического связывания антител 4.7.1, 4.8.3 и 4.9.1 на поверхностях чипа. Параметры аффинности, включая величины K_D , k_{on} и k_{off} , определяли путем построения общей кривой по данным ассоциации и диссоциации для модели связывания 1:1 с поправкой на перенос массы с использованием компьютерной программы BIAevaluation Software Version 3.0 (GE Healthcare, Uppsala Sweden).

Каждую константу аффинности антител 4.7.1, 4.9.1, 5.35 и 5.50 по отношению к пептидному антигену SP1 определяли следующим образом. Поверхность чипа BIACORE CM5 покрывали Fc-фрагментом антитела против мышинового IgG путем присоединения 90 мкг/мл Fc-фрагмента козьего антитела против мышинового IgG ImmunoPure (продукт № 31170, Pierce, Rockford, IL 61105) к поверхности чипа с использованием набора для связывания с амином (продукт № BR-1000-50, GE Healthcare, Uppsala Sweden). Затем антитело захватывали на поверхности чипа BIACORE с Fc-фрагментом антитела против мышинового IgG путем инъекции антитела при скорости потока 10 мкл/мин в течение 30 с. Фазы ассоциации и диссоциации, которые использовали для определения констант k_{on} и k_{off} , получали путем первой инъекции пептида SP1 в систему BIACORE® 3000, имеющую чип с антителом, нанесенным на его поверхность, в течение 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Концентрации тестируемых пептидов SP1 составляли 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 и 0 нМ. Фазу инъекции использовали для определения константы скорости ассоциации или k_{on} . После каждой инъекции пептид SP1 подвергали диссоциации из антитела путем пропускания через буфер BIACORE HBS-EP (продукт № BR-1001-88, GE Healthcare, Uppsala Sweden) в течение 5 мин на комплексе "пептид-антитело", находящемся на поверхности чипа BIACORE CM5. Эту фазу диссоциации использовали для определения константы скорости диссоциации или k_{off} . Перед следующей инъекцией поверхность чипа BIACORE регенерировали путем инъекции 10 мМ HCl при скорости потока 100 мкл/мин в течение 30 с. Сенсорограммы BIACORE для анализа данных получали путем вычитания профиля неспецифического связывания эталонной поверхности (захватывающей эквивалентные уровни неродственного мышинового IgG) из профилей антигенспецифического связывания антител 4.7.1, 4.9.1, 5.35 и 5.50 на поверхностях чипа. Параметры аффинности, включая величины K_D , k_{on} и k_{off} , определяли путем построения общей кривой по данным ассоциации и диссоциации для модели связывания 1:1 с поправкой на перенос массы с использованием компьютерной программы BIAevaluation Software Version 3.0 (GE Healthcare, Uppsala Sweden).

Результаты этого эксперимента представлены в табл. 4, 5 и 6. Каждое антитело тестировали в дубликate, и результаты каждого эксперимента представлены ниже.

Таблица 4. Аффинности антител по отношению к N'-hANGPTL3T

Антитело	K_D (нМ)	k_{on} ($M^{-1}сек^{-1}$)	k_{off} ($сек^{-1}$)
4.7.1	49,5	$1,85 \times 10^5$	$9,15 \times 10^{-3}$
4.7.1	77,5	$1,16 \times 10^5$	$8,99 \times 10^{-3}$
4.8.3	210	$9,00 \times 10^4$	$1,90 \times 10^{-2}$
4.8.3	251	$1,09 \times 10^5$	$2,75 \times 10^{-2}$
4.9.1	45,4	$1,31 \times 10^5$	$5,93 \times 10^{-3}$
4.9.1	55	$1,33 \times 10^5$	$7,34 \times 10^{-3}$

Таблица 5. Аффинности антител по отношению к hANGPTL3T

Антитело	K_D (нМ)	k_{on} ($M^{-1}сек^{-1}$)	k_{off} ($сек^{-1}$)
4.7.1	45,3	$1,76 \times 10^5$	$7,96 \times 10^{-3}$
4.7.1	117	$8,12 \times 10^4$	$9,53 \times 10^{-3}$
4.8.3	970	$2,23 \times 10^4$	$2,16 \times 10^{-2}$
4.8.3	450	$6,00 \times 10^4$	$2,73 \times 10^{-2}$
4.9.1	48,1	$1,29 \times 10^5$	$6,22 \times 10^{-3}$
4.9.1	45,2	$1,72 \times 10^5$	$7,77 \times 10^{-3}$

Таблица 6. Аффинности антител по отношению к пептиду SP1

Антитело	K_D (нМ)	k_{on} ($M^{-1}сек^{-1}$)	k_{off} ($сек^{-1}$)
4.7.1	26,1	$2,09 \times 10^5$	$5,46 \times 10^{-3}$
4.9.1	46,1	$1,69 \times 10^5$	$7,78 \times 10^{-3}$
5.35	1,80	$8,35 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-3}$
5.50	1,78	$1,08 \times 10^6$	$1,93 \times 10^{-3}$

N. In vivo фармакокинетика некоторых моноклональных антител против ANGPTL3

Для определения фармакокинетики этих антител (антитела 4.7.1, 4.8.3 и 4.9.1) *in vivo* каждое антитело отдельно вводили четырем различным мышам путем внутривенной инъекции в дозе 30 мг на кг. Через определенные промежутки времени, указанные на фиг. 13, у мышей брали кровь и получали сыворотку. Уровни анти-ANGPTL3 антитела, присутствующего в сыворотке, определяли путем сравнения титров, определенных с помощью ELISA с "захватом" антитела, с титрами, определенными по стандартной кривой, построенной с использованием серийных разведений того же самого антитела, которое было инъецировано мышам в ELISA с "захватом" антитела. ELISA с захватом антитела проводили, как описано в примере G. Результаты представлены на фиг. 13.

Для определения фармакокинетики антител 5.35 и 5.50 *in vivo* уровни антител измеряли у мышей через 4, 7 д и 12 дней после инъекции, как описано в примере J, в пятом эксперименте. Уровни анти-ANGPTL3 антитела, присутствующего в сыворотке, определяли с помощью ELISA с "захватом" антитела, где использовали планшеты, сенсibilизированные рекомбинантным человеческим ANGPTL3. Концентрацию антитела в сыворотке определяли путем сравнения с концентрацией, вычисленной по стандартной кривой, построенной с использованием серийных разведений того же самого антитела, которое инъецировали мышам в ELISA с "захватом" антитела. ELISA проводили, как описано в примере G.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 17. В этом эксперименте антитело 5.50 имеет более продолжительное время полужизни *in vivo*, чем антитело 5.35. В отличие от антитела 5.35, у антитела 5.50 более продолжительное время полужизни коррелировало с повышенной эффективностью *in vivo*, как было определено в эксперименте, обсуждаемом в примере J, и как показано на фиг. 15 и 16.

Фармакокинетика антител 4.7.1, 4.9.1, 5.35 и 5.50 у мышей C57 после одной инъекции им 30 мг/кг антитела проиллюстрирована на фиг. 18. Концентрацию антитела определяют с помощью анализа ELISA с "захватом" антитела, проводимого, как описано в примере G. Концентрацию антитела в сыворотке определяют путем сравнения с концентрацией, вычисленной по стандартной кривой, построенной с использованием серийных разведений того же самого антитела, которое инъецировали мышам в ELISA с захватом антитела. В этом эксперименте антитела 5.50 и 4.9.1 имели примерно одинаковое время полужизни. Кроме того, время полужизни антител 5.50 и 4.9.1 превышало время полужизни антител 5.35 и 4.7.1, у которых оно было примерно одинаковым в данном эксперименте. Кроме того, St_{max} антител 5.35 и 5.50 были приблизительно эквивалентными, и превышали St_{max} антитела 4.9.1, которая, в свою очередь, превышала St_{max} антитела 4.7.1 в данном эксперименте.

O. Последовательности некоторых моноклональных антител против ANGPTL3

Были определены переменные области тяжелой и легкой цепи антител 4.7.1, 4.8.3, 4.9.1, 5.35 и

5.50. Варибельная область тяжелой цепи антитела 4.7.1 показана в SEQ ID NO: 19 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 20 (без N-концевого сигнального пептида). Варибельная область легкой цепи антитела 4.7.1 показана в SEQ ID NO: 27 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 28 (без N-концевого сигнального пептида). Варибельная область тяжелой цепи антитела 4.8.3 показана в SEQ ID NO: 21 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 22 (без N-концевого сигнального пептида). Варибельная область легкой цепи антитела 4.8.3 показана в SEQ ID NO: 29 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 30 (без N-концевого сигнального пептида). Варибельная область тяжелой цепи антитела 4.9.1 показана в SEQ ID NO: 23 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 24 (без N-концевого сигнального пептида). Варибельная область легкой цепи антитела 4.9.1 показана в SEQ ID NO: 31 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 32 (без N-концевого сигнального пептида). Варибельная область тяжелой цепи антитела 5.35 показана в SEQ ID NO: 63 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 64 (без N-концевого сигнального пептида). Варибельная область легкой цепи антитела 5.35 показана в SEQ ID NO: 67 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 68 (без N-концевого сигнального пептида). Варибельная область тяжелой цепи антитела 5.50 показана в SEQ ID NO: 65 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 66 (без N-концевого сигнального пептида). Варибельная область легкой цепи антитела 5.50 показана в SEQ ID NO: 69 (с N-концевым сигнальным пептидом) и в SEQ ID NO: 70 (без N-концевого сигнального пептида).

Выравнивание варибельных областей тяжелой цепи антител 4.7.1, 4.8.3 и 4.9.1 проиллюстрировано на фиг. 10. Также показана консенсусная последовательность варибельных областей тяжелой цепи (SEQ ID NO: 25). Консенсусная последовательность варибельных областей тяжелой цепи без сигнального пептида представлена в табл. 7 (SEQ ID NO: 26).

Выравнивание варибельных областей легкой цепи антител 4.7.1, 4.8.3 и 4.9.1 проиллюстрировано на фиг. 11. Также показана консенсусная последовательность варибельных областей легкой цепи (SEQ ID NO: 33). Консенсусная последовательность варибельных областей легкой цепи без сигнального пептида представлена в табл. 7 (SEQ ID NO: 34).

Р. Гуманизация некоторых моноклональных антител против ANGPTL3

В нижеследующем протоколе описана гуманизация антитела 4.7.1. Антитела 4.8.3, 4.9.1, 5.35, 5.50 и 1.315.1 могут быть гуманизированы одним и тем же методом. Гуманизированный вариант антитела 4.7.1 был обозначен "hu4.7.1". Гуманизированные варианты антител 4.8.3, 4.9.1, 5.35, 5.50 и 1.315.1 были обозначены "hu4.8.3", "hu4.9.1", "hu5.35", "hu5.50" и "hu1.315.1" соответственно.

Каркасные области каждой тяжелой и легкой цепи человеческого антитела выбирали из серии семейство-специфичных каркасных областей консенсусной последовательности человеческого антитела, исходя из их гомологии каркасным областям мышинового антитела, присутствующим в антителе 4.7.1. Отобранные человеческие каркасные области диверсифицировали в конкретных положениях аминокислот для выявления разнообразия каркасных областей в выбранном семействе V-генов. Полинуклеотиды, кодирующие CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела 4.7.1, клонировали в библиотеку полинуклеотидов, кодирующих диверсифицированные каркасные области тяжелой цепи человеческого антитела. Полученная библиотека была названа "библиотекой" варибельных областей тяжелой цепи гуманизированного антитела 4.7.1. Полинуклеотиды, кодирующие CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела 4.7.1, клонировали в библиотеку полинуклеотидов, кодирующих диверсифицированные каркасные области легкой цепи человеческого антитела. Полученная библиотека была названа "библиотекой" варибельных областей легкой цепи гуманизированного антитела 4.7.1. Библиотеку варибельных областей тяжелой цепи гуманизированного антитела 4.7.1 и библиотеку варибельных областей легкой цепи гуманизированного антитела 4.7.1 клонировали в вектор фагового представления в одноцепочечном Fv(scFv)-фрагменте.

