(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 039663 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.24

(21) Номер заявки
201792336

(22) Дата подачи заявки
2012.05.10

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PCSK9 ДЛЯ СНИЖЕНИЯ СЫВОРОТОЧНОГО ХОЛЕСТЕРИНА ЛПНП И ЛЕЧЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С ХОЛЕСТЕРИНОМ РАССТРОЙСТВ

(31) **61/484,610; 61/562,303; 61/595,526; 61/614,417; 61/642,363**
(32) **2011.05.10; 2011.11.21; 2012.02.06; 2012.03.22; 2012.05.03**
(33) **US**
(43) **2018.06.29**
(62) **201391668; 2012.05.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АМГЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Чань Джойс Чи Йии, Гиббс Джон П., Диас Клаптон С., Вассерман Скотт, Скотт Роберт Эндрю Дональд, Клогстон Кристи Л., Осслунд Тимоти Дэвид, Стейн Эван А. (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(56) WO-A1-2009100297
US-A1-20100166768
US-A1-20090142352

(57) Изобретение связано с лечением или предупреждением связанных с холестерином расстройств, таких как гиперхолестеринемия, гиперлипидемия или дислипидемия. Конкретно, предложено применение описанного в формуле изобретения антитела против PCSK9 в количестве от 70 до 450 мг для снижения сывороточного холестерина ЛПНП у пациента и для лечения или предотвращения связанного с холестерином расстройства у пациента с уровнем сывороточного холестерина ЛПНП.

039663 B1

039663 B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Заявка на данный патент испрашивает приоритет по временной заявке США № 61/642363, поданной 3 мая 2012 г., временной заявке США № 61/614417, поданной 22 марта 2012 г., временной заявке США № 61/595,526, поданной 6 февраля 2012 г., временной заявке США № 61/562303, поданной 21 ноября 2011 г., временной заявке США № 61/484610, поданной 10 мая 2011 г., все из которых включены в данное описание путем ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка подана вместе с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием A-1635-WO-PCT_Sequence_Listing.txt, созданного 10 мая 2012 г., размер которого составляет 315 КБайт. Информация из Перечня последовательностей в электронном формате включена в данное описание путем ссылки в полном объеме.

Область техники

Настоящее изобретение связано со способами лечения или предупреждения связанных с холестерином расстройств, таких как гиперхолестеринемия, гиперлипидемия или дислипидемия, с применением антигенсвязывающих белков, в том числе, антител, против пропротеин конвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9). Дополнительно описаны фармацевтические композиции и способы получения указанных композиций.

Уровень техники

"Связанные с холестерином расстройства" (которые включают "связанные с холестерином сыворотки расстройства") включают любое одно или более из следующего: гиперхолестеринемия, гиперлипидемия, заболевание сердца, метаболический синдром, диабет, заболевание коронарных сосудов сердца, инсульт, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Альцгеймера и дислипидемии в целом, которые могут проявляться, например, повышенным уровнем общего холестерина в сыворотке, повышенным уровнем ЛПНП, повышенным уровнем триглицеридов, повышенным уровнем ЛПОНП и/или низким уровнем ЛПВП. Гиперхолестеринемия, фактически, представляет собой признанный фактор риска заболевания коронарных сосудов сердца у человека (ЗКС).

Снижение холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-Х) приводит к снижению риска сердечно-сосудистых заболеваний и является основной целью фармакотерапии при ЗКС. Статины (ингибиторы гидроксиметилглутарил коэнзим А редуктазы [ГМГ КоА]) в настоящий момент являются терапией выбора при гиперхолестеринемии. Однако появляющиеся данные указывают, что более агрессивное лечение гиперхолестеринемии связано с более низким риском катастроф при ЗКС. Кроме того, подмножество больных не переносят или не отвечают надлежащим образом на лечение статинами. Таким образом, могут быть полезными новые терапевтические средства, которые могут применяться отдельно или в комбинации с существующими средствами, и более эффективно снижают ЛПНП-Х.

