

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039191**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.15

(21) Номер заявки
201990170

(22) Дата подачи заявки
2017.12.29

(51) Int. Cl. **C07K 16/40** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИ-PCSK9 АНТИТЕЛО

(31) **201710052879.8**

(32) **2017.01.22**

(33) **CN**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/CN2017/119822**

(87) **WO 2018/133649 2018.07.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЕЙДЗИН ДУНФАН БАЙОТЕК КО.,
ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Бай И, Ли Сяоминь, Чжан Вэнь, Вэнь
Шэнмэй (CN)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) **CN-A-106749670**
CN-A-105348390
CN-A-103261230
CN-A-102245641
CN-A-105315371
WO-A2-2014150983

(57) Предложены моноклональное анти-PCSK9 (пропротеиновая конвертаза субтилизин/кексинового типа 9) антитело, аминокислотная последовательность, содержащая переменные области и CDR области кодируемого антитела, способ получения этого моноклонального антитела и его применения. Моноклональные антитела к PCSK9 получают из фаговой библиотеки антител посредством скрининга; созревание аффинности достигается с использованием способа, в котором фаговую библиотеку антител конструируют посредством замещения цепей; библиотеку создают для скрининга мутаций в областях CDR1, 2, 3 легкой цепи моноклональных антител, полученных при первичном скрининге; выбирают моноклональные антитела, имеющие высокую аффинность, и затем библиотеку создают для скрининга мутаций в областях CDR1, 2, 3 тяжелой цепи моноклональных антител, имеющих высокую аффинность; и наконец посредством скрининга получают моноклональное анти-PCSK9 антитело, имеющее высокую аффинность. Это анти-PCSK9 антитело имеет хорошую аффинность к PCSK9, может ингибировать объединение PCSK9 с его лигандом и может быть использовано для лечения дислипидемии, сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний и тромботических окклюзионных заболеваний.

B1**039191****039191****B1**

Область изобретения

Заявка относится к области инженерии антител и, в частности, к полностью человеческому моноклональному антителу против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9), к способу его получения и его применению.

Предшествующий уровень техники

Пропотеиновая конвертаза субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) принадлежит к подсемейству протеиназы К пропротеиновой конвертазы. Ген PCSK9 человека находится в хромосоме 1p32.3, имеет длину примерно 22 т.п.н., имеет 12 экзонов и способен кодировать белок, имеющий 692 аминокислотных остатка. Белок PCSK9 состоит из сигнального пептида, переднего структурного домена, каталитического домена и карбоксильного концевой структурного домена (V-структурного домена), синтезируется в виде растворимого предшественника массой 74 кДа и способен генерировать пропептид массой 14 кДа и зрелую протеазу массой 60 кДа посредством каталитического авторасщепления в эндоплазматическом ретикулуле. PCSK9 в основном экспрессируется в печени, кишечном тракте и почках, а также слабо экспрессируется в коже и нервной системе, но только PCSK9 в печени может секретироваться в систему кровообращения.

Исследование показывает, что PCSK9 способен опосредовать деградацию рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) для регулирования уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) в плазме и процесс эндоцитоза LDL, опосредованный LDLR в печени, является основным путем удаления LDL из системы кровообращения. LDLR представляет собой белок, имеющий множество структурных доменов, и его внеклеточный домен тесно связан с гомологичными структурными доменами EGF-A, EGF-B и EGF-C предшественника эпидермального фактора роста. Когда деградация LDLR опосредуется PCSK9, PCSK9 прежде всего должен соединиться с LDLR, причем LDLR в основном имеет сайт связывания, который преимущественно представляет собой EGF-A, и образуется структура из PCSK9 и EGF-A. Исследование показывает, что PCSK9 также способен регулировать метаболизм холестерина с помощью рецептора липопротеинов очень низкой плотности, рецептора аполипопротеина В и рецептора аполипопротеина Е, но молекулярные механизмы этого не ясны.

Основное исследование и клинические испытания показывают, что, ингибируя активность PCSK9 посредством мер эктогенного вмешательства, выведение липопротеинов низкой плотности (LDL) из плазмы можно ускорить и таким образом может быть достигнута функция уменьшения жира крови. В настоящее время ингибиторы PCSK9 включают главным образом моноклональные антитела, антисмысловые нуклеотиды, малую интерферирующую рибонуклеиновую кислоту (РНК), пептиды-имитаторы, низкомолекулярные ингибиторы и т.п.

Медицина на основе моноклональных антител представляет собой исследование и разработку в области биомедицины в этом году, обладающие хорошими характеристиками нацеливания, высокой специфичностью, низким токсическим и побочным эффектом и т.п. Это является новейшим направлением развития в области медицинского лечения. Моноклональное антитело, мишенью которого является PCSK9, может специфично объединяться с PCSK9 и способно препятствовать взаимодействию PCSK9 и LDLR и замедлять процесс деградации LDLR так, чтобы получить эффект снижения уровня LDL-C (холестерина липопротеидов низкой плотности). Клинические экспериментальные данные показали безопасность, эффективность и уникальное клиническое значение применения терапии на основе моноклональных анти-PCSK9 антител.

Полностью человеческое антитело является основным направлением разработки терапевтических антител. Благодаря методике библиотеки антител обеспечивается хорошая техническая платформа для получения и скрининга человеческих антител. Благодаря методике библиотеки антител исключается необходимость в ключевом гибридном процессе в традиционном процессе исследования моноклональных антител и даже различные гены антител и молекулярные фрагменты антител могут быть получены без иммунологического процесса. Фаговая библиотека антител в настоящее время является самой ранней и наиболее широко используемой библиотекой антител. В соответствии с источником генов антител библиотека фаговых антител делится на иммунную библиотеку и неиммунную библиотеку, а неиммунная библиотека также включает природную библиотеку, полусинтетическую библиотеку и полностью синтетическую библиотеку. При скрининге фаговой библиотеки антител имитируют процесс созревания аффинности антител. Обычно антиген покрывают твердофазной средой, добавляют фаговую библиотеку антител, предназначенную для скрининга, и выполняют несколько циклов процессов "адсорбция, промывка, элюирование и амплификация" (т.е. элютирование) вплоть до выявления антитела, обладающего высокой аффинностью.

В настоящее время несколько фармацевтических компаний активно разрабатывают лекарственные средства на основе моноклональных антител, нацеленные на PCSK9. Repatha (эволюкумаб) от Amgen и Praluent (алирокумаб) от Sanofi/Regeneron оба являются полностью человеческими антителами, последовательно разрешены к продаже в 2015 г. и применяются для лечения первичной гиперхолестеринемии и семейной гиперхолестеринемии (гетерозиготной и гомозиготной). С помощью статина вместе с эволюкумабом уровень холестерина LDL-C у пациента, страдающего первичной гиперхолестеринемией, может быть снижен на 77%, уровень холестерина LDL-C у пациента, страдающего гетерозиготной семейной

гиперхолестеринемией, может быть снижен на 68%, и уровень холестерина LDL-C пациента, страдающего гомозиготной семейной гиперхолестеринемией, может быть снижен на 31%. Эволюмаб обладает хорошей переносимостью, и в настоящее время не имеется заметных проблем с его безопасностью. Человеческое моноклональное антитело бокоцизумаб от Pfizer проходит фазу III клинического испытания, а человеческое моноклональное антитело лоделцизумаб (lodelcizumab) от Novartis проходит фазу II клинического испытания. Roche и Merck также проходят клинические испытания.

В настоящее время в Китае по-прежнему отсутствуют самостоятельно разработанные полностью человеческие анти-PCSK9 антитела, обладающие высокой аффинностью.

Краткое изложение сущности изобретения

В данном изобретении предлагаются моноклональные антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9). Моноклональные анти-PCSK9 антитела подвергают скринингу из полностью синтетической библиотеки антител; создают синтетическую фаговую библиотеку легких цепей антител малой емкости с помощью компьютерного конструирования и анализа; посредством скрининга получают библиотеку мутаций в определяющих комплементарность областях CDR1, 2, 3 легкой цепи моноклональных анти-PCSK9 антител; после скрининга выбирают моноклональные антитела, имеющие высокую аффинность; создают библиотеку для скрининга мутаций в областях CDR1, 2, 3 тяжелой цепи моноклональных антител; и наконец с помощью скрининга получают моноклональное анти-PCSK9 антитело, обладающее высокой аффинностью. Моноклональное анти-PCSK9 антитело имеет совершенно новые последовательности, хорошие функции *in vitro*, особенно на клеточном уровне, и очень хорошие перспективы применения в медицине.