Библиотеку фагового представления scFv скринировали на антиген-мишень, например, человеческий ANGPTL3, путем проведения 2-3 раундов связывания для отбора на scFv с высокой аффинностью. Затем scFv экспрессировали в растворимой форме и тестировали на нужную аффинность и/или нейтрализующую активность *in vitro*. После этого варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи scFv, отобранные на нужную аффинность и активность, экспрессировали в виде полноразмерных IgG или scFv-CL-ПЭГ (CL представляет собой константную область легкой цепи человеческого антитела) и тестировали на *in vivo* активность, например, на способность снижать уровни триглицеридов и/или холестерина в сыворотке мышей. ПЭГ присоединяли к группе CL посредством цистеина.

Q. Аффинное созревание некоторых моноклональных антител против ANGPTL3

В нижеследующем протоколе описано аффинное созревание антитела 4.7.1. Аффинное созревание антител 4.8.3, 4.9.1, 5.35, 5.50 и 1.315.1 может быть осуществлено одним и тем же методом. Аналогичным образом, аффинное созревание антител hu4.7.1, hu4.8.3, hu4.9.1, hu5.35, hu5.50 и hu1.315.1 может быть осуществлено одним и тем же методом.

Полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела 4.7.1, подвергали неспецифическому мутагенезу, например, с помощью ПЦР с вероятностью ошибки. ПЦР с вероятностью ошибки осуществляли с использованием набора для неспецифического мутагенеза GeneMorph® II (Stratagene, La Jolla, CA) в со-

ответствии с инструкциями производителей.

Полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела 4.7.1, также подвергали неспецифическому мутагенезу, например, с помощью ПЦР с вероятностью ошибки. ПЦР с вероятностью ошибки осуществляли с использованием набора для неспецифического мутагенеза GeneMorph® II (Stratagene, La Jolla, CA) в соответствии с инструкциями производителей. Неспецифически мутированный полинуклеотид тяжелой цепи и неспецифически мутированный полинуклеотид легкой цепи клонировали в вектор фагового представления в одноцепочечом Fv (scFv)-фрагменте.

Затем библиотеку фагового представления scFv скринировали на антиген-мишень, например, на человеческий ANGPTL3, путем проведения 2-3 раундов связывания для отбора на scFv с высокой аффинностью. Затем scFv экспрессировали в растворимой форме и тестировали на нужную аффинность и/или нейтрализующую активность *in vitro*. После этого варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи scFv, отобранные на нужную аффинность и активность, экспрессировали в виде полноразмерных IgG или scFv-CL-ПЭГ и тестировали на *in vivo* активность, например на способность снижать уровни триглицеридов и/или холестерина в сыворотке мышей.

Отобранные аффинно-зрелые антитела, если они еще не были гуманизированы, могут быть затем гуманизированы, как описано выше в примере Р.

Хотя в приведенных выше примерах описаны *inter alia* некоторые нейтрализующие моноклональные антитела против мышинового ANGPTL3 и их действие *in vivo* у мышей, однако для специалиста в данной области совершенно очевидно, что могут быть продуцированы нейтрализующие моноклональные антитела против человеческого ANGPTL3, и такие антитела имеют одинаковые или аналогичные эффекты *in vivo* у человека. Этот вывод основан частично на обнаружении того факта, что человеческий и мышинный ANGPTL3 представляют собой эволюционно консервативные белки, обладающие общими структурными и функциональными свойствами. Conklin D. et al. (1999) *Genomics* 62: 477-482. Так, например, аминокислотные последовательности человеческого и мышинового ANGPTL3 идентичны примерно на 76%. Человеческий и мышинный ANGPTL3 также имеют общие вторичные структурные элементы, например N-концевой суперспирализованный домен и C-концевой фибриноген-подобный домен. Кроме того, человеческий ANGPTL3 имеет функцию, аналогичную функции мышинового ANGPTL3, на что указывает способность человеческого ANGPTL3 повышать уровни липидов в сыворотке при его сверхэкспрессии у мышей. Koishi et al. (2002) *Nat. Genet.* 30 (2): 151-157.

Специалисту в данной области в общих чертах известно, что мыши обычно применяются в качестве моделей для лечения различных состояний и заболеваний с использованием нейтрализующих антител. Так, например, нейтрализующие антитела были использованы для лечения заболевания, вызываемого прионами, диабета и воспаления у мышей. См., например, White et al. (2003) *Nature* 422: 80-83; Cailleau et al. (1997) *Diabetes* 46: 937-940; и Lochner et al. (2002) *J. Immunol. Methods* 259:149-157. В последнем исследовании было обнаружено, что моноклональные антитела, нейтрализующие мышинный IL-18, вырабатывались у IL-18-дефицитных мышей. Такие мышинные моноклональные антитела обладали способностью подавлять индуцированный липополисахаридом воспалительный ответ у мышей дикого типа. Таким образом, можно сделать вывод, что вышеупомянутые примеры подтверждают возможность использования нейтрализующих моноклональных антител против человеческого ANGPTL3 для лечения патологических состояний у человека.

Таблица 7. Таблица последовательностей

Описание	SEQ ID NO:	Последовательность
мышинный ANGPTL3 per. № NP_038941)	1	MHTIKLFLFV VPLVIASRVD PDLSSFDSAP SEPKSRFAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLRTN EIKEEEKELR RTTSTLQVKN EEVKNMSVEL NSKLESLLLE KTAHQKVRA LEEQLTNLIL SPAGAQBHPE VTSLSKSFVEQ QDNSIRELLQ SVBEQYKQLS QQHMQIKBIE KQLRKTGIQE PSENSLSSKS RAPRTTTPPLQ LNETENTEQD DLPADCSAVY NRGHTSGVY TIKPRNSQGF NVYCDTQSGS PWTLIQHRKD GSQDFNETWE NYEKGFGRLD GEFWLGLEKI YAIVQGSNYI LRLELDQWKD SKHYVEYSFH LGSHTNYTL HVAETAGNIP GALPEHTDLM FSTWNHRAKG QLYCPBSYSG GWWNDICGE NNLNGKYNKP RTKSRPERRR GIYWRPQSRK LYAIKSSKMM LQPTT
mANGPTL3T	2	MHTIKLFLFV VPLVIASRVD PDLSSFDSAP SEPKSRFAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLRTN EIKEEEKELR RTTSTLQVKN EEVKNMSVEL NSKLESLLLE KTAHQKVRA LEEQLTNLIL SPAGAQBHPE VTSLSKSFVEQ QDNSIRELLQ SVBEQYKQLS QQHMQIKBIE KQLRKTGIQE PSENSLSSKS RAPRTTTPPLQ LNETENTEQD DLPADCSAVY NRGHTSGVY TIKPRNSQGF NVYCDTQSGS PWTLIQHRKD GSQDFNETWE NYEKGFGRLD GEFWLGLEKI YAIVQGSNYI LRLELDQWKD SKHYVEYSFH LGSHTNYTL HVAETAGNIP GALPEHTDLM FSTWNHRAKG QLYCPBSYSG GWWNDICGE NNLNGKYNKP RTKSRPERRR GIYWRPQSRK LYAIKSSKMM LQPTTGHHHHH H
человеческий ANGPTL3 per. № NP_055310)	3	MFTIKLLLFI VPLVISSRID QDNSSFDSLS PEPKSRFAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLQTS EIKEEEKELR RTTYKLQVKN EEVKNMSLEL NSKLESLLLE KILLQQVKY LEEQLTNLIQ NQPETPEHPE VTSLKTFVEK QDNSIKDLLQ TVEDQYKQLN QQHSQIKBIE NQLRRTSIQE PTEISLSSKP RAPRTTTPPLQ LNEIRNVKHD GIPAECTTIY NRGHTSGMY AIRPSNSQVF HVYCDVISGS PWTLIQHRID GSQNFNETWE NYKYGFGRLD GEFWLGLEKI YSIVKQSNYV LRILELDWKD NKHYIEYSFY LGNHETNYTL HLVAITGNVP NAIPENKDLV FSTWDHKAKG HFNCPEGYSG GWWHDECGE NNLNGKYNKP RAKSKPERRR GLSWKSONGR LYSIKSTKML IHPTDSESFE
hANGPTL3T	4	MFTIKLLLFI VPLVISSRID QDNSSFDSLS PEPKSRFAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLQTS EIKEEEKELR RTTYKLQVKN EEVKNMSLEL NSKLESLLLE KILLQQVKY LEEQLTNLIQ NQPETPEHPE VTSLKTFVEK QDNSIKDLLQ TVEDQYKQLN QQHSQIKBIE NQLRRTSIQE PTEISLSSKP RAPRTTTPPLQ LNEIRNVKHD GIPAECTTIY NRGHTSGMY AIRPSNSQVF HVYCDVISGS PWTLIQHRID GSQNFNETWE NYKYGFGRLD GEFWLGLEKI YSIVKQSNYV LRILELDWKD NKHYIEYSFY LGNHETNYTL HLVAITGNVP NAIPENKDLV FSTWDHKAKG HFNCPEGYSG GWWHDECGE NNLNGKYNKP RAKSKPERRR GLSWKSONGR LYSIKSTKML IHPTDSESFE GHHHHHH
мышинный Angptl3	5	TCAGGAGGGA GAAGTTCCAA ATTGCTTAAА ATTGAATAА