Хорошо установлено, что рециклизация рецептора липопротеинов низкой плотности на поверхности клеток печени (ЛПНПР) играет критическую роль в поддержании клеточного и организменного баланса холестерина, регулируя уровни ЛПНП-Х в плазме. Позже было показано, что пропротеин конвертаза субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) играет важную роль в рециклизации и регуляции ЛПНПР. PCSK9 является членом субтилизинового семейства серинпротеаз и экспрессируется, в основном, в печени. После секреции, она вызывает посттрансляционную регуляцию вниз ЛПНПР на поверхности клеток печени по механизму, который включает прямое связывание с ЛПНПР. Регуляция вниз печеночного ЛПНПР, в свою очередь, приводит к повышению уровней циркулирующего ЛПНП-Х. Таким образом, PCSK9 может представлять мишень для ингибирования новыми терапевтическими средствами в условиях гиперхолестеринемии. Серьезное обоснование такого подхода получено в результате исследований на доклинических моделях и на основе данных относительно того, что у людей с мутациями PCSK9 с утратой функции уровни холестерина ниже нормы, и частота ЗКС снижена.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте изобретения предложено применение от 70 мг до 450 мг антитела против PCSK9 для снижения сывороточного холестерина ЛПНП у пациента, причем антитело против PCSK9 содержит: a) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи, имеющий последовательность CDRL1 в SEQ ID NO: 23, CDRL2, имеющий последовательность CDRL2 в SEQ ID NO: 23, и CDRL3, имеющий последовательность CDRL3 в SEQ ID NO: 23, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи, имеющий последовательность CDRH1 в SEQ ID NO: 49, CDRH2, имеющий последовательность CDRH2 в SEQ ID NO: 49, и CDRH3, имеющий последовательность CDRH3 в SEQ ID NO: 49, причем CDR определены по Chothia или AbM; b) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 395, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 368, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180; c) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, CDRL2, содер-

жащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, или d) вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение от 70 мг до 450 мг антитела против PCSK9 для лечения или предотвращения связанного с холестерином расстройства у пациента с уровнем сывороточного холестерина ЛПНП, причем антитело против PCSK9 содержит: a) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи, имеющий последовательность CDRL1 в SEQ ID NO: 23, CDRL2, имеющий последовательность CDRL2 в SEQ ID NO: 23, и CDRL3, имеющий последовательность CDRL3 в SEQ ID NO: 23, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи, имеющий последовательность CDRH1 в SEQ ID NO: 49, CDRH2, имеющий последовательность CDRH2 в SEQ ID NO: 49, и CDRH3, имеющий последовательность CDRH3 в SEQ ID NO: 49, причем CDR определены по Chothia или AbM; b) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 395, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 368, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180; c) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, или d) вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