Для достижения вышеуказанных целей в изобретении предложено моноклональное анти-PCSK9 антитело, включающее легкие цепи и тяжелые цепи; определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и CDR3 легких цепей представлены LCDR1, LCDR2 и LCDR3 соответственно; кроме того, определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых цепей представлены HCDR1, HCDR2 и HCDR3 соответственно; LCDR1 включает любую из RASQSIDNRLT (SEQ ID NO:22), RASQSVRNWLD (SEQ ID NO:23), RASQGINSWLN (SEQ ID NO:24), RASQNVNNWLN (SEQ ID NO:25), RASQNINSWLN (SEQ ID NO:26), RASQNINNWLN (SEQ ID NO:27), RASQGIHNWLN (SEQ ID NO:28), RASQDVDSWLT (SEQ ID NO:29), RASQSVRNWLN (SEQ ID NO:30), RASQDVNRWLT (SEQ ID NO:31) или RASQSIRSYLN (SEQ ID NO:32); LCDR2 включает любую из DASSRQS (SEQ ID NO:33), GASTLES (SEQ ID NO:34), AASTRET (SEQ ID NO:35), GASSRQS (SEQ ID NO:36), GASTRPT (SEQ ID NO:37), DASNRQS (SEQ ID NO:38), GASNLAS (SEQ ID NO:39), DASNLQS (SEQ ID NO:40) или DASSRPT (SEQ ID NO:41); LCDR3 включает любую из QQPNDPTT (SEQ ID NO:42), QQDNDIPLT (SEQ ID NO:43), QQWNNTPNT (SEQ ID NO:44), QQDNDMPLT (SEQ ID NO:45), QQWFDVPTT (SEQ ID NO:46), QQWDDTPNT (SEQ ID NO:47), QQNSNIPLT (SEQ ID NO:48), QQDSKIPLT (SEQ ID NO:49), QQWTDTPLT (SEQ ID NO:50), QQDDSTPPT (SEQ ID NO:51) или QQGDSMPMT (SEQ ID NO:52); HCDR1 включает любую из GGTFTNNA (SEQ ID NO:53), GYTVTSYG (SEQ ID NO:54) или GYSLTSYG (SEQ ID NO:55); HCDR2 включает любую из RIIPMFPGA (SEQ ID NO:56), WLSFYNGNT (SEQ ID NO:57), WVTFYNGNT (SEQ ID NO:58), WVSFYQGNT (SEQ ID NO:59), WVSFYNGQT (SEQ ID NO:60) или WVSFYNGNS (SEQ ID NO:61); HCDR3 включает AREGIPMI (SEQ ID NO:62), ARGYSLDV (SEQ ID NO:63), ARGYGMSI (SEQ ID NO:64), ARGFGMDR (SEQ ID NO:65), ARGYGMTV (SEQ ID NO:66) или ARGFGLSV (SEQ ID NO:67).

Здесь аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи предпочтительно выбрана из любой из SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:21.

Здесь аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи предпочтительно выбрана из любой из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10.

Здесь последовательность HCDR1 вариабельной области тяжелой цепи выбрана из любой из GYTVTSYG (SEQ ID NO:54) или GYSLTSYG (SEQ ID NO:55); последовательность LCDR1 вариабельной области легкой цепи выбрана из любой аминокислотной последовательности RASQSVRNWLD (SEQ ID NO:23), RASQNVNNWLN (SEQ ID NO:25), RASQNINSWLN (SEQ ID NO:26), RASQNINNWLN (SEQ ID NO:27) или RASQDVDSWLT (SEQ ID NO:29); последовательность HCDR2 вариабельной области тяжелой цепи выбрана из любой аминокислотной последовательности WVSFYQGNT (SEQ ID NO:59), WVSFYNGQT (SEQ ID NO:60) или WVSFYNGNS (SEQ ID NO:61); последовательность LCDR2 вариабельной области легкой цепи выбрана из любой аминокислотной последовательности GASTLES (SEQ ID NO:34), AASTRET (SEQ ID NO:35), GASSRQS (SEQ ID NO:36), GASTRPT (SEQ ID NO:37) или GASNLAS (SEQ ID NO:39); последовательность HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи выбрана из любой аминокислотной последовательности ARGYSLDV (SEQ ID NO:63), ARGYGMSI (SEQ ID NO:64), ARGFGMDR (SEQ ID NO:65) или ARGYGMTV (SEQ ID NO:66); последовательность LCDR3 вариабельной области легкой цепи выбрана из любой аминокислотной последовательности QQDNDIPLT (SEQ ID NO:43), QQDNDMPLT (SEQ ID NO:45), QQWFDVPTT (SEQ ID NO:46), QQWDDTPNT (SEQ ID NO:47) или QQDSKIPLT (SEQ ID NO:49).

Здесь в изобретении дополнительно предлагаются многочисленные антитела, полипептиды или белки, имеющие вышеуказанную легкую цепь или тяжелую цепь.

Здесь в изобретении дополнительно предлагаются многочисленные антитела, имеющие вышеуказанную легкую цепь или тяжелую цепь, антитела, способные специфично связываться с PCSK9, препятствуя связыванию PCSK9 с LDL, увеличивая количество LDLR на поверхности клетки или уровень LDLR в системе кровообращения и снижая уровень LDL или LDL-C в системе кровообращения.

Здесь в изобретении дополнительно предлагается полинуклеотидная последовательность или полинуклеотидная комбинация, имеющая вышеуказанную легкую цепь или тяжелую цепь.

Здесь константная область тяжелой цепи моноклонального анти-PCSK9 антитела включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 и константная область легкой цепи включает C_κ или C_λ.

Здесь константная область тяжелой цепи предпочтительно включает IgG4 или IgG2 и предпочтительно эукариотический экспрессионный вектор или прокариотический экспрессионный вектор тяжелой цепи.

Здесь константная область легкой цепи предпочтительно включает C_κ и предпочтительно эукариотический экспрессионный вектор или прокариотический экспрессионный вектор легкой цепи.

Здесь в изобретении дополнительно предлагается экспрессионный рекомбинантный ДНК-вектор, имеющий полинуклеотидную последовательность или комбинацию; последовательность ДНК экспрессионного рекомбинантного ДНК-вектора включает ДНК-последовательность для кодирования анти-PCSK9 антитела в вышеуказанной вариабельной области тяжелой цепи, константной области тяжелой цепи, вариабельной области легкой цепи и константной области легкой цепи.

Здесь в изобретении дополнительно предлагаются клетки-хозяева, трансфицированные экспрессионным рекомбинантным ДНК-вектором, и эти клетки-хозяева включают прокариотическую клетку, клетку дрожжей и клетку насекомых или млекопитающих.

Здесь прокариотическая клетка предпочтительно представляет собой *Escherichia coli*.

Здесь клетка млекопитающих предпочтительно представляет собой клетку эмбриональной почки человека 293 (HEK293), клетку яичника китайского хомячка (CHO) или клетку миеломы (NS0).

Здесь в изобретении дополнительно предлагаются многочисленные полноразмерные антитела, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела, биспецифические антитела и конъюгаты антител-лекарственное средство.

Здесь в изобретении дополнительно предлагаются многочисленные моноклональные антитела, искусственные векторы, лекарственные средства или лекарственные композиции, имеющие вышеуказанную легкую цепь или тяжелую цепь.

Здесь моноклональные антитела включают полноразмерные антитела и фрагменты моноклонального анти-PCSK9 антитела и фрагменты включают, без ограничения ими, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или ScFv.

Здесь в изобретении дополнительно предложен реагент или набор для обнаружения, имеющий вышеуказанную легкую цепь или тяжелую цепь.

Антитело по изобретению может быть применено к заболеваниям, которые облегчают, ослабляют, ингибируют или предупреждают путем устранения, ингибирования или снижения активности PCSK9, и эти заболевания включают дислипидемию, сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания и тромботические окклюзионные заболевания.

Здесь дислипидемия включает повышение уровня холестерина, повышение уровня триглицеридов, повышение уровня липопротеинов низкой плотности и снижение уровня липопротеинов высокой плотности. Сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания включают коронарные артериосклеротические сердечные заболевания, острый инфаркт миокарда, атеросклероз, инсульт и окклюзионные заболевания периферических артерий.