(per. № NM_013913) (mRNA/cDNA)		TGAGACAAA AATGCACACA ATTAAATTAT TCCTTTTTGT TGTTCCCTTTA GTAATGTCAT CCAGAGTGGG TCCAGACCTT TCATCATTGG ATTCGCAACC TTCAGAGCCA AAATCAAGAT TTGCTATGTT GGATGATGTC AAAATTTTAG CGAATGGCCT CCTGCAGCTG GGTCAATGGAC TTAAGATTTT TGCCATAAG ACTAAGGGAC AAATTAACGA CATATTTCCG AAGCTCAACA TATTTGATCA GTCTTTTTAT GACCTATCAC TTCGAACCAA TGAAATCAAA GAAGAGGAAA AGGAGCTAAG AAGAACTACA TCTACACTAC AAGTTAAAAA CGAGGAGGTG AAGAACATGT CAGTAGAACT GAACCTAAAG CTGAGAGGTC TGCTGGGAAG GAAGACAGCC CTTCAACACA AGGTCAAGGC TTTGAGGAG CAGCTAACCA ACTTAATTCT AAGCCCAGCT GGGGCTCAGG AGCACCAGCA AGTAACATCA CTCAAAAGTT TTGTAGAACA GCAAGACAAC AGCATAAGAG AACTCCTCCA GAGTGTGGAA GAACAGTATA AACAAATTAAG TCAACAGCAC ATGCGAGATA AAGAAATAGA AAAGCAGCTC AGAAAGACTG GTATTCAAGA ACCCCTCAGAA AATTCTCTTT CTCTAAATC AAGAGCACCA AGAACTACTC CCCCTCTTCA ACTGAACGAA ACAGAAAATA CAGAACAAGA TGACCTTCCT GCCGACTGCT CTGCCGTTTA TAACAGAGGC GAACATACAA GTGGCGTGTG CACTATTAAA CCAAGAAACT CCCAAGGGTT TAATGTCTAC TGTGATACCC AATCAAGCAG TCCATGGACA TTAATTCAC ACCGGAAGA TGGCTCACAG GACTTCAACG AAACATGGGA AAACACGAA AAGGGCTTTG GGAGGCTCGA TGGAGAATTT TGGTTGGGCC TAGAGAAGAT CTATGTCTATA GTCCAACAGT CTAACACAT TTTACGACTC GAGCTACAAG ACTGGAAAGA CAGCAAGCAC TAGCTTGAAT ACTCCTTTCA CCTGGGCAGT CACGAAACCA ACTACACGCT ACATGTGGCT GAGATTGCTG GCAATATCCC TGGGGCCCTC CCAGAGCACA CAGACCTGAT GTTTTCTACA TGGAAATCACA GAGCAAAGGG ACAGCTCTAC TGTCCAGAAA GTTACTCAGG TGGCTGGTGG TGGAAATGACA TATGTGGAGA AAACAACCTA AATGGAAAT ACAACAACC CAGAACCAAA TCCAGACCAG AGAGAAGAAG AGGGATCTAC TGGAGACCTC AGAGCAGAAA GCTCTATGCT ATCAAAATCAT CCAAATGAT GCTCCAGCCC ACCACCTAAG AAGCTTCAAC TGAACAGAGA CAAAATAAAA GATCAATAAA TTAATATTA AAGTCTCCC GATCACTGTA GTAATCTGGT ATTAAATTT TAATGGAAAG CTTGAGAATT GAATTTCAAT TAGGTTTAAA CTCATTGTTA AGATCAGATA TCACCGAATC AACGTAAACA AAATTTATCT TTTC
человеческий Angptl3 (per. № NM_014495) (mRNA/cDNA)	6	TTCCAGAAGA AAACAGTTCC ACGTTGCTTG AAATTGAAAA TCAAGATAAA AATGTTTACA ATTAAGCTCC TTCTTTTTAT TGTTCTCTTA GTTATTTCTT CCAGAATTGA TCAAGACAA TCATCATTGG ATTCCTCTATC TCCAGAGCCA AAATCAAGAT TTGCTATGTT AGACGATGTA AAAATTTTAG CCAATGGCCT CCTTCAGTTG GGACATGGTC TTAAGACTT TGTCATAAG ACGAAGGGCC AAATTAATGA CATATTTCAA AAACCTAACA TATTTGATCA GTCTTTTTAT GATCTATCGC TGCAAACCA TGAAATCAAA GAAGAAGAAA AGGAACTGAG AAGAACTACA TATAAATAC AAGTCAAAA TGAAGAGGTA AAGAATATGT CACTTGAAC TCACTCAAAA CTTGAAAGCC TCCTAGAAGA AAAAATTTCTA CTTCAACAAA AAGTGAAATA TTTAGAAGAG CAACTAACTA ACTTAATTCA AAATCAACCT GAAACTCCAG AACACCCAGA AGTAACTTCA CTTAAACTT TTGTAGAAAA ACAAGATAAT AGCATCAAAG ACCTTCTCCA GACCGTGGAA GACCAATATA AACAAATAAA CCAACAGCAT AGTCAAATA AAGAAATAGA AAATCAGCTC AGAAGGACTA GTATTCAAGA ACCCACAGAA ATTTCTCTAT CTTCCAAGCC AAGAGCACCA AGAACTACTC CCTTTCTTCA GTTGAATGAA ATAAGAAATG

		<p>TAAAACATGA TGGCATTCCT GCTGAATGTA CCACCATTTA TAACAGAGGT GAACATACAA GTGGCATGTA TGCCATCAGA CCCAGCAACT CTCAAGTTTT TCATGTCTAC TGTGATGTTA TATCAGGTAG TCCATGGACA TTAATTC AAC ATCGAATAGA TGGATCACA AACTTCAATG AAACGTGGGA GAACACAAA TATGGTTTTG GGAGGCTTGA TGGAGAATTT TGGTTGGCCC TAGAGAAGAT ATACTCCATA GTGAAGCAAT CTAATTATGT TTTACGAATT GAGTTGGAAG ACTGGAAAAGA CAACAAACAT TATATTGAAT ATCTTTTTTA CTTGGGAAAT CACGAAACCA ACTATACGCT ACATCTAGTT GCGATTACTG GCAATGTCCC CAATGCAATC CCGAAAACA AAGATTGGT GTTTTCTACT TGGGATCACA AAGCAAAAGG ACACCTCAAC TGTCCAGAGG GTTATTGAGG AGGCTGGTGG TGGCATGATG AGTGTGGAGA AAACACCTA AATGGTAAAT ATAACAAACC AAGAGCAAAA TCTAAGCCAG AGAGGAGAAG AGGATTATCT TGGAAGTCTC AAAATGGAAG GTTATACTCT ATAAAATCAA CAAAATGTT GATCCATCCA ACAGATTCAG AAAGCTTTGA ATGAACAGTG GCAAAATTA AAGGCAATAA TTTAAACATT AACCTCATT CAAGTTAATG TGGTCTAATA ATCTGGTATT AAATCCTTAA GAGAAAGCTT GAGAAATAGA TTTTTTTTAT CTTAAAGTCA CTGTCTATTT AAGATTAAC ATACAATCAC ATAACCTTAA AGAATACCGT TTACATTTCT CAATCAAAAT TCTTATAATA CTATTTGTTT TAAATTTTGT GATGTGGGAA TCAATTTTAG ATGGTCACAA TCTAGATTAT AATCAATAGG TGAACCTATT AAATAACTTT TCTAAATAAA AAATTTAGAG ACTTTTATTT TAAAAGGCAT CATATGAGCT AATATCACA CTTTCCCAGT TTAAAAAACT AGTACTCTTG TTAAACTCT AAACCTGACT AAATACAGAG GACTGGTAAT TGTACAGTTC TTAATGTTG TAGTATTAAT TTCAAACATA AAAATCGTCA GCACAGAGTA TGTGTAAAAA TCTGTAATAC AAATTTTFAA ACTGATGCTT CATTTTGCTA CAAAATAATT TGGAGTAAAT GTTTGATATG ATTTATTTAT GAAACCTAAT GAAGCAGAAT TAAACTACTGT ATTAATAATA GTTCGTGTC TTTAAACAAA TGGAGATGAC TACTAAGTCA CATTGACTTT AACATGAGGT ATCACTATAC CTTATT</p>
rN'-mANGPTL3T	7	<p><u>SRVDPD LSSFDSAPSE PKSRFAMLDD VKILANGLLQ</u> <u>LHGHLKDFVH RTKGQINDIP QKLNIFDQSF YDLSLRNEI</u> <u>KEEKELRRT TSTLQVKNEE VKNMSVELNS KLESLEEKI</u> <u>ALQHKVRALE EQLTNLILSP AGAQEHPEVT SLKSFVEQOD</u> <u>NSIRELLQSV EBQYKQLSQO HMQIKIEIKQ LRRGTGIEPS</u> <u>ENSLSKSRPRT PRTTPLLQNL ETENTEQDLE HHHHHH</u></p>
rN'-hANGPTL3T	8	<p><u>DQDNSS FDSLSPEPKS RFAMLDDVKI LANGLLQLGH</u> <u>GLKDFVHKTG QQINDIFQKL NIFDQSFYDL SLQTSSEIKEE</u> <u>EKELRRTTYK LQVKNEEVKN MSLELNSKLE SLLEEKILLQ</u> <u>QKVKYLEEQ TNLIQNPET PEHPEVTSLK TFVEKQDNIS</u> <u>KDLLQTVEDQ YKQLNQHSQ IKEIENQLRR TSIQEPTEIS</u> <u>LSSKPRAPRT TPFLLQNEIR NVKHDGIPLE HHHHHH</u></p>
область mANGPTL3 SP1	9	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL
область hANGPTL3 SP1	10	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL

S ¹⁷ -G ⁶⁸ пептид	11	SRVDPDLSSFDSAPSEPKSRFAMLDVVKILANGL LQLGHGLKDFVHKTKG
D ⁴² -E ⁹¹ пептид	12	DVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQ SFYDLSLRTNE
Q ⁶⁷ -M ¹¹⁶ пептид	13	QINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKKEEKELR RTTSTLQVKNEEVKNM
I ⁹² -L ¹⁴¹ пептид	14	IKKEEKELRRTTSTLQVKNEEVKNMSVELNSKLESLEE KTALQHKVRL
S ¹¹⁷ -S ¹⁶⁶ пептид	15	SVELNSKLESLEEKTALQHKVRALEBQLTNLIL SPAGAQEHPEVTSLSKS
E ¹⁴² -Q ¹⁹¹ пептид	16	EEQLTNLILSPAGAQEHPEVTSLSKSFVEQQDNSIRELLQ SVEEQYKQLSQ
F ¹⁶⁷ -L ²¹⁶ пептид	17	FVEQQDNSIRELLQSVEEQYKQLSQOHMQIKBIE KQLRKTGIQEPSNSL
Q ¹⁹² -D ²⁴¹ пептид	18	OHMQIKBIEKQLRKTGIQEPSNSLSKSRAPRTTFFLQ LNETENTEQDD
вариабельная область тяжелой цепи антитела 4.7.1	19	MEWSWIFLFL LSGTAGVHSE VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYF NPYNDGTKYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM ELSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA
вариабельная область тяжелой цепи антитела 4.7.1 без сигнального пептида	20	E VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYF NPYNDGTKYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM ELSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA
вариабельная область тяжелой цепи антитела 4.8.3	21	MEWSWIFLFL LSGTAGVHSE VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFIS CVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGTKYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM ELSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA
вариабельная область тяжелой цепи антитела 4.8.3 без сигнального пептида	22	E VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFIS CVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGTKYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM ELSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA
вариабельная область тяжелой цепи антитела 4.9.1	23	MEWSWIFLFL LSGTAGVHSE VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGTKYN ENFKGKATLT SDKSSSTAYM EFSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA
вариабельная область тяжелой цепи антитела 4.9.1 без сигнального пептида	24	E VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGTKYN ENFKGKATLT SDKSSSTAYM EFSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA
консенсусная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	25	MEWSWIFLFL LSGTAGVHSE VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGTKYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM ELSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA

консенсусная последовательность вариабельной области тяжелой цепи без сигнального пептида	26	E VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGTKYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM ELSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTTLTVSSA
вариабельная область легкой цепи антитела 4.7.1	27	MSSAQFLGLL LLCFQCTRCD IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDISN FLNWFQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPPTFGGG TKLEIKR
вариабельная область легкой цепи антитела 4.7.1 без сигнального пептида	28	D IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDISN FLNWFQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPPTFGGG TKLEIKR
вариабельная область легкой цепи антитела 4.8.3	29	MSSAQFLGLL LLCFQGRCE IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCWASQDINN YLNWFQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLKQE DIATYFCQQG NTLPPPTFGGG TKLEIKR
вариабельная область легкой цепи антитела 4.8.3 без сигнального пептида	30	E IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCWASQDINN YLNWFQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLKQE DIATYFCQQG NTLPPPTFGGG TKLEIKR
вариабельная область легкой цепи антитела 4.9.1	31	MSSAQFLGLL LLCFQGARCD IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDIRN YLNWFQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPPTFGGG TKLEIKR
вариабельная область легкой цепи антитела 4.9.1 без сигнального пептида	32	D IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDIRN YLNWFQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPPTFGGG TKLEIKR
консенсусная последовательность вариабельной области легкой цепи	33	MSSAQFLGLL LLCFQGXRC D IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDIXN YLNWFQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPPTFGGG TKLEIKR
консенсусная последовательность вариабельной области легкой цепи без сигнального пептида	34	D IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDIXN YLNWFQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPPTFGGG TKLEIKR
CDR1 тяжелой цепи антитела 4.7.1	35	GYTFTSYVMH
CDR2 тяжелой цепи антитела 4.7.1	36	YFNPNYNDGTKYNEKFKG
CDR3 тяжелой цепи антитела 4.7.1	37	BGDYYGYFDY
CDR1 тяжелой цепи антитела 4.8.3	38	GYTFISCVMH
CDR2 тяжелой цепи антитела 4.8.3	39	YINPNYNDGTKYNEKFKG
CDR3 тяжелой цепи антитела 4.8.3	40	BGDYYGYFDY