В одном варианте осуществления изобретения связанное с холестерином расстройство выбрано из группы, состоящей из семейной гиперхолестеринемии, в том числе, гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии и гомозиготной семейной гиперхолестеринемии, несемейной гиперхолестеринемии, повышенного уровня липопротеина (a), заболевания сердца, метаболического синдрома, диабета, заболевания коронарных сосудов сердца, инсульта, сердечно-сосудистого заболевания, болезни Альцгеймера, заболевания периферических артерий, гиперлипидемии и дислипидемии. В еще одном варианте осуществления изобретения семейная гиперхолестеринемия включает гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию и гомозиготную семейную гиперхолестеринемию. В еще одном варианте осуществления изобретения уровень сывороточного холестерина ЛПНП у указанного пациента снижается на количество, выбранное из группы, состоящей из a) по меньшей мере около 15%, b) по меньшей мере около 30%, c) по меньшей мере около 40%, d) по меньшей мере около 50% и e) по меньшей мере около 60%. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 содержит гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи, имеющий последовательность CDRL1 в SEQ ID NO: 23, CDRL2, имеющий последовательность CDRL2 в SEQ ID NO: 23, и CDRL3, имеющий последовательность CDRL3 в SEQ ID NO: 23, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи, имеющий последовательность CDRH1 в SEQ ID NO: 49, CDRH2, имеющий последовательность CDRH2 в SEQ ID NO: 49, и CDRH3, имеющий последовательность CDRH3 в SEQ ID NO: 49, причем CDR определены по Chothia или AbM. В еще одном варианте осуществления изобретения тяжелая цепь содержит CDR1, содержащий SEQ ID NO: 308, CDR2, содержащий SEQ ID NO: 320, и CDR3, содержащий SEQ ID NO: 310, и легкая цепь содержит CDR1, содержащий SEQ ID NO: 305, CDR2, содержащий SEQ ID NO: 312, и CDR3, содержащий SEQ ID NO: 319. В еще одном варианте осуществления изобретения тяжелая цепь содержит CDR1, содержащий SEQ ID NO: 368, CDR2, содержащий SEQ ID NO: 175, и CDR3, содержащий SEQ ID NO: 180, и легкая цепь содержит CDR1, содержащий SEQ ID NO: 158, CDR2, содержащий SEQ ID NO: 162, и CDR3, содержащий SEQ ID NO: 395. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 используется в дозе, выбранной из группы, состоящей из a) от около 105 до 420 мг, b) от около 120 до около 200 мг, c) от около 140 до около 180 мг, d) от около 140 до около 170 мг, e) от около 250 до 420 мг, f) от около 250 до 420 мг, g) от около 250 до 420 мг; h) от около 350 до 420 мг, i) 70 мг, j) около 105 мг, k) около 120 мг, l) около 140 мг, m) около 150 мг, n) около 210 мг, o) около 280 мг, p) около 300 мг, q) около 350 мг, или r) 420 мг. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 применяют по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) 1 раз в неделю, (2) 1 раз в 2 недели, (3) 1 раз в месяц, (4) 1 раз в 2 месяца, (5) 1 раз в 3 месяца, (6) 1 раз в 6 месяцев и (7) 1 раз в 12 месяцев. В еще одном варианте осуществления изобретения

антитело против PCSK9 составлено для парентерального введения. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 составлено для внутривенного введения. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 составлено для подкожного введения.

В одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 содержит i) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 395, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 368, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180; или ii) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 содержит гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи, имеющий последовательность CDR1 в SEQ ID NO: 23, CDRL2, имеющий последовательность CDRL2 в SEQ ID NO: 23, и CDRL3, имеющий последовательность CDRL3 в SEQ ID NO: 23, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи, имеющий последовательность CDRH1 в SEQ ID NO: 49, CDRH2, имеющий последовательность CDRH2 в SEQ ID NO: 49, и CDRH3, имеющий последовательность CDRH3 в SEQ ID NO: 49, причем CDR определены по Chothia или AbM. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 находится в дозе 70 мг и составлено для подкожного введения, причем применение включает снижение уровня холестерина ЛПНП в сыворотке пациента по меньшей мере на около 15-50%. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 находится в дозе от 70 мг до 280 мг и составлено для подкожного введения, причем применение включает снижение уровня сывороточного холестерина ЛПНП пациента по меньшей мере на около 15-50%. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 находится в дозе от 280 мг до 420 мг и составлено для подкожного введения, причем применение включает снижение уровня сывороточного холестерина ЛПНП пациента по меньшей мере на около 15-50%. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело против PCSK9 применяют в дозе 120 мг, 140 мг или 420 мг.

В одном варианте осуществления изобретения применение предусматривает дополнительное применение по меньшей мере одного другого средства для снижения уровня холестерина перед, после или одновременно с антителом против PCSK9. В еще одном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одно другое средство для снижения уровня холестерина выбрано из группы, состоящей из статинов, включая аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин, симвастатин, никотиновой кислоты, фибриновой кислоты, секвестрантов желчных кислот, ингибитора абсорбции холестерина, модифицирующих липиды средств, агонистов ППАР гамма, агонистов ППАР альфа/гамма, ингибиторов скваленсинтетазы, ингибиторов ТБХЭ, антигипертензивных средств, противодиабетических средств, включая сульфонилмочевины, инсулин, аналоги GLP-1, ингибиторы ДДП4, модуляторов АроВ, ингибиторов МБТ и/или средств для лечения облитерирующего артериосклероза, онкостатина М, эстрогена, бербина и терапевтического средства для связанного с иммунитетом расстройства.