Способ получения анти-PCSK9 моноклонального антитела включает

(1) проведение биопэннинга в отношении одноцепочечного анти-PCSK9 антитела и проведение трех циклов обогащающего скрининга библиотеки антител с получением последовательности антитела DFSK9-1, имеющей высокую аффинность, из полностью синтетической ScFv-фаговой библиотеки; тяжелая цепь DFSK9-H1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 и легкая цепь DFSK9-L1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11;

(2) на основе DFSK9-1, посредством компьютерного моделирования третичной структуры, разработку и создание библиотеки антител с мутациями определяющих комплементарность областей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, проведение биопэннинга и скрининга положительного клонирования и идентификация в библиотеке антител мутаций с получением 10 одноцепочечных последовательностей антител, имеющих разные легкие цепи, которые соответственно названы как DFSK9-2, DFSK9-3, DFSK9-4, DFSK9-5, DFSK9-6, DFSK9-7, DFSK9-8, DFSK9-9, DFSK9-10 и DFSK9-11, соответствующие вариабельные области легкой цепи соответственно названы как DFSK9-L2, DFSK9-L3, DFSK9-L4, DFSK9-L5, DFSK9-L6, DFSK9-L7, DFSK9-L8, DFSK9-L9, DFSK9-L10 и DFSK9-L11, и соответствующие аминокислотные последовательности областей соответственно показаны в SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 и

SEQ ID NO:21; сравнение аффинности одноцепочечных антител на уровне фага;

(3) выбор пяти клонов DFSK9-2, DFSK9-4, DFSK9-5, DFSK9-6 и DFSK9-8, моделирование и создание библиотеки мутаций антител в определяющих комплементарность областях CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, проведение биопэннинга и скрининг положительного клонирования, а также идентификация в тяжелой цепи мутаций тяжелой цепи с получением 10 разных последовательностей одноцепочечных антител, которые соответственно названы как DFSK9-12, DFSK9-13, DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-19, DFSK9-20 и DFSK9-21; здесь DFSK9-12, DFSK9-13, DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-19, DFSK9-20 и DFSK9-21 соответственно имеют последовательности вариабельной области легкой цепи DFSK9-L2, DFSK9-L8, DFSK9-L5, DFSK9-L6, DFSK9-L5, DFSK9-L6, DFSK9-L5, DFSK9-L4, DFSK9-L6 и DFSK9-L6; соответствующие аминокислотные последовательности этих последовательностей соответственно показаны в SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:16; DFSK9-12, DFSK9-13, DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-19, DFSK9-20 и DFSK9-21 соответственно имеют последовательности вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H2, DFSK9-H8, DFSK9-H7, DFSK9-H3, DFSK9-H6, DFSK9-H4, DFSK9-H4, DFSK9-H9, DFSK9-H5 и DFSK9-H10; соответствующие аминокислотные последовательности этих последовательностей соответственно показаны в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:10; сравнение аффинности одноцепочечных антител на уровне фага;

(4) клонирование гена вариабельной области тяжелой цепи и гена вариабельной области легкой цепи этих клонов в (3) эукариотический экспрессионный вектор, трансфицирование в клетку-хозяина и получение полного моноклонального анти-PCSK9 антитела.

Здесь CDR представляет собой область, определяющую комплементарность; ScFv представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент; ADC представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное средство; LDLR представляет собой рецептор липопротеинов низкой плотности; LDL-C представляет собой холестерин липопротеинов низкой плотности; клетки HEK293E представляют собой клетки эмбриональной почки человека 293E; клетки CHO представляют собой клетки яичника китайского хомячка; клетки NSO представляют собой клетки NSO тимомы мыши.

По сравнению с известным уровнем техники изобретение обеспечивает следующие полезные эффекты.

В изобретении предложено несколько совершенно новых анти-PCSK9 антител, которые имеют высокую аффинность связывания с субстратами, способны хорошо препятствовать связыванию PCSK9 с LDLR и, кроме того, влияют на распределение и экспрессию LDLR на поверхности клеток. Следовательно, улучшаются характеристики связывания LDLR с LDL на клеточной поверхности, улучшаются захват и деградация LDL клеткой и достигается цель сокращения внеклеточного содержания LDL и LDL-C и снижения общего холестерина LDL и LDL-C.

Моноклональное антитело, предложенное в изобретении, можно использовать для устранения, ингибирования или снижения активности PCSK9 для облегчения, снижения, ингибирования или предупреждения заболеваний; эти заболевания включают дислипидемию, сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания и тромботические окклюзионные заболевания; дислипидемия включает повышение холестерина и триглицеридов, увеличение липопротеинов низкой плотности, снижение липопротеинов высокой плотности и т.п.; сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания включают коронарные артериосклеротические сердечные заболевания, острый инфаркт миокарда, атеросклероз, инсульт, окклюзионные заболевания периферических артерий и т.п.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано изображение плазмиды pScFvDisb-S1;

на фиг. 2 показана относительная аффинность одноцепочечных антител от положительно клонированного фага и библиотеки мутантных легких цепей антител, определенная с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA);

на фиг. 3 показано сравнение относительной аффинности одноцепочечного антитела библиотеки мутантных легких цепей антител с помощью ELISA с градиентным разбавлением на основе моноклонального положительно клонированного фага;

на фиг. 4 показано определение относительной аффинности одноцепочечного антитела библиотеки мутантных тяжелых цепей антител с помощью моноклонального положительно клонированного фага (ELISA);

на фиг. 5 показано сравнение относительной аффинности одноцепочечного антитела библиотеки мутантных тяжелых цепей антител с помощью ELISA с градиентным разбавлением на основе моноклонального положительно клонированного фага;

на фиг. 6 показано изображение плазмиды pTSEG4;

на фиг. 7 показано изображение плазмиды pTSEK;

на фиг. 8 показан тест связывания полного антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) с PCSK9 на молекулярном уровне;

на фиг. 9 показано, что анти-PCSK9 антитело конкурентно ингибирует связывание рецептора липопротеина низкой плотности (LDLR) и PCSK9;

на фиг. 10 показано тестирование биологической активности полного анти-PCSK9 антитела.

Подробное описание воплощений

Подробные способы реализации изобретения показаны в воплощениях. Экспериментальные методы и реагенты, описанные в воплощениях, представляют собой обычные экспериментальные методы и реагенты без специального описания. Нижеследующее описание используется только для иллюстрации и интерпретации настоящего описания изобретения, но не для какого-либо его ограничения.

В описании изобретения предложен один тип моноклонального антитела, которое специфично связывается с пропротеиновой конвертазой субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9), последовательность вариательной области тяжелой цепи включает любую из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и последовательность вариательной области легкой цепи включает любую из SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21.

Предпочтительно последовательность вариательной области тяжелой цепи моноклонального антитела, которое специфично связывается с PCSK9, выбирают из любой из SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 и последовательность вариательной области легкой цепи выбирают из любой из SEQ ID NO:12, 14, 15, 16 и 18.

Посредством скрининга фаговой библиотеки легкой цепи аминокислотная последовательность областей, определяющих комплементарность, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи или функциональные фрагменты легкой цепи антитела выбирают из любой комбинации следующим образом (как показано в табл. 1).

Таблица 1

Аминокислотные последовательности разных CDR легкой цепи

Номер	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	RASQSIDNRLT (SEQ ID NO:22)	DASSRQS (SEQ ID NO:33)	QQPENDPTT (SEQ ID NO:42)
B	RASQSVRNWLD (SEQ ID NO:23)	GASTLES (SEQ ID NO:34)	QQDNDIPLT (SEQ ID NO:43)
C	RASQGINSWLN (SEQ ID NO:24)	AASTRET (SEQ ID NO:35)	QQWNNTPNT (SEQ ID NO:44)
D	RASQNVNNWLN (SEQ ID NO:25)	AASTRET (SEQ ID NO:35)	QQDNDMPLT (SEQ ID NO:45)
E	RASQNINSWLN (SEQ ID NO:26)	GASSRQS (SEQ ID NO:36)	QQWFDVPTT (SEQ ID NO:46)
F	RASQNINNWLN (SEQ ID NO:27)	GASTRPT (SEQ ID NO:37)	QQWDDTPNT (SEQ ID NO:47)
G	RASQGIHNWLN (SEQ ID NO:28)	DASNRQS (SEQ ID NO:38)	QQNSNIPLT (SEQ ID NO:48)
H	RASQDVDSWLT (SEQ ID NO:29)	GASNLAS (SEQ ID NO:39)	QQDSKIPLT (SEQ ID NO:49)
I	RASQSVRNWLN (SEQ ID NO:30)	DASNLQS (SEQ ID NO:40)	QQWTDTPLT (SEQ ID NO:50)
J	RASQDVNRWLT (SEQ ID NO:31)	GASNLAS (SEQ ID NO:39)	QQDDSTPPT (SEQ ID NO:51)
K	RASQSIRSYLN (SEQ ID NO:32)	DASSRPT (SEQ ID NO:41)	QQGDSMPMT (SEQ ID NO:52)

Посредством скрининга фаговой библиотеки тяжелой цепи, CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела или функционального фрагмента соответственно представлены HCDR1, HCDR2 и HCDR3: HCDR1 представляет собой одну из GGTFTNNA (SEQ ID NO:53), GYTVTSYG (SEQ ID NO:54) или GYSLTSYG (SEQ ID NO:55); HCDR2 представляет собой одну из RIIPMFGMA (SEQ ID NO:56), WLSFYNGNT (SEQ ID NO:57), WVTFYNGNT (SEQ ID NO:58), WVSFYQGNT (SEQ ID NO:59), WVSFYNGQT (SEQ ID NO:60) или WVSFYNGNS (SEQ ID NO:61); HCDR3 представляет собой одну из AREGIPMI (SEQ ID NO:62), ARGYSLDV (SEQ ID NO:63), ARGYGMSI (SEQ ID NO:64), ARGFGMDR (SEQ ID NO:65), ARGYGMTV (SEQ ID NO:66) или ARGFGLSV (SEQ ID NO:67).