CDR1 тяжелой цепи антитела 4.9.1	41	GYTFTSYVMH
CDR2 тяжелой цепи антитела 4.9.1	42	YINPYNDGTYKYNENFKG
CDR3 тяжелой цепи антитела 4.9.1	43	EGDYGYFDY
CDR1 легкой цепи антитела 4.7.1	44	RASQDISNFLN
CDR2 легкой цепи антитела 4.7.1	45	YTSRLHS
CDR3 легкой цепи антитела 4.7.1	46	QOGNTLPPT
CDR1 легкой цепи антитела 4.8.3	47	WASQDINNYLN
CDR2 легкой цепи антитела 4.8.3	48	YTSRLHS
CDR3 легкой цепи антитела 4.8.3	49	QOGNTLPPT
CDR1 легкой цепи антитела 4.9.1	50	RASQDIRNYLN
CDR2 легкой цепи антитела 4.9.1	51	YTSRLHS
CDR3 легкой цепи антитела 4.9.1	52	QOGNTLPPT
консенсусная последовательность CDR1 тяжелой цепи	53	GYTFTSYVMH
консенсусная последовательность CDR2 тяжелой цепи	54	YINPYNDGTYNEKFKG
консенсусная последовательность CDR3 тяжелой цепи	55	EGDYGYFDY
консенсусная последовательность CDR1 легкой цепи	56	RASQDIXNYLN
консенсусная последовательность CDR2 легкой цепи	57	YTSRLHS
консенсусная последовательность CDR3 легкой цепи	58	QOGNTLPPT
мышиний ANGPTL3 S ¹⁷ -D ²⁴⁰	59	SRVD FDLSSFD SAP SBPKSRFAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLRTN BIKEBEKELR RTTSTLQVKV EEVKNMSVEL NSKLESLEE KTALQHKVRA LEEQLTNLIL SPAGAQEHPE VTSLKSFVEQ QDNSIRELLQ SVEEQYKQLS QQHMQIKEIE KQLRKTGIE PSENSLSSKS RAPRTTPLLQ LNETENTEQD
человеческий ANGPTL3 D ²⁰ -P ²⁴³	60	D QDNSSFDLSL PEPKSRFAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLQTS BIKEBEKELR RTTYKLQVKV EEVKNMSLEL NSKLESLEE KILLQCKVKY LEEQLTNLIQ NQPETPEHPE VTSLKTFVEK QDNSIKDLLQ TVEDQYKQLN QQHSQIKEIE NQLRRTSIQE PTEISLSSKE RAPRTTPLLQ LNEIRNVKHD GIP
мышиний ANGPTL3	61	DVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ

D ⁴² -M ¹¹⁶		SFYDLSLRTN EIKEEEKELR RTTSTLQVKN BEVKNM
SP2-KLH	62	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLC
варибельная область тяжелой цепи антитела 5.35	63	MGRLTSSFLI LIVPAYVLSQ VTLKESGPGI LHPSQTLTLT CSFSGFSLNT FGLAVGHIRQ FSGKGLEWLG HIWDDHKYY NGVLKSRITI SKDSSKKQVF LRIANVDTAD TARYYCARE TGTGFAYWQ GTLVTVSAA
варибельная область тяжелой цепи антитела 5.35 без сигнального пептида	64	Q VTLKESGPGI LHPSQTLTLT CSFSGFSLNT FGLAVGHIRQ FSGKGLEWLG HIWDDHKYY NGVLKSRITI SKDSSKKQVF LRIANVDTAD TARYYCARE TGTGFAYWQ GTLVTVSAA
варибельная область тяжелой цепи антитела 5.50	65	MGWSWIFLPL LSQTAGVLSV VQLQQSGPEL VKPGASVKIS CKASGFTFTD YMNWVKQSH GESLEWIGDI NPNNGGTIYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM ELRSLTSEDS AVYYCVRLPW YFDVWGTGTT VTVSSA
варибельная область тяжелой цепи антитела 5.50 без сигнального пептида	66	E VQLQQSGPEL VKPGASVKIS CKASGFTFTD YMNWVKQSH GESLEWIGDI NPNNGGTIYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM ELRSLTSEDS AVYYCVRLPW YFDVWGTGTT VTVSSA
варибельная область легкой цепи антитела 5.35	67	MRCLAEFLGL LVLWIPGAIG DIVLTQSTPS VPVTPGESVS TSCRSSKSLI DSNGITLYLW FLQRPQSPQ LLIYRMSKLA SGVDFRFSGS GSETAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQPLEYP FTFGAGTKLE LNG
варибельная область легкой цепи антитела 5.35 без сигнального пептида	68	DIVLTQSTPS VPVTPGESVS TSCRSSKSLI DSNGITLYLW FLQRPQSPQ LLIYRMSKLA SGVDFRFSGS GSETAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQPLEYP FTFGAGTKLE LNG
варибельная область легкой цепи антитела 5.50	69	MKLPVRLVL MFWIPASSD VLMTQTPLSL PVSIGDQASI SCRSSQSILH SNGNTYLEWF LQKPGQSPKL LIYKVSNRFS GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDLGVY YCFQGSHPY TFGGGKLEI KR
варибельная область легкой цепи антитела 5.50 без сигнального пептида	70	D VLMTQTPLSL PVSIGDQASI SCRSSQSILH SNGNTYLEWF LQKPGQSPKL LIYKVSNRFS GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDLGVY YCFQGSHPY TFGGGKLEI KR
CDR1 тяжелой цепи антитела 5.35	71	GFSLNTFGLAVG
CDR2 тяжелой цепи антитела 5.35	72	HIWDDHKYYNGVLRS
CDR3 тяжелой цепи антитела 5.35	73	LETGTGFAY
CDR1 тяжелой цепи антитела 5.50	74	GFTFTDIYMN
CDR2 тяжелой цепи антитела 5.50	75	DINPNNGGTIYNQKFRG
CDR3 тяжелой цепи антитела 5.50	76	LPWYFDV
CDR1 легкой цепи	77	RSSKSLDSNGITYLY

антитела 5.35		
CDR2 легкой цепи антитела 5.35	78	RMSKLAS
CDR3 легкой цепи антитела 5.35	79	MQPLEYPPT
CDR1 легкой цепи антитела 5.50	80	RSSQSILHSNGNTYLE
CDR2 легкой цепи антитела 5.50	81	KVSNRFS
CDR3 легкой цепи антитела 5.50	82	FQGSHPVPT
мутант 1	83	APKSRFAMLDDVKI LANGLLQLGHGL
мутант 2	84	EAKSRFAMLDDVKI LANGLLQLGHGL
мутант 3	85	EPASRFAMLDDVKI LANGLLQLGHGL
мутант 4	86	EPKARFAMLDDVKI LANGLLQLGHGL
мутант 5	87	EPKSAFAMLDDVKI LANGLLQLGHGL
мутант 6	88	EPKSRAMLDDVKI LANGLLQLGHGL
мутант 8	89	EPKSRFAALDDVKI LANGLLQLGHGL
мутант 9	90	EPKSRFAMADDVKI LANGLLQLGHGL
мутант 10	91	EPKSRFAMLADVKI LANGLLQLGHGL
мутант 11	92	EPKSRFAMLDVAVKI LANGLLQLGHGL
мутант 12	93	EPKSRFAMLDDAKI LANGLLQLGHGL
мутант 13	94	EPKSRFAMLDVAI LANGLLQLGHGL
мутант 14	95	EPKSRFAMLDVAKALANGLLQLGHGL
мутант 15	96	EPKSRFAMLDVAKI LANGLLQLGHGL
мутант 17	97	EPKSRFAMLDVAKI LAAGLLQLGHGL
мутант 18	98	EPKSRFAMLDVAKI LANALLQLGHGL
мутант 19	99	EPKSRFAMLDVAKI LANGALQLGHGL
мутант 20	100	EPKSRFAMLDVAKI LANGLAQLGHGL
мутант 21	101	EPKSRFAMLDVAKI LANGLLALGHGL
мутант 22	102	EPKSRFAMLDVAKI LANGLLQAGHGL
мутант 23	103	EPKSRFAMLDVAKI LANGLLQLAHGL
мутант 24	104	EPKSRFAMLDVAKI LANGLLQLGAGL
мутант 25	105	EPKSRFAMLDVAKI LANGLLQLGHAL
мутант 26	106	EPKSRFAMLDVAKI LANGLLQLGHGA
мышиний ANGPTL4 (per. № NP_065606)	107	mrcaptagaa lvlcaatagl lsaqgrpaqp epprfaswde mnlahgllq lghglrehve rtrgqlgale rrmaacgnac qgpkgkdapf kdsedrpeg qtpetlqslq tqkkaqnski qqfkgvaqq qrylskqnlr iqnlqsqidl lapthldngv dktargkklk kmtqliglts nathlhrpar dcqelfqege rhsglfqiqp lgsppflvnc emtsdggwtv igrrlmgsvd fnqweaykd gfgdpqgef wlglekmsit gdrsgqlavq lqdwgnakl lqfpihlgge dtayslqlte ptnelgatn vspnglslpf stwdqdhdr gdlncaakls ggwwfgtcsh snlngqyfhv iprqrqerkk gifwktwkgv yyplqattll iqpmeataas
человеческий ANGPTL4 (per. № NP_647475)	108	msgaptagaa lmlcaatavi lsaqggpvqs keprfaswde mrvlahgllq lqgglrehae rtrsqslale rrlsacgsac qgtegstdlp lapesrvdpe vlhslqtqk agneriqqlf hkvagqqrhl ekqhlrighl qsqfglldhk hldhevakpa
		rrkrlpemaq pvdpahvsvr lhrprdcqe lfgvgerqsg lfeiqpqqsp pflvncmts dggwtviqrr hdgsvdfnrp weaykagfgd phgefvlgle kvhsitgdm srlavqlrdw dgnaelqfs vhlggedtay slqltapvag qlgattvpps glsvpfstwd qdhdlrrdkn caksllsggw fgtcshsnln ggyfrsipqg rqlkkqfif ktwrgryvpl qattmliqpm aaaaas
область SP1 мышинного ANGPTL4	109	QPEPPRFASW DEMNLLANGL LQLGHGL
область SP1 человеческого ANGPTL4	110	SKSRPFASWD EMNVLANGLL QLQQGL

Список последовательностей

<110> LEXICON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ANGPTL3

<130> 07705.0026-00304

<140>

<141>

<150> 60/873,834

<151> 2006-12-08

<160> 112

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 455

<212> ЕЕЛЮК

<213> Mus musculus

<400> 1

Met His Thr Ile Lys Leu Phe Leu Phe Val Val Pro Leu Val Ile Ala
 1 5 10 15

Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu
 20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125

Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln
 130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu His Pro Glu
 145 150 155 160

019661

Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg
 165 170 175

Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln
 180 185 190

His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile
 195 200 205

Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg Ala Pro Arg
 210 215 220

Thr Thr Pro Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr Glu Gln Asp
 225 230 235 240

Asp Leu Pro Ala Asp Cys Ser Ala Val Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255

Ser Gly Val Tyr Thr Ile Lys Pro Arg Asn Ser Gln Gly Phe Asn Val
 260 265 270

Tyr Cys Asp Thr Gln Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285

Lys Asp Gly Ser Gln Asp Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Glu Lys
 290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320

Tyr Ala Ile Val Gln Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Leu Glu Leu Gln
 325 330 335

Asp Trp Lys Asp Ser Lys His Tyr Val Glu Tyr Ser Phe His Leu Gly
 340 345 350

Ser His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Val Ala Glu Ile Ala Gly Asn
 355 360 365

Ile Pro Gly Ala Leu Pro Glu His Thr Asp Leu Met Phe Ser Thr Trp
 370 375 380

Asn His Arg Ala Lys Gly Gln Leu Tyr Cys Pro Glu Ser Tyr Ser Gly
 385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp Asn Asp Ile Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415