Другие варианты данного изобретения будут очевидны из прилагаемого описания.

Краткое описание фигур

Фиг. 1А иллюстрирует последовательность аминокислот зрелой формы PCSK9 с подчеркнутым pro-доменом.

Фиг. $1B_1$-$1B_4$ иллюстрируют последовательности аминокислот и нуклеиновой кислоты PCSK9 с подчеркнутым pro-доменом и сигнальной последовательностью, выделенной полужирным начертанием шрифта.

Фиг. 2А-2D иллюстрируют таблицы сравнения последовательности различных легких цепей различных антигенсвязывающих белков. На фиг. 2С продолжается последовательность, начатая на фиг. 2А. На фиг. 2D продолжается последовательность, начатая на фиг. 2В.

Фиг. 3А-3D иллюстрируют таблицы сравнения последовательности различных тяжелых цепей различных антигенсвязывающих белков. На фиг. 3С продолжается последовательность, начатая на фиг. 3А. На фиг. 3D продолжается последовательность, начатая на фиг. 3В.

Фиг. 3Е-3JJ иллюстрируют последовательности аминокислот и нуклеиновой кислоты для вариабельных доменов некоторых вариантов антигенсвязывающих белков.

Фиг. 3KK иллюстрирует последовательности аминокислот для различных константных доменов.

Фиг. 3LL-3BBB иллюстрируют последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот для вариа-

бельных доменов некоторых вариантов антигенсвязывающих белков.

Фиг. 3CCC-3JJJ иллюстрируют таблицы сравнения последовательностей различных тяжелых и легких цепей для некоторых вариантов антигенсвязывающих белков.

Фиг. 4A иллюстрирует кривую связывания антигенсвязывающего белка с PCSK9 человека.

Фиг. 4B иллюстрирует кривую связывания антигенсвязывающего белка с PCSK9 человека.

Фиг. 4C иллюстрирует кривую связывания антигенсвязывающего белка с PCSK9 яванской макаки.

Фиг. 4D иллюстрирует кривую связывания антигенсвязывающего белка с PCSK9 яванской макаки.

Фиг. 4E иллюстрирует кривую связывания антигенсвязывающего белка с PCSK9 мыши.

Фиг. 4F иллюстрирует кривую связывания антигенсвязывающего белка с PCSK9 мыши.

Фиг. 5A иллюстрирует результаты эксперимента SDS PAGE с участием PCSK9 и различных антигенсвязывающих белков, демонстрирующего относительную чистоту и концентрацию белков.

Фиг. 5B и 5C иллюстрируют графики анализов равновесия в растворе Biacore для 21B12.

Фиг. 5D иллюстрирует график кинетики анализа захвата Biacore.

Фиг. 5E представляет собой гистограмму, иллюстрирующую результаты связывания для трех антигенсвязывающих белков.

Фиг. 6A иллюстрирует кривую ингибирования для антигенсвязывающего белка 31H4 IgG2 против PCSK9 в анализе связывания PCSK9:ЛПНПР in vitro.

Фиг. 6B иллюстрирует кривую ингибирования для антигенсвязывающего белка 31H4 IgG4 против PCSK9 в анализе связывания PCSK9:ЛПНПР in vitro.

Фиг. 6C иллюстрирует кривую ингибирования для антигенсвязывающего белка 21B12 IgG2 против PCSK9 в анализе связывания PCSK9:ЛПНПР in vitro.

Фиг. 6D иллюстрирует кривую ингибирования для АСБ 21B12 IgG4 против PCSK9 в анализе связывания PCSK9:ЛПНПР in vitro.