Предпочтительно, посредством скрининга фаговой библиотеки тяжелой цепи, моноклональное антитело, которое специфично связывается с PCSK9, включает вариательные области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и вариательные области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где последовательность вариательной области тяжелой цепи HCDR1 представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из GYTVTSYG (SEQ ID NO:54) или GYSLTSYG (SEQ ID NO:55); последова-

тельность вариабельной области легкой цепи LCDR1 представляет собой любую аминокислотную последовательность, выбранную из RASQSVRNWLD (SEQ ID NO:23), RASQNVNNWLN (SEQ ID NO:25), RASQNINSWLN (SEQ ID NO:26), RASQNINNWLN (SEQ ID NO:27) или RASQDVDSWLT (SEQ ID NO:29); последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCDR2 представляет собой любую аминокислотную последовательность, выбранную из WVSFYQGNT (SEQ ID NO:59), WVSFYNGQT (SEQ ID NO:60) или WVSFYNGNS (SEQ ID NO:61); последовательность вариабельной области легкой цепи LCDR2 представляет собой любую аминокислотную последовательность, выбранную из GASTLES (SEQ ID NO:34), AASTRET (SEQ ID NO:35), GASSRQS (SEQ ID NO:36), GASTRPT (SEQ ID NO:37) или GASNLAS (SEQ ID NO:39); последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCDR3 представляет собой любую аминокислотную последовательность, выбранную из ARGYSLDV (SEQ ID NO:63), ARGYGMSI (SEQ ID NO:64), ARGFGMDR (SEQ ID NO:65) или ARGYGMTV (SEQ ID NO:66); последовательность вариабельной области легкой цепи LCDR3 представляет собой любую аминокислотную последовательность, выбранную из QQDNDIPLT (SEQ ID NO:43), QQDNDMPLT (SEQ ID NO:45), QQWFDVPTT (SEQ ID NO:46), QQWDDTPNT (SEQ ID NO:47) или QQDSKIPLT (SEQ ID NO:49).

Способ получения специфического антитела посредством полного синтеза одноцепочечной фаговой библиотеки ScFv-фрагментов антител, полностью человеческое моноклональное антитело, которое специфично связывается с PCSK9, получают посредством скрининга с использованием способа фаговой библиотеки антител, включающего

(1) проведение биопэннинга в отношении одноцепочечного анти-PCSK9 антитела и проведение трех циклов обогащающего скрининга библиотеки антител с получением последовательности антитела DFSK9-1, имеющего высокую аффинность;

(2) на основании DFSK9-1, с помощью компьютерного моделирования, создание библиотеки мутаций легкой цепи CDR123 и проведение биопэннинга, скрининга и идентификации положительного клона в библиотеке антител с получением 10 разных последовательностей легкой цепи антител, включающих клоны DFSK9-2, DFSK9-3, DFSK9-4, DFSK9-5, DFSK9-6, DFSK9-7, DFSK9-8, DFSK9-9, DFSK9-10 и DFSK9-11; сравнение аффинности вышеуказанных 10 одноцепочечных антител на уровне фага;

(3) выбор пяти клонов, имеющих высокую аффинность, и создание библиотеки тяжелой цепи CDR123, проведение биопэннинга, скрининга и идентификации положительного клона в библиотеке антител с получением одноцепочечных антител с разными последовательностями, включающими DFSK9-12, DFSK9-13, DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-19, DFSK9-20 и DFSK9-21; сравнение аффинности одноцепочечных антител на уровне фага;

(4) клонирование гена вариабельной области тяжелой цепи и гена вариабельной области легкой цепи клонов со стадии (3) в эукариотическом экспрессирующем векторе, трансфицированном в клетку-хозяина, с получением полного моноклонального анти-PCSK9 антитела.

Предпочтительно дополнительно проводят тест на аффинность и биологическую активность полного моноклонального анти-PCSK9 антитела со стадии (4).

Конкретные воплощения

Настоящая заявка подробно описана ниже вместе с графическими материалами и воплощениями.

Воплощение 1. Биопэннинг моноклонального антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9).

Модифицируют вектор pCom3 посредством клонирования генов, присваивают модифицированному вектору название pScFvDisb-S1 (как показано на фиг. 1) и создают на основе этого вектора полностью синтетическую фаговую библиотеку антител.

Покрывают антигеном PCSK9-His 10 мкг/1 мл/пробирка иммунную пробирку в течение ночи при 4°C. Блокируют иммунную пробирку и фаговую библиотеку антител (количество фага составляет примерно 10^9 - 10^{12}), соответственно, с использованием PBST-4% молока в течение 1 ч при 37°C, помещают блокированную фаговую библиотеку антител в иммунную пробирку для связывания антигена с антителом и осуществляют взаимодействие в течение 1 ч при 37°C; промывают несвязанный фаг с использованием фосфатно-буферного раствора - фосфатно-солевого буфера (PBST-PBS), элюируют с использованием 0,1M глицина-HCl с pH 2,2 и нейтрализуют нейтральный элюент с использованием 1,5M Tris-HCl с pH 8,8 вплоть до примерно pH 7,0; инфицируют 10 мл элюента для роста в бактериальную жидкость XL1-Blue со значением OD (оптическая плотность) примерно 0,5-0,8, сначала оставляют стоять в течение 30 мин при 37°C и осуществляют встряхивание вибрационного стола с культурой в течение 1 ч при 150 об/мин; осуществляют градиентное разбавление 1% бактериальной жидкости, наносят на маленький планшет 2YTATG и подсчитывают выход фага; центрифугируют оставшуюся бактериальную жидкость, наносят на большой планшет 2YTATG и культивируют в течение ночи при 37°C; переносят бактерию, культивированную в течение ночи, в 2YTATG жидкую культуральную среду, встряхивают до логарифмической фазы, добавляют M13K07 для содействия фаговой инфекции, культивируют при 28°C в течение ночи для амплификации фага, выполняют очистку фага посредством осаждения с использованием PEG6000-NaCl для следующего цикла скрининга и проводят три цикла обогащения фаговой библиотеки и скрининг в полном масштабе.

Воплощение 2. Скрининг положительных клонов одноцепочечного антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9).

После трех циклов скрининга отбирают хорошо разделенные моноклональные бактериальные колонии, инокулируют в 96-луночный планшет с глубокими лунками с жидкой культуральной средой 2YTATG, культивируют в течение 5 ч при 220 об/мин и 37°C вплоть до достижения логарифмической фазы, помещают примерно 10^{10} хелперного фага M13K07 в каждую лунку, оставляют стоять в течение 30 мин при 37°C и выполняют встряхивание культуры в течение 1 ч при 150 об/мин; центрифугируют в течение 15 мин при 4000 об/мин, ресуспендируют осадок в жидкой культуральной среде 2YTATKA и культивируют в течение ночи при 220 об/мин и 28°C; центрифугируют в течение 15 мин при 4000 об/мин при 4°C и выполняют идентификацию посредством моноклонального твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) фаг-содержащего супернатанта; проводят скрининг одноцепочечного антитела DFSK9-1, обладающего высокой аффинностью, вариабельную область тяжелой цепи антитела называют DFSK9-H1, аминокислотная последовательность антитела показана в SEQ ID NO:1; вариабельную область легкой цепи антитела называют DFSK9-L1, аминокислотная последовательность антитела показана в

SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:1 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H1):

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCASGGTFTNNAISWVRQAPGQGLEWMGRIP

MFGMANYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREGIPMIWGQGT
VTVSS

SEQ ID NO:11 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L1):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDNRLTWYQQKPGKAPKLLIYDASSRQS

GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQPENDPTTFGQGTKVEIK

Воплощение 3. In vitro созревание аффинности одноцепочечного антитела DFSK9-1 против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9).

3.1. Создание библиотеки мутаций CDR123 легкой цепи антитела DFSK9-1.

Проводят двойное расщепление pScFvDisb-DFSK9-1 плазмиды с использованием NheI и NotI, проводят электрофорез продукта расщепления на агарозном геле, разрезают гель и повторяют цикл с полосками 5,5 т.о.; проводят двойное расщепление гена VLCDR123M синтетической библиотеки мутаций легкой цепи с использованием NheI и NotI, повторяют цикл с продуктом, используя универсальный набор для рециклинга продукта; присоединяют ген библиотеки мутаций к вектору в течение 4 ч с использованием T4 ДНК лигазы при 16°C с мольным соотношением 3:1; трансформируют продукт указанного присоединения в электрокомпетентные клетки XL1-Blue с использованием метода электропорации; при 37°C производят встряхивание культуры в течение 1 ч при 150 об/мин с достижением анабиоза; разбавляют 1% бактериальной жидкости, наносят на небольшой планшет и рассчитывают емкость библиотеки; центрифугируют остальную бактериальную жидкость в течение 15 мин при 4000 об/мин, наносят осадок на большой планшет 2YTATG, переворачивают и культивируют при 37°C в течение ночи; емкость созданной библиотеки антител составляет примерно 10^8 , случайным образом отбирают 20 клонов для проведения анализа последовательности, причем как показатель точности последовательности, так и разнообразие составляют более 90%.