019661

Tyr Asn Lys Pro Arg Thr Lys Ser Arg Pro Glu Arg Arg Arg Gly Ile
 420 425 430

Tyr Trp Arg Pro Gln Ser Arg Lys Leu Tyr Ala Ile Lys Ser Ser Lys
 435 440 445

Met Met Leu Gln Pro Thr Thr
 450 455

<210> 2

<211> 462

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 2

Met His Thr Ile Lys Leu Phe Leu Phe Val Val Pro Leu Val Ile Ala
 1 5 10 15

Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu
 20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125

Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln
 130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu His Pro Glu
 145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg
 165 170 175

019661

Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln
 180 185 190
 His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile
 195 200 205
 Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg Ala Pro Arg
 210 215 220
 Thr Thr Pro Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr Glu Gln Asp
 225 230 235 240
 Asp Leu Pro Ala Asp Cys Ser Ala Val Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255
 Ser Gly Val Tyr Thr Ile Lys Pro Arg Asn Ser Gln Gly Phe Asn Val
 260 265 270
 Tyr Cys Asp Thr Gln Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285
 Lys Asp Gly Ser Gln Asp Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Glu Lys
 290 295 300
 Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320
 Tyr Ala Ile Val Gln Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Leu Glu Leu Gln
 325 330 335
 Asp Trp Lys Asp Ser Lys His Tyr Val Glu Tyr Ser Phe His Leu Gly
 340 345 350
 Ser His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Val Ala Glu Ile Ala Gly Asn
 355 360 365
 Ile Pro Gly Ala Leu Pro Glu His Thr Asp Leu Met Phe Ser Thr Trp
 370 375 380
 Asn His Arg Ala Lys Gly Gln Leu Tyr Cys Pro Glu Ser Tyr Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Trp Trp Trp Asn Asp Ile Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415
 Tyr Asn Lys Pro Arg Thr Lys Ser Arg Pro Glu Arg Arg Arg Gly Ile
 420 425 430

019661

Tyr Trp Arg Pro Gln Ser Arg Lys Leu Tyr Ala Ile Lys Ser Ser Lys
 435 440 445

Met Met Leu Gln Pro Thr Thr Gly His His His His His His
 450 455 460

<210> 3
 <211> 460
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
 1 5 10 15

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
 20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125

Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
 130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
 145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
 165 170 175

Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
 180 185 190

019661

His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
 195 200 205

Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
 210 215 220

Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
 225 230 235 240

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
 260 265 270

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
 290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
 325 330 335

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
 340 345 350

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
 355 360 365

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
 370 375 380

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
 385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
 420 425 430

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
 435 440 445

019661

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
 450 455 460

<210> 4
 <211> 467
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 4
 Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
 1 5 10 15

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
 20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125

Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
 130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
 145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
 165 170 175

Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
 180 185 190

His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
 195 200 205

019661

Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
 210 215 220

Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
 225 230 235 240

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
 260 265 270

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
 290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
 325 330 335

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
 340 345 350

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
 355 360 365

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
 370 375 380

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
 385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
 420 425 430

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
 435 440 445

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu Gly His His His
 450 455 460

His His His
465

<210> 5
<211> 1605
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 5
tcaggaggga gaagttccaa attgcttaaa attgaataat tgagacaaaa aatgcacaca 60
attdaaattat tcctttttgt tgttccttta gtaattgcat ccagagtgga tccagacctt 120
tcatcatttg attctgcacc ttcagagcca aatcaagat ttgctatggt ggatgatgtc 180
aaaattttag cgaatggcct cctgcagctg ggctcatggac ttaaagattt tgtccataag 240
actaagggac aaattaacga catatttcag aagctcaaca tatttgatca gtcctttttat 300
gacctatcac ttcgaaccaa tgaaatcaaa gaagaggaaa aggagctaag aagaactaca 360
tctacactac aagttaaaaa cgaggagggtg aagaacatgt cagtagaact gaactcaaag 420
cttgagagtc tgctggaaga gaagacagcc cttcaacaca aggtcagggc tttggaggag 480
cagctaacca acttaattct aagcccagct ggggctcagg agcaccaga agtaacatca 540
ctcaaaagt ttgtagaaca gcaagacaac agcataagag aactcctcca gagtgggaa 600
gaacagtata aacaattaag tcaacagcac atgcagataa aagaaataga aaagcagctc 660
agaaagactg gtattcaaga accctcagaa aattctcttt cttctaaatc aagagcacca 720
agaactactc cccctcttca actgaacgaa acagaaaata cagaacaaga tgaccttctt 780
gocgactgct ctgccgttta taacagaggc gaacatacaa gtggcgtgta cactattdaa 840
ccaagaaact cccaagggtt taatgtctac tgtgatacc c aatcaggcag tccatggaca 900
ttaattcaac accggaaga tggctcacag gacttcaacg aaacatggga aaactacgaa 960
aagggtttg ggaggctcga tggagaattt tggttgggccc tagagaagat ctatgctata 1020
gtccaacagt ctaactacat tttacgactc gagctacaag actggaaaaga cagcaagcac 1080
tacgttgaat actcctttca cctgggcagt cacgaaacca actacacgct acatgtggct 1140
gagattgctg gcaatatccc tggggccctc ccagagcaca cagacctgat gttttctaca 1200
tggaatcaca gagcaaaggg acagctctac tgtccagaaa gttactcagg tggetgggtg 1260
tggaatgaca tatgtggaga aaacaacct aatggaaaat acaacaaacc cagaacccaaa 1320
tccagaccag agagaagaag agggatctac tggagacctc agagcagaaa gctctatgct 1380
atcaaatcat ccaaatgat gctccagccc accacctaag aagcttcaac tgaactgaga 1440
caaaaataaaa gatcaataaa ttaaatatta aagtcctccc gatcaactgta gtaatctggt 1500
attdaaattt taatggaaag cttgagaatt gaatttcaat taggtttaaa ctcattgtta 1560

019661

```

agatcagata tcaccgaatc aacgtaaaca aaatztatct ttttc 1605

<210> 6
<211> 2126
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 6
ttccagaaga aaacagttcc acgttgcttg aaattgaaaa tcaagataaa aatgttcaca 60
attaagctcc ttctttttat tgttcctcta gttatttctc ccagaattga tcaagacaat 120
tcatcatttg attctctatc tccagagcca aaatcaagat ttgctatggt agacgatgta 180
aaaatthtag ccaatggcct ccttcagttg ggacatggtc ttaaagactt tgtccataag 240
acgaagggcc aaattaatga catatttcaa aaactcaaca tatttgatca gtctttttat 300
gatctatcgc tgcaaacccag tgaatcaaa gaagaagaaa aggaactgag aagaactaca 360
tataaactac aagtcaaaaa tgaagaggta aagaatatgt cacttgaact caactcaaaa 420
cttgaaaagcc tcctagaaga aaaaattcta cttcaacaaa aagtgaataa tttagaagag 480
caactaacta acttaattca aaatcaacct gaaactccag aacaccaga agtaacttca 540
cttaaaactt ttgtagaaaa acaagataat agcatcaaag accttctcca gaccgtggaa 600
gaccaatata aacaattaaa ccaacagcat agtcaaataa aagaaataga aaatcagctc 660
agaaggacta gtattcaaga acccacagaa atttctctat cttccaagcc aagagcacca 720
agaactactc cctttcttca gttgaatgaa ataagaaatg taaaacatga tggcattcct 780
gctgaatgta ccaccattta taacagaggt gaacatacaa gtggcatgta tgccatcaga 840
cccagcaact ctcaagtttt tcatgtctac tgtgatgta tatcaggtag tccatggaca 900
ttaattcaac atcgaataga tggatcacia aacttcaatg aaacgtggga gaactacaaa 960
tatggthttg ggaggcttga tggagaattt tggthgggccc tagagaagat atactccata 1020
gtgaagcaat ctaattatgt tttacgaatt gagttggaag actggaaga caacaaacat 1080
tatattgaat attctthtta cttgggaaat cacgaaacca actatacgcct acatctagtt 1140
gcgattactg gcaatgtccc caatgcaatc ccggaaaaca aagatttggg gthttctact 1200
tgggatcaca aagcaaaaag acaacttcaac tgtccagagg gttattcagg aggctggtgg 1260
tggcatgatg agtgtggaga aaacaacct aatggtaaat ataacaaacc aagagcaaaa 1320
tctaagccag agaggagaag aggattatct tggaaagtctc aaaatggaag gttatactct 1380
ataaaatcaa ccaaaatggt gatccatcca acagattcag aaagcttga atgaactgag 1440
gcaaatttaa aaggcaataa tttaaacatt aacctcatc caagttaatg tggctcaata 1500
atctggtatt aaatccttaa gagaaagctt gagaaataga thttthttat cttaaagtca 1560
ctgtctatth aagattaaac atacaatcac ataaccttaa agaataccgt ttacatthct 1620
caatcaaaat thttataata ctatthgtth taaatthgtt gatgtgggaa tcaatthtag 1680

```

019661

atggtcacaa tctagattat aatcaatagg tgaacttatt aaataacttt tctaaataaa 1740
 aaatttagag actttttattt taaaaggcat catatgagct aatatcaciaa ctttcccagt 1800
 ttaaaaaact agtactcttg ttaaaactct aaacttgact aaatacagag gactggtaat 1860
 tgtacagttc ttaaatgttg tagtattaat ttcaaaacta aaaatcgta gacacagagta 1920
 tgtgtaaaaa tctgtaatac aaatttttaa actgatgctt cattttgcta caaaataatt 1980
 tggagtaaat gtttgatag atttatttat gaaacctaata gaagcagaat taaatactgt 2040
 attaaataa gttcgctgtc tttaacaaa tggagatgac tactaagtca cattgacttt 2100
 aacatgaggt atcactatac cttatt 2126

<210> 7

<211> 232

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 7

Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 20 25 30

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 35 40 45

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 50 55 60

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

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 85 90 95

Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 100 105 110

Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln
 115 120 125

Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu His Pro Glu
 130 135 140

019661

Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln
 165 170 175

His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile
 180 185 190

Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg Ala Pro Arg
 195 200 205

Thr Thr Pro Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr Glu Gln Asp
 210 215 220

Leu Glu His His His His His His
 225 230

<210> 8
 <211> 232
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 конструкция

<400> 8
 Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu Pro Lys Ser
 1 5 10 15

Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn Gly Leu Leu
 20 25 30

Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr Lys Gly Gln
 35 40 45

Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln Ser Phe Tyr
 50 55 60

Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu Lys Glu Leu
 65 70 75 80

Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu Val Lys Asn
 85 90 95

Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu Glu Glu Lys
 100 105 110

Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln Leu Thr Asn
 115 120 125

019661

Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu Val Thr Ser
 130 135 140

Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys Asp Leu Leu
 145 150 155 160

Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln His Ser Gln
 165 170 175

Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile Gln Glu Pro
 180 185 190

Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg Thr Thr Pro
 195 200 205

Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
 210 215 220

Leu Glu His His His His His His
 225 230

<210> 9
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<400> 9
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 10
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 11
 <211> 50
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<400> 11

019661

Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 20 25 30

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 35 40 45

Lys Gly
 50

<210> 12
 <211> 50
 <212> EEJOK
 <213> Mus musculus

<400> 12
 Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 1 5 10 15

Lys Asp Phe Val His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln
 20 25 30

Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr
 35 40 45

Asn Glu
 50

<210> 13
 <211> 50
 <212> EEJOK
 <213> Mus musculus

<400> 13
 Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln Ser Phe
 1 5 10 15

Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu Lys Glu
 20 25 30

Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu Val Lys
 35 40 45

Asn Met
 50

<210> 14
 <211> 50
 <212> EEJOK
 <213> Mus musculus

019661

<400> 14
 Ile Lys Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Val Lys Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys
 20 25 30

Leu Glu Ser Leu Leu Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg
 35 40 45