Фиг. 7A представляет собой кривую ингибирования для АСБ 31H4 IgG2 в анализе захвата ЛПНП клеткой, иллюстрирующую влияние антигенсвязывающего белка в направлении уменьшения эффектов блокирования PCSK9 захвата ЛПНП.

Фиг. 7B представляет собой кривую ингибирования для АСБ 31H4 IgG4 в анализе захвата ЛПНП клеткой, иллюстрирующую влияние антигенсвязывающего белка в направлении снижения эффектов блокирования PCSK9 захвата ЛПНП.

Фиг. 7C представляет собой кривую ингибирования для АСБ 21B12 IgG2 в анализе захвата ЛПНП клеткой, иллюстрирующую влияние антигенсвязывающего белка в направлении снижения эффектов блокирования PCSK9 захвата ЛПНП.

Фиг. 7D представляет собой кривую ингибирования для антигенсвязывающего белка 21B12 IgG4 в анализе захвата ЛПНП клеткой, иллюстрирующую влияние антигенсвязывающего белка в направлении снижения эффектов блокирования PCSK9 захвата ЛПНП.

Фиг. 8A представляет собой график, иллюстрирующий способность антигенсвязывающего белка 31H4 снижать холестерин сыворотки у мышей, изменения относительно леченных контрольным IgG мышей (* $p<0,01$).

Фиг. 8B представляет собой график, иллюстрирующий способность антигенсвязывающего белка 31H4 снижать холестерин сыворотки у мышей, изменения относительно точки времени = 0 ч (#p, 0,05).

Фиг. 8C представляет собой график, иллюстрирующий влияние АСБ 31H4 на уровни холестерина ЛПВП у мышей C57B1/6 (* $p<0,01$).

Фиг. 8D представляет собой график, иллюстрирующий влияние АСБ 31H4 на уровни холестерина ЛПВП у мышей C57B1/6 (# $p<0,05$).

Фиг. 9 иллюстрирует анализ методом вестерн-блоттинга способности АСБ 31H4 увеличивать количество белка ЛПНПР в печени в различных временных точках.

Фиг. 10A представляет собой график, иллюстрирующий способность антигенсвязывающего белка 31H4 снижать общий холестерин сыворотки у мышей дикого типа, относительный.

Фиг. 10B представляет собой график, иллюстрирующий способность антигенсвязывающего белка 31H4 снижать уровень ЛПВП у мышей дикого типа.

Фиг. 10C представляет собой график, иллюстрирующий способность различных антигенсвязывающих белков 31H4 и 16F12 снижать уровень холестерина сыворотки.

Фиг. 11A иллюстрирует протокол инъекций для проверки продолжительности и способности антигенсвязывающих белков снижать уровень холестерина сыворотки.

Фиг. 11B представляет собой график, иллюстрирующий результаты протокола на фиг. 11A.

Фиг. 12A иллюстрирует уровни ЛПНПР в клетках HepG2 в ответ на комбинацию статина и антигенсвязывающего белка 21B12.

Фиг. 12B иллюстрирует уровни ЛПНПР в ответ на комбинацию статина и антигенсвязывающего белка 31H4 в клетках HepG2.

Фиг. 12C иллюстрирует уровни ЛПНПР в клетках HepG2 в ответ на комбинацию статина и антигенсвязывающего белка 25A7.1, не нейтрализующего антитела (в противоположность нейтрализующему антителу "25A7").

Фиг. 12D иллюстрирует уровни ЛПНПР в ответ на комбинацию статина и АСБ 21B12 в клетках HepG2, чрезмерно экспрессирующих PCSK9.

Фиг. 12E иллюстрирует уровни ЛПНПР в ответ на комбинацию статина и АСБ 31H4 в клетках HepG2, чрезмерно экспрессирующих PCSK9.