3.2. Биопэннинг фаговых библиотек антител и скрининг положительных клонов.

Биопэннинг и скрининг положительных клонов выполняют с использованием способов из воплощения 1 и воплощения 2, секвенируют клоны, имеющие высокую аффинность, с получением 10 разных последовательностей одноцепочечных антител, которые соответственно называют DFSK9-2, DFSK9-3, DFSK9-4, DFSK9-5, DFSK9-6, DFSK9-7, DFSK9-8, DFSK9-9, DFSK9-10 и DFSK9-11, соответствующую вариабельную область легкой цепи называют DFSK9-L2, DFSK9-L3, DFSK9-L4, DFSK9-L5, DFSK9-L6, DFSK9-L7, DFSK9-L8, DFSK9-L9, DFSK9-L10 и DFSK9-L11, и соответствующие аминокислотные последовательности соответственно показаны в SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:21; последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:21 показаны ниже.

SEQ ID NO:12 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L2):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVRNWLDWYQQKPGKAPKLLIYGASTLE

SGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDNDIPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:13 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L3):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLNWYQQKPGKAPKLLIYAASTRE

TGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWNNTNPNTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:14 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L4):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNVNNWLNWYQQKPGKAPKLLIYAASTR

ETGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDNDMPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:15 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L5):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQINNSWLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSRQ

SGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQWFDVPTTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:16 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L6):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQINNNWLNWYQQKPGKAPKLLIYGASTRP

TGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQWDDTPNTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:17 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L7):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIHNWLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNR

QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQNSNIPLTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:18 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L8):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVDSWLTWYQQKPGKAPKLLIYGASNL

ASGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQDSKIPLTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:19 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L9):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVRNWLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL

QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQWTDTPPLTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:20 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L10):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNRWLTWYQQKPGKAPKLLIYGASNL

ASGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQDDSTPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:21 (последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L11):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSRPT

GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQGDSMPMTFGQGTKVEIK

Результаты определения посредством моноклонального фагового ELISA показаны на фиг. 2.

3.3. Определение относительной аффинности одноцепочечного анти-PCSK9 антитела при помощи фагового твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с горизонтальным градиентным разбавлением.

Осуществляют метод моноклонального фагового дисплея и очистку клонов, полученных в воплощении 3.2, и проводят определение относительной аффинности моноклонального антитела посредством фагового ELISA с горизонтальным градиентным разбавлением.

Покрывают PCSK9-His (300 нг/лунка/100 мкл) при помощи 0,01М фосфатно-солевого буфера (PBS) с pH 7,2 и проводят покрытие в течение ночи при 4°C; промывают три раза полибутилентерефталатом (PBST) и блокируют с помощью PBST-4% молока при 37°C в течение 1 ч; добавляют очищенный образец фага (100 мкл/лунка), который разбавляют PBST-4% молока для получения пятикратного градиента и оставляют стоять в течение 1 ч при 37°C; промывают PBST пять раз, добавляют моноклональное анти-M13-HRP антитело (100 мкл/лунка), которое разбавляют PBST-4% молоком в соотношении 1:5000, и оставляют стоять в течение 1 ч при 37°C; проявляют с помощью набора для проявления с тетраметилбензидином (TMB) (100 мкл/лунка) в течение 10 мин при комнатной температуре и заканчивают проявку с помощью 2М H₂SO₄ (50 мкл/лунка); считывают показатели с помощью микропланшетного ридера при длинах волн 450 и 630 нм; анализируют данные и графически изображают, используя программу Graph-Pad Prism 5 Demo (результаты показаны на фиг. 3). Результаты показывают, что все отобранные в результате скрининга фаговые одноцепочечные антитела способны связываться с PCSK9. Аффинности DFSK9-2, DFSK9-4, DFSK9-5, DFSK9-6 и DFSK9-8 к PCSK9 значительно выше, чем у других клонов, и пять одноцепочечных антител отбирают для следующего теста.

Воплощение 4. In vitro созревание аффинности отобранных в результате скрининга одноцепочечных антител против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) в течение другого периода.

4.1. Создание библиотеки мутаций CDR123 тяжелой цепи с использованием метода замены цепей.

Проводят двойное расщепление смешанной плазмиды пяти одноцепочечных антител, включающих DFSK9-2, DFSK9-4, DFSK9-5, DFSK9-6 и DFSK9-8 в воплощении 3.3, с использованием NcoI-HF и KpnI, разрезают гель и повторяют цикл с полоской 5,5 т.о.; проводят двойное расщепление гена VLCDR123M синтетической библиотеки мутаций тяжелой цепи с использованием NheI и NotI и повторяют цикл с продуктом расщепления, используя универсальный набор для рециклинга; присоединяют ген библиотеки мутаций к вектору в течение 4 ч с использованием T4 ДНК лигазы при 16°C с мольным соотношением 3:1; трансформируют продукт присоединения в электрокомпетентные клетки XL1-Blue с использованием метода электропорации; при 37°C производят встряхивание культуры в течение 1 ч при 150 об/мин с достижением анабиоза; разбавляют 1% бактериальной жидкости, наносят на небольшой планшет и рассчитывают емкость библиотеки; центрифугируют остальную бактериальную жидкость в течение 15 мин при 4000 об/мин, наносят осадок на большой планшет 2YTATG, переворачивают и культивируют при 37°C в течение ночи; емкость созданной библиотеки антител составляет примерно 5*10⁸, случайным образом

выбирают 20 клонов для проведения анализа последовательности, причем как показатель точности последовательности, так и разнообразие составляют более 90%.

4.2. Биопэннинг фаговых библиотек антител и скрининг положительных клонов.

Осуществляют метод фагового дисплея и очистку библиотеки антител в воплощении 4.1; проводят пэннинг анти-PCSK9 одноцепочечных антител; метод биопэннинга фаговой библиотеки антител и скрининг положительных клонов были такими же, как в воплощении 1 и воплощении 2; секвенируют для скрининга 10 разных последовательностей анти-PCSK9 антител, которые соответственно называют DFSK9-12, DFSK9-13, DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-19, DFSK9-20 и DFSK9-21; здесь DFSK9-12 имеет последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L2, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:12; DFSK9-13 имеет последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L8, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:18; DFSK9-14, DFSK9-16 и DFSK9-18 имеют последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L5, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:15; DFSK9-15, DFSK9-17, DFSK9-20 и DFSK9-21 имеют последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L6, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:16; DFSK9-19 имеет последовательность вариабельной области легкой цепи DFSK9-L4, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:14; DFSK9-12 имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H2, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:2; DFSK9-13 имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H8, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:8; DFSK9-14 имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H7, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:7; DFSK9-15 имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H3, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:3; DFSK9-16 имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H6, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:6; DFSK9-17 и DFSK9-18 имеют последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H4, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:4; DFSK9-19 имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H9, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:9; DFSK9-20 имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H5, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:5; DFSK9-21 имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H10, и соответствующая аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:10. Последовательности вариабельной области легкой цепи показаны в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:18 в воплощении 3.2, и аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:10 являются следующими:

SEQ ID NO:2 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H2):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTVTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWLSFY
 NGNTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYSLDVWGQGTTV
 TVSS
 SEQ ID NO:3 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H3):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTVTSYGISWVRQAPGQ
 GLEWMGWVSFYNGQTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARG
 YSLDVWGQGTTVTVSS
 SEQ ID NO:4 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H4):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTVTSYGISWVRQAPGQ
 GLEWMGWVSFYNGNSNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARG
 YSLDVWGQGTTVTVSS
 SEQ ID NO:5 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H5):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSLTSYGISWVRQAPGQ
 GLEWMGWVSFYNGNSNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARG
 FGMDRWGQGTTVTVSS
 SEQ ID NO:6 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H6):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTVTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWVS
 FYQGNTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGFGMDRWGQ
 GTTVTVSS
 SEQ ID NO:7 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H7):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSLTSYGISWVRQAPGGLEWMGWVS
 FYNGQTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMSIWGQGT
 TTVTVSS
 SEQ ID NO:8 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H8):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSLTSYGISWVRQAPGGLEWMGWVS
 FYQGNTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMTVWGQG
 TTVTVSS
 SEQ ID NO:9 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H9):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSLTSYGISWVRQAPGGLEWMGWVT
 FYNGNTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGFGLSVWGQGT
 TTVTVSS
 SEQ ID NO:10 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи DFSK9-H10):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSLTSYGISWVRQAPGGLEWMGWVS
 FYNGQTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGFGMDRWGQG
 TTVTVSS

Определение с помощью моноклональной фаговой ELISA относительной аффинности фаговых Аб показано на фиг. 4.