Ala Leu
 50

<210> 15
 <211> 50
 <212> BEJOK
 <213> Mus musculus

<400> 15
 Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu Glu Glu Lys Thr
 1 5 10 15

Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu
 20 25 30

Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu His Pro Glu Val Thr Ser Leu
 35 40 45

Lys Ser
 50

<210> 16
 <211> 50
 <212> BEJOK
 <213> Mus musculus

<400> 16
 Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu
 1 5 10 15

His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn
 20 25 30

Ser Ile Arg Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu
 35 40 45

Ser Gln
 50

<210> 17
 <211> 50

019661

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<400> 17

Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg Glu Leu Leu Gln Ser Val
 1 5 10 15

Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln His Met Gln Ile Lys Glu
 20 25 30

Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile Gln Glu Pro Ser Glu Asn
 35 40 45

Ser Leu
 50

<210> 18

<211> 50

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<400> 18

Gln His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly
 1 5 10 15

Ile Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg Ala Pro
 20 25 30

Arg Thr Thr Pro Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr Glu Gln
 35 40 45

Asp Asp
 50

<210> 19

<211> 139

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 19

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

019661

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
 130 135

<210> 20
 <211> 120
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 конструкция

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

019661

<210> 21
 <211> 139
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 21
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Ile Ser Cys Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
 130 135

<210> 22
 <211> 120
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Cys
 20 25 30

019661

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 23

<211> 139

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 23

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

019661

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
 130 135

<210> 24
 <211> 120
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 конструкция

<400> 24
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 25
 <211> 139
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 консенсусная последовательность

<400> 25
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15

019661

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
130 135

<210> 26

<211> 120

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
консенсусная последовательность

<400> 26

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

019661

Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 27
 <211> 127
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 конструкция

<400> 27
 Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile
 35 40 45

Ser Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn
 85 90 95

Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr
 100 105 110

Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 28
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 конструкция

<400> 28
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

019661

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 29

<211> 127

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 29

Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Ile Arg Cys Glu Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Trp Ala Ser Gln Asp Ile
 35 40 45

Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn
 85 90 95

Leu Lys Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr
 100 105 110

019661

Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 30
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 конструкция

<400> 30
 Glu Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Trp Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Lys Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 31
 <211> 127
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 конструкция

<400> 31
 Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile
 35 40 45

019661

Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn
85 90 95

Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr
100 105 110

Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210> 32
<211> 108
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 32
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 33
<211> 127
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

019661

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая консенсусная последовательность

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Варибельная аминокислота

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (49)..(49)
 <223> Варибельная аминокислота

<400> 33
 Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln Gly
 1 5 10 15
 Xaa Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile
 35 40 45
 Xaa Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys
 50 55 60
 Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn
 85 90 95
 Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr
 100 105 110
 Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 34
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая консенсусная последовательность

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> Варибельная аминокислота

<400> 34
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

019661

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Xaa Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 35
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 35
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His
1 5 10

<210> 36
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 36
Tyr Phe Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 37
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический

пептид

<400> 37
 Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 38
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 38
 Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Cys Val Met His
 1 5 10

<210> 39
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 39
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 40
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 40
 Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 41
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 41
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His

<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 46
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 47
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 47
Trp Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 48
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 48
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 49
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 50
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 50
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 51
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 51
 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 52
 Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
 1 5

<210> 53
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая консенсусная последовательность

<400> 53
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His
 1 5 10

<210> 54
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая консенсусная последовательность

<400> 54
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

019661

<210> 55
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
консенсусная последовательность

<400> 55
Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 56
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
консенсусная последовательность

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Вариабельная аминокислота

<400> 56
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Xaa Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 57
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
консенсусная последовательность

<400> 57
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
консенсусная последовательность

<400> 58
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 59
<211> 224

019661

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<400> 59

Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 20 25 30

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 35 40 45

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 50 55 60

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

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 85 90 95

Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 100 105 110

Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln
 115 120 125

Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu His Pro Glu
 130 135 140

Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln
 165 170 175

His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile
 180 185 190

Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg Ala Pro Arg
 195 200 205

Thr Thr Pro Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr Glu Gln Asp
 210 215 220

<210> 60

<211> 224

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

019661

<400> 60

Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu Pro Lys Ser
 1 5 10 15

Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn Gly Leu Leu
 20 25 30

Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr Lys Gly Gln
 35 40 45

Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln Ser Phe Tyr
 50 55 60

Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu Lys Glu Leu
 65 70 75 80

Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu Val Lys Asn
 85 90 95

Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu Glu Glu Lys
 100 105 110

Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln Leu Thr Asn
 115 120 125

Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu Val Thr Ser
 130 135 140

Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys Asp Leu Leu
 145 150 155 160

Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln His Ser Gln
 165 170 175

Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile Gln Glu Pro
 180 185 190

Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg Thr Thr Pro
 195 200 205

Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
 210 215 220

<210> 61

<211> 75

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<400> 61

019661

Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 1 5 10 15

Lys Asp Phe Val His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln
 20 25 30

Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr
 35 40 45

Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr
 50 55 60

Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu Val Lys Asn Met
 65 70 75

<210> 62

<211> 27

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 62

Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Cys
 20 25

<210> 63

<211> 139

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 63

Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu His
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Asn Thr Phe Gly Leu Ala Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60

019661

Gly Leu Glu Trp Leu Gly His Ile Trp Trp Asp Asp His Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Gly Val Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys
85 90 95

Lys Gln Val Phe Leu Arg Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Glu Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
130 135

<210> 64

<211> 120

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 64

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Phe
20 25 30

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

Trp Leu Gly His Ile Trp Trp Asp Asp His Lys Tyr Tyr Asn Gly Val
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Lys Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Arg Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Leu Glu Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
115 120

<210> 65

<211> 136

019661

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция
 <400> 65
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Val Arg Leu Pro Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135
 <210> 66
 <211> 117
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция
 <400> 66
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

019661

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Leu Pro Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 67

<211> 133

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 67

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Thr Pro Ser Val Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu Asp Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Ala Phe
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln Pro Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

019661

Leu Glu Leu Asn Gly
130

<210> 68

<211> 113

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 68

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Asn
100 105 110

Gly

<210> 69

<211> 132

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая конструкция

<400> 69

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

019661

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45

Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 70
 <211> 113
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 конструкция

<400> 70
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser
 20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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

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

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 71
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 71
 Gly Phe Ser Leu Asn Thr Phe Gly Leu Ala Val Gly
 1 5 10

<210> 72
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 72
 His Ile Trp Trp Asp Asp His Lys Tyr Tyr Asn Gly Val Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 73
 Leu Glu Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 74
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 74
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
 1 5 10

<210> 75
 <211> 17

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 75
 Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 76
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 76
 Leu Pro Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 77
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 77
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asp Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 78
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 78
 Arg Met Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 79
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 79
Met Gln Pro Leu Glu Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 80
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 80
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 81
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 81
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 82
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 83
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 83
Ala Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15

019661

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
20 25

<210> 84
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 84
Glu Ala Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
20 25

<210> 85
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 85
Glu Pro Ala Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
20 25

<210> 86
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 86
Glu Pro Lys Ala Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
20 25

<210> 87
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<210> 91
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 91
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Ala Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 92
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 92
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Ala Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 93
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 93
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Ala Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 94
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

019661

<400> 94

Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Ala Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 95

<211> 26

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 95

Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 96

<211> 26

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 96

Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Ala Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 97

<211> 26

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 97

Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 98
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 98
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

 Asn Ala Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 99
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 99
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

 Asn Gly Ala Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 100
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 100
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

 Asn Gly Leu Ala Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

<210> 101
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 101

019661

Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Ala Leu Gly His Gly Leu
20 25

<210> 102
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 102
Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Ala Gly His Gly Leu
20 25

<210> 103
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 103
Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Ala His Gly Leu
20 25

<210> 104
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 104
Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15

Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly Ala Gly Leu
20 25

<210> 105
<211> 26

019661

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 105
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

 Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Ala Leu
 20 25

 <210> 106
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 106
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

 Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Ala
 20 25

 <210> 107
 <211> 410
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus
 <400> 107
 Met Arg Cys Ala Pro Thr Ala Gly Ala Ala Leu Val Leu Cys Ala Ala
 1 5 10 15

 Thr Ala Gly Leu Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Ala Gln Pro Glu Pro
 20 25 30

 Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Leu Leu Ala His Gly Leu
 35 40 45

 Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Arg Glu His Val Glu Arg Thr Arg Gly
 50 55 60

 Gln Leu Gly Ala Leu Glu Arg Arg Met Ala Ala Cys Gly Asn Ala Cys
 65 70 75 80

 Gln Gly Pro Lys Gly Lys Asp Ala Pro Phe Lys Asp Ser Glu Asp Arg
 85 90 95

019661

Val Pro Glu Gly Gln Thr Pro Glu Thr Leu Gln Ser Leu Gln Thr Gln
 100 105 110

Leu Lys Ala Gln Asn Ser Lys Ile Gln Gln Leu Phe Gln Lys Val Ala
 115 120 125

Gln Gln Gln Arg Tyr Leu Ser Lys Gln Asn Leu Arg Ile Gln Asn Leu
 130 135 140

Gln Ser Gln Ile Asp Leu Leu Ala Pro Thr His Leu Asp Asn Gly Val
 145 150 155 160

Asp Lys Thr Ser Arg Gly Lys Lys Leu Ser Lys Met Thr Gln Leu Ile
 165 170 175

Gly Leu Thr Ser Asn Ala Thr His Leu His Arg Pro Ala Arg Asp Cys
 180 185 190

Gln Glu Leu Phe Gln Glu Gly Glu Arg His Ser Gly Leu Phe Gln Ile
 195 200 205

Gln Pro Leu Gly Ser Pro Pro Phe Leu Val Asn Cys Glu Met Thr Ser
 210 215 220

Asp Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Arg Arg Leu Asn Gly Ser Val Asp
 225 230 235 240

Phe Asn Gln Ser Trp Glu Ala Tyr Lys Asp Gly Phe Gly Asp Pro Gln
 245 250 255

Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Met His Ser Ile Thr Gly Asp
 260 265 270

Arg Gly Ser Gln Leu Ala Val Gln Leu Gln Asp Trp Asp Gly Asn Ala
 275 280 285

Lys Leu Leu Gln Phe Pro Ile His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr
 290 295 300

Ser Leu Gln Leu Thr Glu Pro Thr Ala Asn Glu Leu Gly Ala Thr Asn
 305 310 315 320

Val Ser Pro Asn Gly Leu Ser Leu Pro Phe Ser Thr Trp Asp Gln Asp
 325 330 335

His Asp Leu Arg Gly Asp Leu Asn Cys Ala Lys Ser Leu Ser Gly Gly
 340 345 350

019661

Trp Trp Phe Gly Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn Gly Gln Tyr Phe
355 360 365

His Ser Ile Pro Arg Gln Arg Gln Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Trp
370 375 380

Lys Thr Trp Lys Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu Gln Ala Thr Thr Leu Leu
385 390 395 400

Ile Gln Pro Met Glu Ala Thr Ala Ala Ser
405 410

<210> 108

<211> 406

<212> БЕЛГОК

<213> Homo sapiens

<400> 108

Met Ser Gly Ala Pro Thr Ala Gly Ala Ala Leu Met Leu Cys Ala Ala
1 5 10 15

Thr Ala Val Leu Leu Ser Ala Gln Gly Gly Pro Val Gln Ser Lys Ser
20 25 30

Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Val Leu Ala His Gly Leu
35 40 45