Фиг. 12F иллюстрирует уровни ЛПНПР в ответ на комбинацию статина и АСБ 25A7.1, не нейтрализующего антитела (в противоположность нейтрализующему антителу "25A7") в клетках HepG2, чрезмерно экспрессирующих PCSK9.

Фиг. 13A иллюстрирует различные последовательности аминокислот легкой цепи различных АСБ против PCSK9. Точки (.) показывают отсутствие аминокислоты.

Фиг. 13B иллюстрирует кладограмму легкой цепи для различных АСБ против PCSK9.

Фиг. 13C иллюстрирует различные последовательности аминокислот тяжелой цепи различных АСБ против PCSK9. Точки (.) показывают отсутствие аминокислоты.

Фиг. 13D иллюстрирует дендрограмму тяжелой цепи для различных АСБ против PCSK9.

Фиг. 13E иллюстрирует сравнение CDR легкой и тяжелой цепи с обозначением групп, из которых получен консенсус.

Фиг. 13F иллюстрирует консенсусные последовательности для групп 1 и 2.

Фиг. 13G иллюстрирует консенсусные последовательности для групп 3 и 4.

Фиг. 13H иллюстрирует консенсусные последовательности для групп 1 и 2. Точки (.) показывают идентичные остатки.

Фиг. 13I иллюстрирует консенсусные последовательности для группы 2. Точки (.) показывают идентичные остатки.

Фиг. 13J иллюстрирует консенсусные последовательности для групп 3 и 4. Точки (.) показывают идентичные остатки.

Фиг. 14 представляет собой график, иллюстрирующий снижение уровней ЛПНП-Х у больных, получающих множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 15 представляет собой график, иллюстрирующий снижение уровней ЛПНП-Х у больных, получающих низкие или средние, а также высокие дозы статинов, которым вводили множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 16 представляет собой график, иллюстрирующий снижение уровней ApoB у больных, получающих множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 17 представляет собой гистограмму, которая иллюстрирует снижение уровней липопротеина ("Lp(a)") у больных, получающих низкие или средние, а также высокие дозы статинов, которым вводили множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 18 представляет собой график, иллюстрирующий снижение уровней ЛПНП-Х у больных с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией ("ГеСГ"), получающих множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 19 представляет собой график, иллюстрирующий снижение уровней PCSK9 у больных с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией ("ГеСГ"), получающих множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 20 представляет собой график, иллюстрирующий снижение общих уровней холестерина у больных с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией ("ГеСГ"), получающих множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 21 представляет собой график, иллюстрирующий снижение уровней не-ЛПВП холестерина у больных с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией ("ГеСГ"), получающих множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 22 представляет собой график, иллюстрирующий снижение уровней ApoB у больных с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией ("ГеСГ"), получающих множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 23 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую снижение уровней липопротеина ("Lp(a)") у больных с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией ("ГеСГ"), получающих множественные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12).

Фиг. 24A представляет собой график, иллюстрирующий обобщенные данные касательно снижения уровней ЛПНП-Х у больных из четырех исследований, описанных в примерах 22-25, которые получали различные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12) 1 раз в 2 недели (К2Н) на протяжении периода 12 недель.

Фиг. 24B представляет собой график, иллюстрирующий обобщенные данные касательно снижения уровней ЛПНП-Х у больных из четырех исследований, описанных в примерах 22-25, которые получали различные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12) 1 раз в 4 недели (К4Н) на протяжении периода 12 недель.

Фиг. 25A представляет собой гистограмму, иллюстрирующую обобщенные данные касательно снижения уровней Lp(a) у больных из четырех исследований, описанных в примерах 22-25, которые получали различные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12) 1 раз в 2 недели (К2Н) или 1 раз в 4 недели (К4Н) на протяжении периода 12 недель.

Фиг. 25B представляет собой гистограмму, иллюстрирующую обобщенные данные касательно

снижения уровней ЛПВП-Х у больных из четырех исследований, описанных в примерах 22-25, которые получали различные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12) 1 раз в 2 недели (К2Н) или 1 раз в 4 недели (К4Н) на протяжении периода 12 недель.