4.3. Определение аффинности одноцепочечных анти-PCSK9 антител с помощью фаговой ELISA с градиентным разбавлением.

Осуществляют метод моноклонального фагового дисплея и очистку клонов, полученных в воплощении 4.2, и проводят определение аффинности одноцепочечного антитела с помощью фаговой ELISA с горизонтальным градиентным разбавлением, с использованием тех же методов, что и в воплощении 3.3 воплощения 3. Результаты представлены на фиг. 5. Все десять разных отобранных в результате скрининга одноцепочечных антител способны хорошо связываться с PCSK9 и имеют более высокую аффинность, чем первичный одноцепочечный DFSK9-1.

Воплощение 5. Определение аффинности полных антител против пропротеиновой конвертазы суб-тилизин/кексинного типа 9 (PCSK9).

5.1. Получение полных анти-PCSK9 антител.

Клонируют ген тяжелой цепи VH антитела, отобранного в результате скрининга в воплощении 4, в вектор pTSEG4 (фиг. 6), который имеет ген константной области тяжелой цепи ($\gamma 4$), клонируют ген легкой цепи VK в вектор pTSEK (фиг. 7), который имеет ген константной области легкой цепи (κ цепь), а оба вектора pTSEG4 и pTSEK получают посредством трансформации на основе вектора PTT. Способ получения вектора PTT конкретно описан в ссылке (Yves.Durocher, Sylvie.Perret and Amine.Kamen Nucleic Acids Research, 2002, vol.30, No.2e9). Проводят временную трансфекцию клеток HEK293E, осуществляют экспрессию полного антитела и очистку с использованием аффинной колонки АКТА на основе белка А с получением полных антительных белков.

5.2. Тестирование связывания полных антител с PCSK9.

Покрывают PCSK9-His (300 нг/лунка/100 мкл) с помощью 0,01М PBS-буфера при pH 7,2 в течение ночи при 4°C, промывают три раза с помощью PBST (1% Tween 20) по 300 мкл/лунка, затем добавляют PBST-4% молока и блокируют в течение 1 ч при 37°C; добавляют полные антитела DFSK9-1, DFSK9-12, DFSK9-13, DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-19, DFSK9-20 и DFSK9-21 с разными степенями разбавления; самая высокая концентрация 11-ти полных антител составляет 50 мкг/мл, разбавляют в виде пятикратного градиента, разбавляют с получением восьми градиентов для каждого полного антитела и инкубируют в течение 1 ч при 37°C; промывают 5 раз PBST по 300 мкл/лунка, затем добавляют козье античеловеческое IgG-HRP вторичное антитело, разведенное PBST-4% молоком в соотношении 1:5000, и инкубируют в течение 1 ч при 37°C; промывают 5 раз с помощью PBST по 300 мкл/лунка, проявляют с использованием набора для проявки с тетраметилбензидином (TMB) (100 мкл/лунка), проявку осуществляют в течение 10 мин при комнатной температуре и заканчивают с помощью 2М H₂SO₄ (50 мкл/лунка); считывают показатели с помощью микропланшетного ридера при длинах волн 450 и 630 нм; анализируют данные и графически изображают, используя программу GraphPad Prism 5 Demo (результаты показаны на фиг. 8 и в табл. 2). Результаты показывают, что все антитела способны хорошо связываться с PCSK9, а DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-20 и DFSK9-21 имеют высокую аффинность.

Таблица 2

Значение аффинности EC_{50} полных антител

Номер	Образец	EC_{50} (нг/мл)	Номер	Образец	EC_{50} (нг/мл)
1	DFSK9-1	170,8	7	DFSK9-17	31,41
2	DFSK9-12	64,65	8	DFSK9-18	33,9
3	DFSK9-13	83,51	9	DFSK9-19	83,16
4	DFSK9-14	42,22	10	DFSK9-20	33,73
5	DFSK9-15	39,74	11	DFSK9-21	28,2
6	DFSK9-16	56,21			

5.3. Тестирование полных антител, ингибирующих связывание рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) с PCSK9.

Покрывают LDLR-Fc (100 нг/лунка/100 мкл) при помощи 0,01 М буфера PBS при pH 7,2 в течение ночи при 4°C, промывают три раза с помощью PBST, затем добавляют PBST-4% молоко и блокируют в течение 1 ч при 37°C; затем добавляют 2 мкг/мл PCSK9-His (100 мкл/лунка), разведенного PBST-4% молоком, и инкубируют до 1 ч при 37°C; добавляют полные антитела DFSK9-1, DFSK9-12, DFSK9-13, DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-19, DFSK9-20 и DFSK9-21 в разной степени разбавления; самая высокая концентрация 11-ти полных антител составляет 100 мкг/мл, разбавляют с пятикратным градиентом, разбавляют для восьми градиентов для каждого полного антитела, и инкубируют в течение 2 ч при 37°C; промывают 5 раз раствором PBST с последующим добавлением мышиного анти-His IgG-HRP вторичного антитела, разбавленного PBST-4% молоком и инкубируют в течение 1 ч при 37°C; проявляют, используя TMB набор для проявки (100 мкл/лунка), проявляя в течение 10 мин при комнатной температуре и останавливая проявку с помощью 2М H₂SO₄ (50 мкл/лунка); считывают показатели с помощью микропланшетного ридера при 450 и 630 нм; анализируют данные и графически изображают, используя программу GraphPad Prism 5 Demo (результаты показаны на фиг. 9 и в табл. 3). Результаты показывают, что все антитела могут эффективно ингибировать связывание PCSK9 с LDLR, и DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-20 и DFSK9-21 обладают более высокой ингибирующей способностью.

Таблица 3

Значение IC_{50} в конкурентном тестировании полных антител

Номер	Образец	IC_{50} (нг/мл)	Номер	Образец	IC_{50} (нг/мл)
1	DFSK9-1	847,4	7	DFSK9-17	88,98
2	DFSK9-12	266,2	8	DFSK9-18	107,5
3	DFSK9-13	382,8	9	DFSK9-19	533,5
4	DFSK9-14	145,9	10	DFSK9-20	216,3
5	DFSK9-15	113,9	11	DFSK9-21	161,3
6	DFSK9-16	281,7			

5.4. Определение аффинности полных антител с помощью BIAcore X100.

Определение аффинности полных антител выполняют с использованием метода захвата; связывают козы античеловеческие IgG с поверхностью чипа CM5, соответственно разбавляя DFSK9-1, DFSK9-12, DFSK9-13, DFSK9-14, DFSK9-15, DFSK9-16, DFSK9-17, DFSK9-18, DFSK9-19, DFSK9-20 и DFSK9-21 и обеспечивая захват примерно 200 RU (относительных единиц) антител козыми анти-человеческими IgG; устанавливают серию градиентов концентрации (200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ, 3,125 нМ, 1,5625 нМ, 0,78125 нМ) для PCSK9, пропускают через поверхность неподвижной фазы и определяют аффинность антител. Результаты показывают, что все выбранные в результате скрининга антитела имеют высокую аффинность (см. табл. 4), и восемь полных антител, имеющих наибольшую аффинность, отбирают для теста на биологическую активность.

Таблица 4

Экспериментальные значения констант аффинности полных анти-PCSK9 антител

Номер	Образец	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
1	DFSK9-1	5,178E+5	9,191E-5	1,755E-10
2	DFSK9-12	4,180E+5	4,975E-5	1,190E-10
3	DFSK9-13	5,747E+5	2,990E-5	5,202E-11
4	DFSK9-14	2,700E+6	7,901E-5	2,926E-11
5	DFSK9-15	5,425E+5	4,746E-6	8,749E-12
6	DFSK9-16	1,217E+6	5,613E-5	4,613E-11
7	DFSK9-17	1,184E+6	1,844E-6	1,557E-12
8	DFSK9-18	5,117E+5	1,992E-6	3,893E-12
9	DFSK9-19	3,952E+5	7,339E-5	1,857E-10
10	DFSK9-20	9,252E+5	1,451E-5	1,568E-11
11	DFSK9-21	5,918E+5	4,239E-6	7,162E-12

Воплощение 6. Определение биологической активности полных антител против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9).