Leu Gln Leu Gly Gln Gly Leu Arg Glu His Ala Glu Arg Thr Arg Ser
50 55 60

Gln Leu Ser Ala Leu Glu Arg Arg Leu Ser Ala Cys Gly Ser Ala Cys
65 70 75 80

Gln Gly Thr Glu Gly Ser Thr Asp Leu Pro Leu Ala Pro Glu Ser Arg
85 90 95

Val Asp Pro Glu Val Leu His Ser Leu Gln Thr Gln Leu Lys Ala Gln
100 105 110

Asn Ser Arg Ile Gln Gln Leu Phe His Lys Val Ala Gln Gln Gln Arg
115 120 125

His Leu Glu Lys Gln His Leu Arg Ile Gln His Leu Gln Ser Gln Phe
130 135 140

Gly Leu Leu Asp His Lys His Leu Asp His Glu Val Ala Lys Pro Ala
145 150 155 160

Arg Arg Lys Arg Leu Pro Glu Met Ala Gln Pro Val Asp Pro Ala His
165 170 175

019661

Asn Val Ser Arg Leu His Arg Leu Pro Arg Asp Cys Gln Glu Leu Phe
 180 185 190

Gln Val Gly Glu Arg Gln Ser Gly Leu Phe Glu Ile Gln Pro Gln Gly
 195 200 205

Ser Pro Pro Phe Leu Val Asn Cys Lys Met Thr Ser Asp Gly Gly Trp
 210 215 220

Thr Val Ile Gln Arg Arg His Asp Gly Ser Val Asp Phe Asn Arg Pro
 225 230 235 240

Trp Glu Ala Tyr Lys Ala Gly Phe Gly Asp Pro His Gly Glu Phe Trp
 245 250 255

Leu Gly Leu Glu Lys Val His Ser Ile Thr Gly Asp Arg Asn Ser Arg
 260 265 270

Leu Ala Val Gln Leu Arg Asp Trp Asp Gly Asn Ala Glu Leu Leu Gln
 275 280 285

Phe Ser Val His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Leu Gln Leu
 290 295 300

Thr Ala Pro Val Ala Gly Gln Leu Gly Ala Thr Thr Val Pro Pro Ser
 305 310 315 320

Gly Leu Ser Val Pro Phe Ser Thr Trp Asp Gln Asp His Asp Leu Arg
 325 330 335

Arg Asp Lys Asn Cys Ala Lys Ser Leu Ser Gly Gly Trp Trp Phe Gly
 340 345 350

Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn Gly Gln Tyr Phe Arg Ser Ile Pro
 355 360 365

Gln Gln Arg Gln Lys Leu Lys Lys Gly Ile Phe Trp Lys Thr Trp Arg
 370 375 380

Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu Gln Ala Thr Thr Met Leu Ile Gln Pro Met
 385 390 395 400

Ala Ala Glu Ala Ala Ser
 405

<210> 109
 <211> 27

<212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

 <400> 109
 Gln Pro Glu Pro Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Leu Leu
 1 5 10 15

 Ala His Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

 <210> 110
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 110
 Ser Lys Ser Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Val Leu Ala
 1 5 10 15

 His Gly Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Leu
 20 25

 <210> 111
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 6xHis метка

 <400> 111
 His His His His His His
 1 5

 <210> 112
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид

 <400> 112
 Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
 1 5 10 15

 Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
 20 25

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое связывается с ANGPTL3 и нейтрализует по меньшей мере одну активность ANGPTL3, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где:
 - a) тяжелая цепь содержит:
 - i) аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 64 и 66; или
 - ii) по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 35-43, 53-55 и 71-76;
 - b) легкая цепь содержит:
 - i) аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 30, 32, 34, 68 и 70; или
 - ii) по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44-52, 56-58 и 77-82.
2. Моноклональное антитело по п.1, где указанное моноклональное антитело представляет собой мышиное моноклональное антитело.
3. Моноклональное антитело по п.1, где указанное моноклональное антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело.
4. Моноклональное антитело по п.1, где указанное моноклональное антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело.
5. Моноклональное антитело по п.1, где указанное моноклональное антитело способствует снижению уровня по меньшей мере одного липида сыворотки in vivo.

цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

17. Моноклональное антитело по п.1, где указанное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, с K_D менее чем 50 нМ.

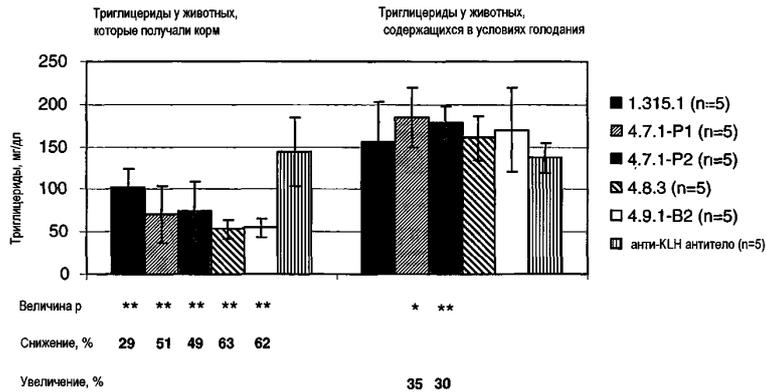
18. Моноклональное антитело по п.17, где указанное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, с K_D менее чем 30 нМ.

19. Моноклональное антитело по п.17, где указанное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, с K_D менее чем 10 нМ.

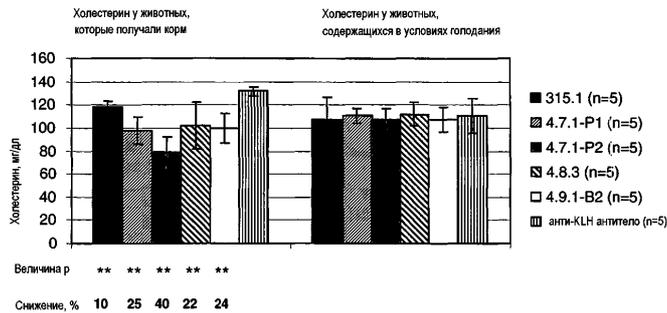
20. Моноклональное антитело по п.17, где указанное антитело связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, с K_D менее чем 5 нМ.

21. Моноклональное антитело по п.1, где указанное антитело представляет собой фрагмент антитела.

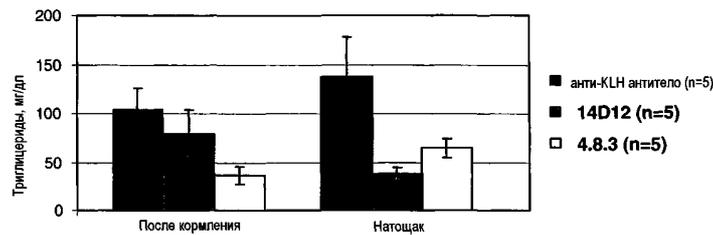
22. Моноклональное антитело по п.21, где указанное антитело представляет собой scFv-фрагмент, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fab'-фрагмент.



Фиг. 1

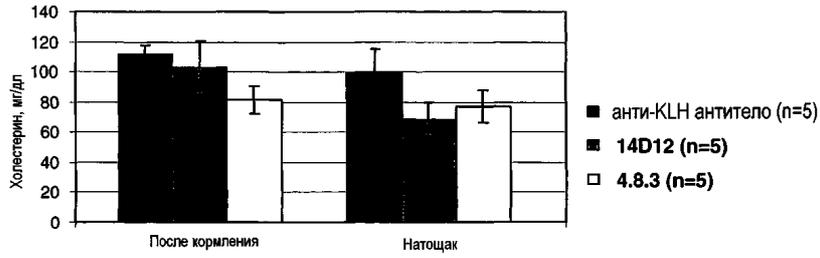


Фиг. 2



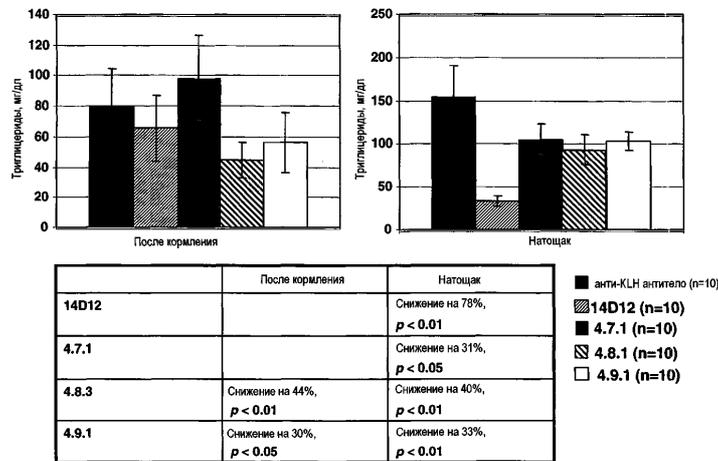
	После кормления	Натощак
14D12		Снижение на 72%, $p < 0.01$
4.8.3	Снижение на 65%, $p < 0.01$	Снижение на 53%, $p < 0.01$

Фиг. 3

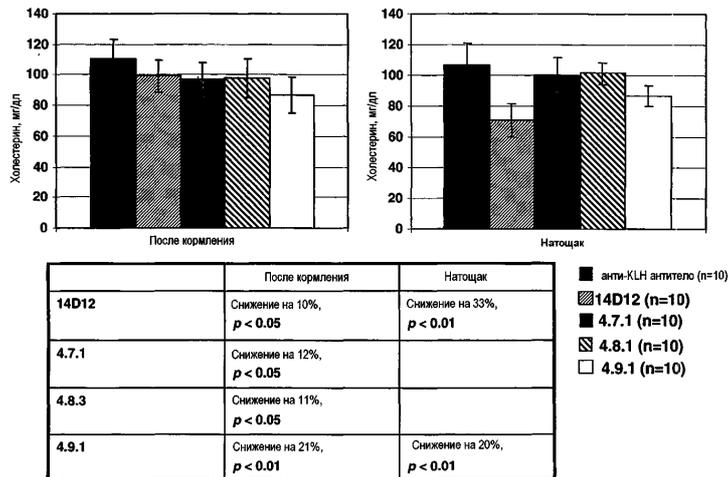


	После кормления	Натоцак
14D12		Снижение на 31%, $p < 0.01$
4.8.3	Снижение на 27%, $p < 0.01$	Снижение на 22%, $p < 0.05$

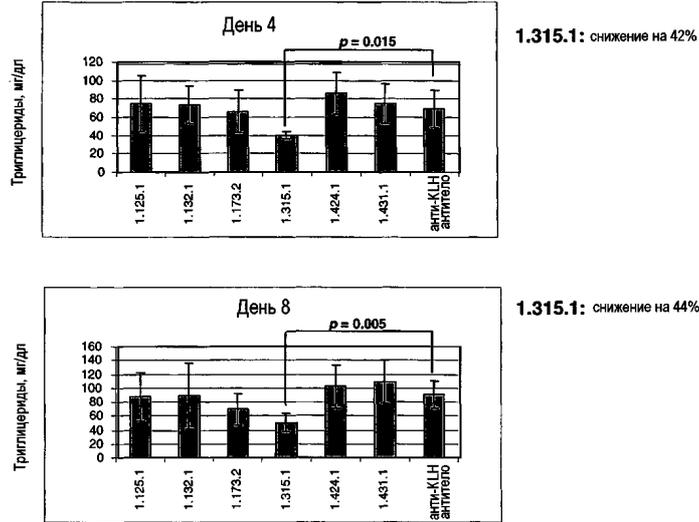
Фиг. 4



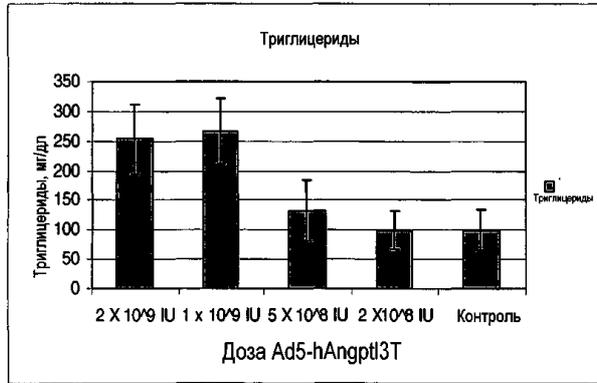
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