Фиг. 25C представляет собой гистограмму, иллюстрирующую обобщенные данные касательно снижения уровней триглицеридов у больных из четырех исследований, описанных в примерах 22-25, которые получали различные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12) 1 раз в 2 недели (К2Н) или 1 раз в 4 недели (К4Н) на протяжении периода 12 недель.

Фиг. 25D представляет собой гистограмму, иллюстрирующую обобщенные данные касательно снижения уровней ЛПОНП-Х у больных из четырех исследований, описанных в примерах 22-25, которые получали различные дозы анти-PCSK9 антитела (21B12) 1 раз в 2 недели (К2Н) или 1 раз в 4 недели (К4Н) на протяжении периода 12 недель.

Фиг. 26 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую вязкость композиций анти-PCSK9 антитела (21B12), содержащих различные стабилизаторы/вспомогательные вещества.

Фиг. 27 представляет собой график, иллюстрирующий способность стабилизатора/вспомогательного вещества, пролина, снижать вязкость композиций анти-PCSK9 антитела (21B12), содержащих высокие концентрации белка.

Фиг. 28A представляет собой график, иллюстрирующий вязкость различных концентраций анти-PCSK9 антитела, 21B12, в композиции, содержащей 10 мМ натрия ацетата и 9% сахарозы, pH 5,2, при 25 и 40°C.

Фиг. 28B представляет собой график, иллюстрирующий вязкость различных концентраций анти-PCSK9 антитела, 21B12, в композиции, содержащей 10 мМ натрия ацетата и 9% сахарозы, pH 5,2, при 25 и 40°C, по сравнению с композицией, содержащей 10 мМ натрия ацетата, 125 мМ аргинина и 3% сахарозы, pH 5,0 при 25 и 40°C.

Фиг. 28C представляет собой график, иллюстрирующий вязкость различных концентраций анти-PCSK9 антитела, 21B12, в композиции, содержащей 10 мМ натрия ацетата и 9% сахарозы, pH 5,2, при 25 и 40°C, по сравнению с композицией, содержащей 10 мМ натрия ацетата, 100 мМ метионина и 4% сахарозы, pH 5,0 при 25 и 40°C.

Фиг. 28D представляет собой график, иллюстрирующий вязкость различных концентраций анти-PCSK9 антитела, 21B12, в композиции, содержащей 10 мМ натрия ацетата и 9% сахарозы, pH 5,2, при 25 и 40°C, по сравнению с композицией, содержащей 10 мМ натрия ацетата и 250 мМ пролина, pH 5,0, при 25 и 40°C.

Фиг. 29A представляет собой гистограмму, иллюстрирующую количество частиц размером 10 мкм в различных препаратах композиций анти-PCSK9 антитела (т.е. 21B12) на протяжении периода 6 месяцев.

Фиг. 29B представляет собой гистограмму, иллюстрирующую количество частиц размером 25 мкм в различных препаратах композиций анти-PCSK9 антитела (т.е. 21B12) на протяжении периода 6 месяцев.

Фиг. 30A представляет собой гистограмму, иллюстрирующую количество частиц размером 10 мкм в различных препаратах композиций анти-PCSK9 антитела (т.е. 11F1) на протяжении периода 4 месяца.

Фиг. 30B представляет собой гистограмму, иллюстрирующую количество частиц размером 25 мкм в различных препаратах композиций анти-PCSK9 антитела (т.е. 11F1) на протяжении периода 4 месяца.

Фиг. 31 представляет собой график, иллюстрирующий специфичность связывания 11F1 в анализе конкуренции с PCSKP, PCSK2, PCSK1, PCSK7 и фурином (Furin), причем OD_{450} нанесена на график по оси Y, и концентрация PCSK9 (мкг/мл) нанесена на график по оси X.