Клетки HepG2 инокулируют в 96 лунок в количестве $2,5 \times 10^4$ клеток/мл; на следующий день заменяют культуральную среду 10% FBS Mem Ebss Minimum Essential Medium (EMEM) на 80 мкл культуральной среды для анализа с 5% фетальной бычьей сывороткой (FBS) и культивируют в течение 24 ч при 37°C; на следующий день добавляют полные антитела (10 мкл/лунка), разведенные культуральной средой для анализа с разными степенями разведения, в планшет с инокулированными клетками HepG2. Восемь образцов полных антител, имеющих начальную концентрацию 900 нмоль/л, разбавляют с получением трехкратного градиента и разбавляют каждое полное антитело с получением восьми градиентов; затем добавляют раствор PCSK9, 30 нмоль/л (10 мкл/лунка), равномерно перемешивают и культивируют в течение 4 ч при 37°C в присутствии 5% CO₂; добавляют 10 мкл раствора липопротеинов низкой плотности (LDL), маркированного 0,1 мг/мл бордипиррометеном (BODIPY), равномерно перемешивают и непрерывно культивируют в течение 15-20 ч в присутствии 5% CO₂ при 37°C; добавляют 200 мкл PBS в каждую лунку, дважды промывают, добавляют 100 мкл PBS в каждую лунку, считывают значения относительных единиц флуоресценции (RFU) с использованием считывающего устройства для микропланшетов при длинах волн 490 и 520 нм; анализируют данные и графически изображают, используя программу GraphPad Prism 5 Demo (результаты показаны на фиг. 10). В качестве отрицательного контроля с гомологичными IgG диаграммы показывают, что все эти восемь антител могут блокировать связывание PCSK9 с LDLR дозозависимым образом и увеличивают скорость поглощения LDL в клетках HepG2 и эти антитела обладают примерно одинаковой биологической активностью.

Таблица 5

Значение EC₅₀ в тестировании биологической активности

Номер	Образец	EC ₅₀ (нмоль/л)	Номер	Образец	EC ₅₀ (нмоль/л)
1	DFSK9-13	29,61	7	DFSK9-17	18,51
2	DFSK9-14	16,59	8	DFSK9-18	23,91
3	DFSK9	15,31	9	DFSK9-20	17,95
4	DFSK9-16	23,80	10	DFSK9-21	20,33

Для специалистов в данной области техники воплощения описывают раскрытие изобретения только в качестве примеров, и очевидно, что конкретная реализация настоящей заявки не ограничена вышеупомянутыми способами. Любое несущественное улучшение на основе концепции способа и технических схем, раскрытых в описании изобретения, или раскрытия в описании изобретения концепции способа и технических схем без улучшения в других ситуациях входит в объем защиты данной заявки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное анти-PCSK9 антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, где легкая цепь имеет области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, представленные LCDR1, LCDR2 и LCDR3 соответственно; и тяжелая цепь имеет области CDR1, CDR2 и CDR3, представленные HCDR1, HCDR2 и HCDR3 соответственно; где LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 указанного моноклонального анти-PCSK9 антитела выбраны из следующей группы:

первая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1:

SEQ ID NO:22; LCDR2: SEQ ID NO:33; LCDR3: SEQ ID NO:42;
 вторая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:23; LCDR2: SEQ ID NO:34; LCDR3: SEQ ID NO:43;
 третья группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:24; LCDR2: SEQ ID NO:35; LCDR3: SEQ ID NO:44;
 четвертая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:25; LCDR2: SEQ ID NO:35; LCDR3: SEQ ID NO:45;
 пятая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:26; LCDR2: SEQ ID NO:36; LCDR3: SEQ ID NO:46;
 шестая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:27; LCDR2: SEQ ID NO:37; LCDR3: SEQ ID NO:47;
 седьмая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:28; LCDR2: SEQ ID NO:38; LCDR3: SEQ ID NO:48;
 восьмая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:29; LCDR2: SEQ ID NO:39; LCDR3: SEQ ID NO:49;
 девятая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:30; LCDR2: SEQ ID NO:40; LCDR3: SEQ ID NO:50;
 десятая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:31; LCDR2: SEQ ID NO:39; LCDR3: SEQ ID NO:51;
 одиннадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:53; HCDR2: SEQ ID NO:56; HCDR3: SEQ ID NO:62; LCDR1: SEQ ID NO:32; LCDR2: SEQ ID NO:41; LCDR3: SEQ ID NO:52;
 двенадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:54; HCDR2: SEQ ID NO:57; HCDR3: SEQ ID NO:63; LCDR1: SEQ ID NO:23; LCDR2: SEQ ID NO:34; LCDR3: SEQ ID NO:43;
 тринадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:55; HCDR2: SEQ ID NO:59; HCDR3: SEQ ID NO:66; LCDR1: SEQ ID NO:29; LCDR2: SEQ ID NO:39; LCDR3: SEQ ID NO:49;
 четырнадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:55; HCDR2: SEQ ID NO:60; HCDR3: SEQ ID NO:64; LCDR1: SEQ ID NO:26; LCDR2: SEQ ID NO:36; LCDR3: SEQ ID NO:46;
 пятнадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:54; HCDR2: SEQ ID NO:60; HCDR3: SEQ ID NO:63; LCDR1: SEQ ID NO:27; LCDR2: SEQ ID NO:37; LCDR3: SEQ ID NO:47;
 шестнадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:54; HCDR2: SEQ ID NO:59; HCDR3: SEQ ID NO:65; LCDR1: SEQ ID NO:26; LCDR2: SEQ ID NO:36; LCDR3: SEQ ID NO:46;
 семнадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:54; HCDR2: SEQ ID NO:61; HCDR3: SEQ ID NO:63; LCDR1: SEQ ID NO:27; LCDR2: SEQ ID NO:37; LCDR3: SEQ ID NO:47;
 восемнадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:54; HCDR2: SEQ ID NO:61; HCDR3: SEQ ID NO:63; LCDR1: SEQ ID NO:26; LCDR2: SEQ ID NO:36; LCDR3: SEQ ID NO:46;
 девятнадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:55; HCDR2: SEQ ID NO:58; HCDR3: SEQ ID NO:67; LCDR1: SEQ ID NO:25; LCDR2: SEQ ID NO:35; LCDR3: SEQ ID NO:45;
 двадцатая группа: HCDR1: SEQ ID NO:55; HCDR2: SEQ ID NO:61; HCDR3: SEQ ID NO:65; LCDR1: SEQ ID NO:27; LCDR2: SEQ ID NO:37; LCDR3: SEQ ID NO:47;
 двадцать первая группа: HCDR1: SEQ ID NO:55; HCDR2: SEQ ID NO:60; HCDR3: SEQ ID NO:65; LCDR1: SEQ ID NO:27; LCDR2: SEQ ID NO:37; LCDR3: SEQ ID NO:47.

2. Моноклональное анти-PCSK9 антитело по п.1, где аминокислотная последовательность вариативной области легкой цепи предпочтительно выбрана из любой из SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:21, где аминокислотная последовательность вариативной области тяжелой цепи предпочтительно выбрана из любой из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10.

3. Моноклональное анти-PCSK9 антитело по любому из пп.1, 2, где константная область тяжелой цепи моноклонального анти-PCSK9 антитела содержит IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и константная область легкой цепи содержит C_κ или C_λ.

4. Моноклональное анти-PCSK9 антитело по п.3, где константная область тяжелой цепи содержит IgG4 или IgG2 и константная область легкой цепи содержит C_κ.

5. Рекомбинантный экспрессионный ДНК-вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность для кодирования тяжелой цепи и легкой цепи моноклонального анти-PCSK9 антитела по п.1 или 2.

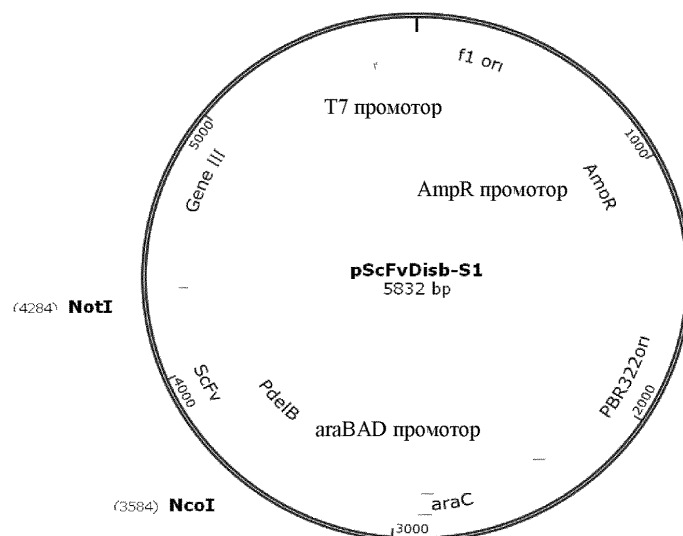
6. Клетка-хозяин, трансфицированная вектором по п.5.

7. Клетка-хозяин по п.6, где клетка-хозяин включает прокариотическую клетку, клетку дрожжей, клетку насекомого или клетку млекопитающего.