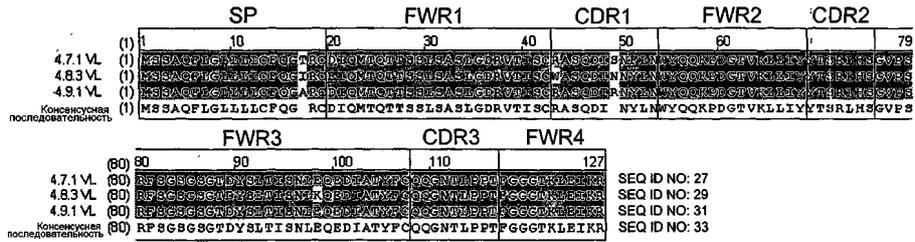
Фиг. 8



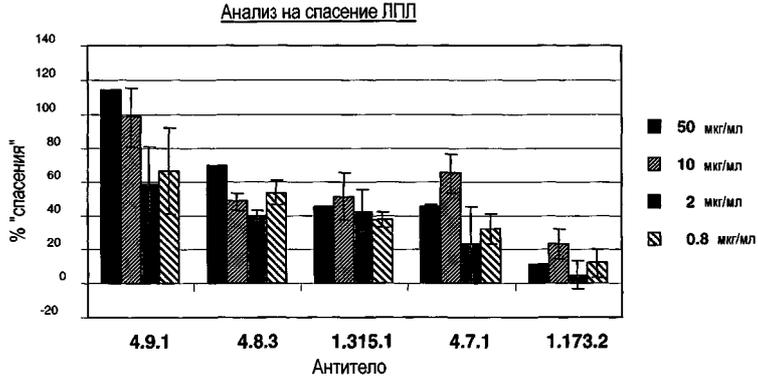
Фиг. 9

	SP		FWR1		CDR1	FWR2		CDR2
	10	20	30	40	50	60	70	79
4.7.1 VH	M E W S W I F P F L L S G T A G V H S E V Q L Q Q S G P P L V K P G A S V R M S C K A S G Y T F T S Y V M H M V R Q K P G Q G L E N I G Y I N P Y N D G T K Y							
4.8.3 VH	M E W S W I F P F L L S G T A G V H S E V Q L Q Q S G P P L V K P G A S V R M S C K A S G Y T F T S Y V M H M V R Q K P G Q G L E N I G Y I N P Y N D G T K Y							
4.9.1 VH	M E W S W I F P F L L S G T A G V H S E V Q L Q Q S G P P L V K P G A S V R M S C K A S G Y T F T S Y V M H M V R Q K P G Q G L E N I G Y I N P Y N D G T K Y							
Консенсусная последовательность	M E W S W I F P F L L S G T A G V H S E V Q L Q Q S G P P L V K P G A S V R M S C K A S G Y T F T S Y V M H M V R Q K P G Q G L E N I G Y I N P Y N D G T K Y							
	FWR3		CDR3		FWR4			
	80	90	100	110	120	130		
4.7.1 VH	M E K F R G K A T L T S D K S S S T A Y M E L S S L T S E D S A V Y Y C A R E G D Y Y G Y F D Y M G Q G T L T V S S A						SEQ ID NO: 19	
4.8.3 VH	M E K F R G K A T L T S D K S S S T A Y M E L S S L T S E D S A V Y Y C A R E G D Y Y G Y F D Y M G Q G T L T V S S A						SEQ ID NO: 21	
4.9.1 VH	M E K F R G K A T L T S D K S S S T A Y M E L S S L T S E D S A V Y Y C A R E G D Y Y G Y F D Y M G Q G T L T V S S A						SEQ ID NO: 23	
Консенсусная последовательность	M E K F R G K A T L T S D K S S S T A Y M E L S S L T S E D S A V Y Y C A R E G D Y Y G Y F D Y M G Q G T L T V S S A						SEQ ID NO: 25	

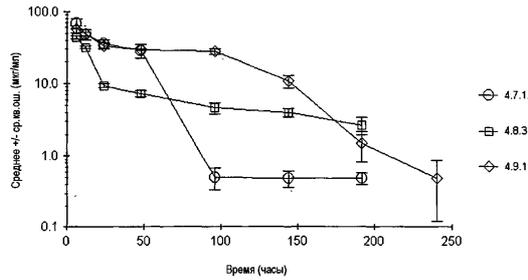
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

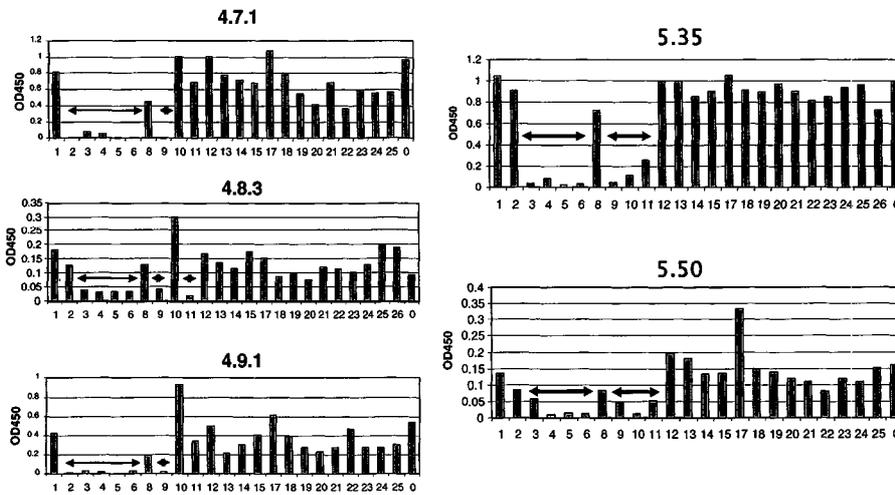


Систематизированные данные анализа на NCA

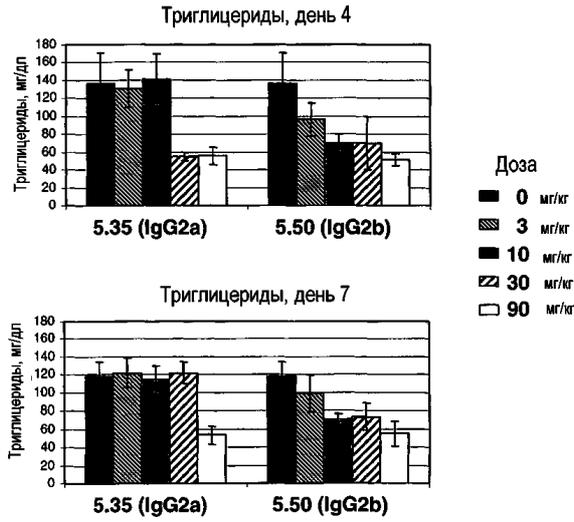
	T1/2 (часы)	Tmax (часы)	Cmax (мкг/мл)	AUClast (мкг*часы/мл)	AUCinf (мкг*часы/мл)	Vz/F (мл/кг)	CL_F (мл/часы/кг)	MRT (часы)
4.7.1.*		6	68.4	2570				
4.8.3.	97.8	6	44.1	1458	1838	2302	16.3	113.7
4.9.1.	23.7	6	57.5	4370	4387	233	6.8	67.3

Фиг. 13

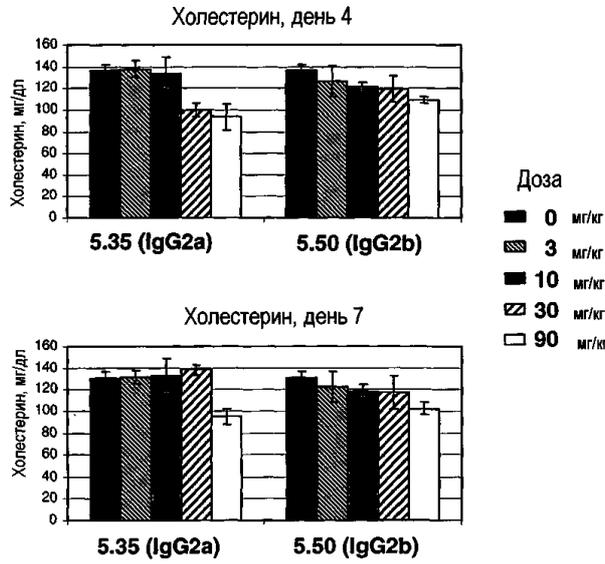
Аланин-сканирующий мутагенез пептида SP1



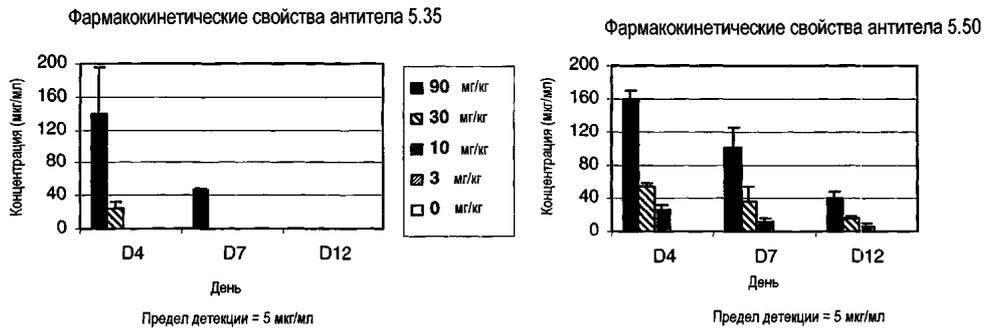
Фиг. 14



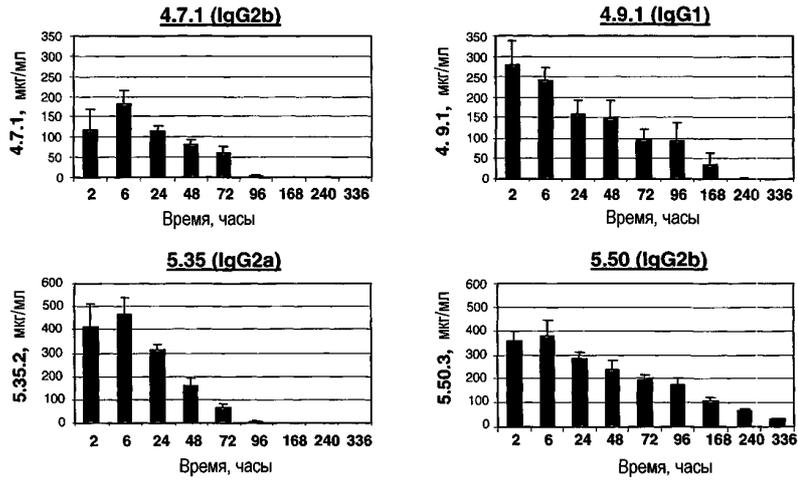
Фиг. 15



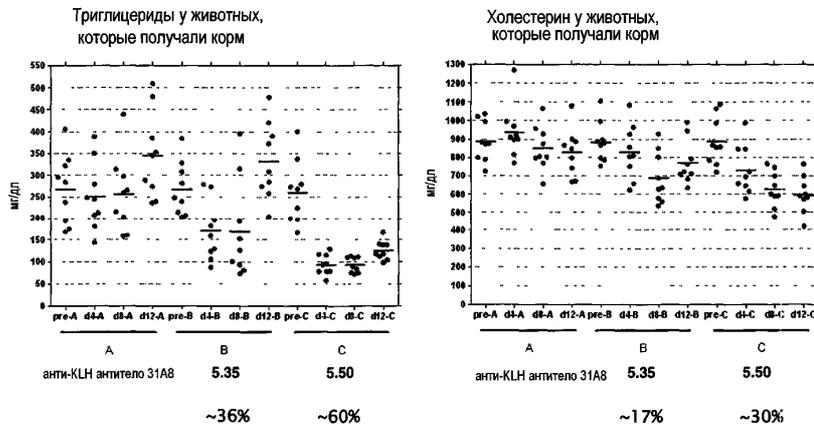
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