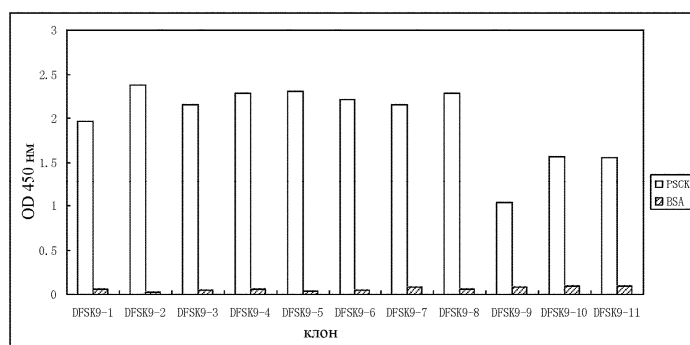
8. Клетка-хозяин по п.7, где прокариотическая клетка представляет собой клетку *Escherichia coli*; клетка млекопитающего представляет собой клетку HEK293 (клетку эмбриональной почки человека 293), клетку CHO (клетку яичника китайского хомячка) или клетку NS0.

9. Применение анти-PCSK9 антитела по любому из пп.1, 2 для удаления, ингибирования или

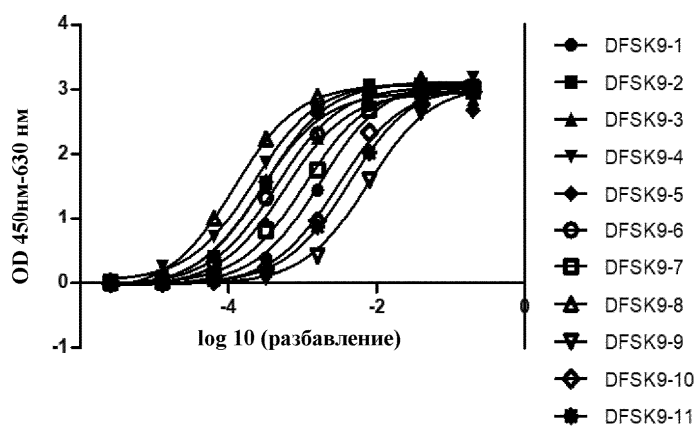
уменьшения активности PCSK9 и ослабления, облегчения, ингибирования или предупреждения заболеваний, где заболевания включают дислипидемию, сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания и тромботические окклюзионные заболевания.



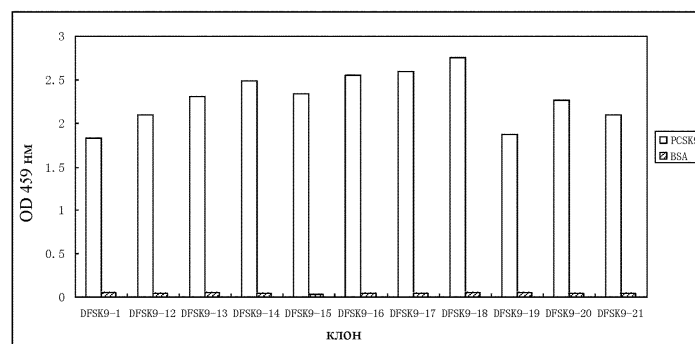
Фиг. 1



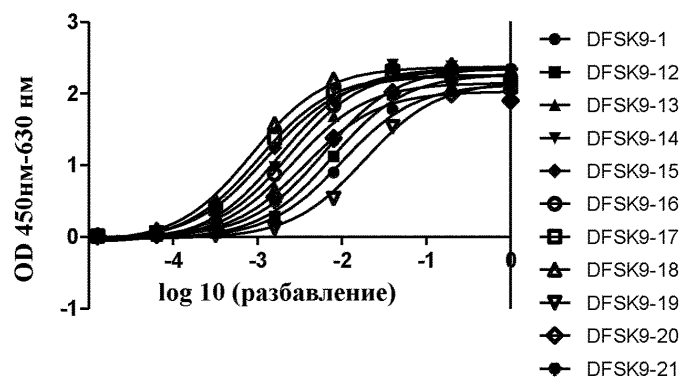
Фиг. 2



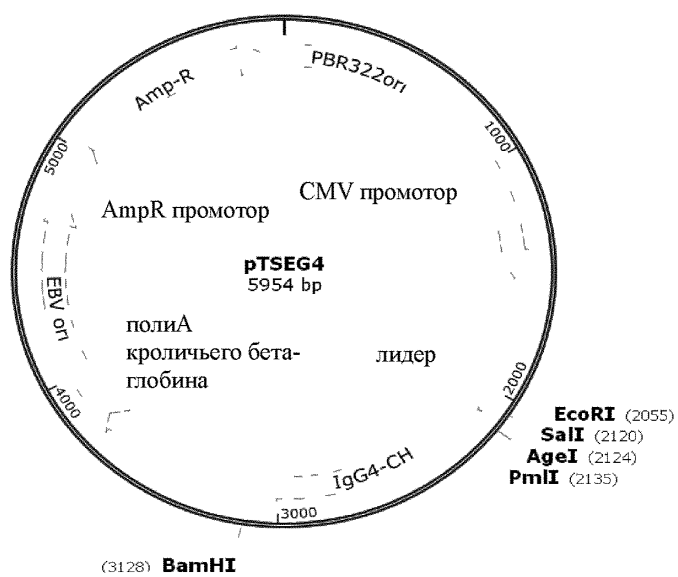
Фиг. 3



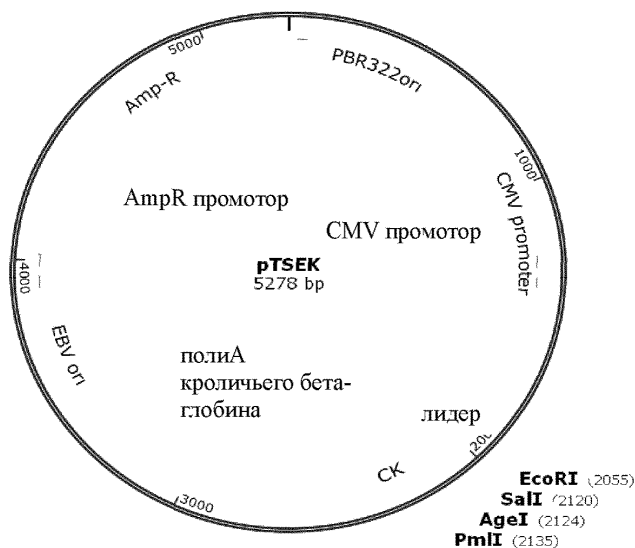
Фиг. 4



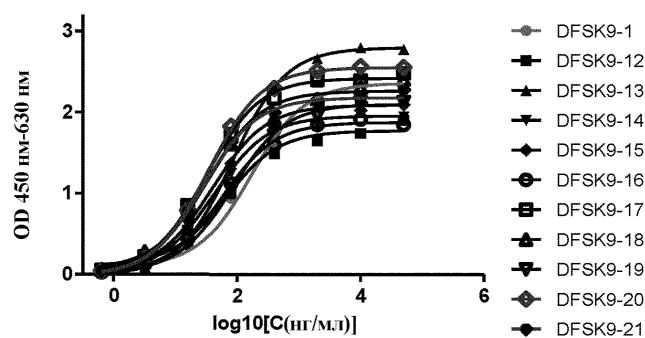
Фиг. 5



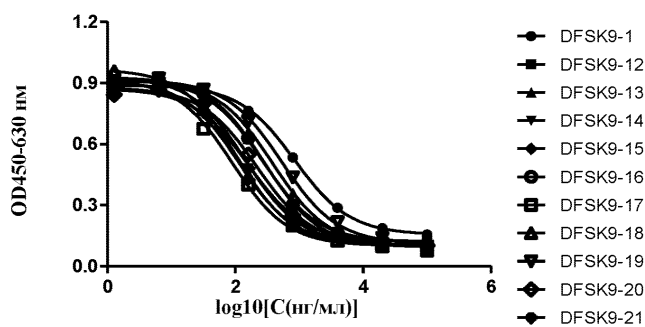
Фиг. 6



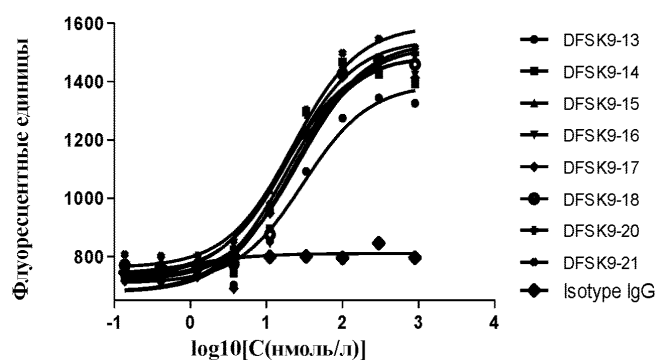
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10