Фиг. 32 представляет собой график, иллюстрирующий кривую доза-реакция для ингибирования связывания ЛПНПР:D374Y PCSK9 с 11F1 в анализе конкуренции, причем OD_{450} нанесена на график по оси Y, и Log [11F1] (пМ) нанесен на график по оси X.

Фиг. 33 представляет собой график, иллюстрирующий кривую доза-реакция для ингибирования связывания ЛПНПР:PCSK9 ДТ под действием 11F1 в анализе конкуренции, причем OD_{450} нанесена на график по оси Y, и Log [11f1] (пМ) нанесен на график по оси X.

Фиг. 34 представляет собой график, иллюстрирующий кривую доза-реакция для способности 11F1 блокировать опосредованное человеческим D374Y PCSK9 снижение захвата ЛПНП клетками HepG2, с относительными единицами флуоресценции ($\times 10^4$), нанесенными на график по оси Y, и Log [11F1] (нМ), нанесенным на график по оси X.

Фиг. 35 представляет собой график, иллюстрирующий кривую доза-реакция для способности 11F1 блокировать опосредованное человеческим PCSK9 ДТ снижение захвата ЛПНП клетками HepG2, с относительными единицами флуоресценции, нанесенными ($\times 10^4$) на график по оси Y, и Log [11F1] (нМ), нанесенным на график по оси X.

Фиг. 36 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую влияние 11F1 и 8A3 на холестерин не-ЛПВП сыворотки у мышей, экспрессирующих человеческий PCSK9 под действием ACB, с концентрацией (мг/мл) не-ЛПВП-Х сыворотки по оси Y и временем после инъекции (дни), нанесенным на график по оси X.

Фиг. 37 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую влияние 11F1 и 8A3 на общий холе-

стерин сыворотки у мышей, экспрессирующих человеческий PCSK9, под действием АСВ, где общий холестерин сыворотки (мг/мл) нанесен по оси Y, и время после инъекции (дни) нанесено на график по оси X.

Фиг. 38 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую влияние 11F1 и 8A3 на холестерин ЛПВП сыворотки (ЛПВП-Х) у мышей, экспрессирующих человеческий PCSK9, под действием АСВ, где ЛПВП-Х (мг/мл) нанесен по оси Y, и время после инъекции (дни) нанесено на график по оси X.

Фиг. 39 представляет собой график, иллюстрирующий профили концентрации антител IgG2, 8A3 и 11F1 у мышей, экспрессирующих человеческий PCSK9, под действием АСВ, где концентрация антитела в сыворотке (нг/мл) нанесена на график по оси Y, и время после инъекции в днях нанесено на график по оси X.

Фиг. 40 иллюстрирует таблицу, суммирующую параметры фармакокинетики для IgG2, 11F1 и 8A3 у мышей, экспрессирующих человеческий PCSK9 под действием АСВ.

Фиг. 41 представляет собой график, иллюстрирующий влияние однократного подкожного введения анти-ГЦФ антитела (контроль), 21B12, 8A3 и 11F1 на концентрацию ЛПНП сыворотки (ЛПНП-Х) у яванских макак, где уровень ЛПНП-Х (мг/дл) нанесен на график по оси Y, и время после введения в днях нанесено по оси X.

Фиг. 42 представляет собой график, иллюстрирующий влияние однократного подкожного введения анти-ГЦФ антитела (контроль), 21B12, 8A3 и 11F1 на общий холестерин сыворотки у яванских макак, где концентрация общего холестерина (мг/дл) нанесена график на по оси Y, и время после введения в днях нанесено по оси X.

Фиг. 43 представляет собой график, иллюстрирующий влияние однократного подкожного введения ant-ГЦФ антитела (контроль), 21B12, 8A3 и 11F1 на холестерин ЛПВП сыворотки у яванских макак, где уровень ЛПВП-Х (мг/дл) нанесен на график по оси Y, и время после введения в днях нанесено по оси X.

Фиг. 44 представляет собой график, иллюстрирующий влияние однократного подкожного введения анти-ГЦФ антитела (контроль), 21B12, 8A3 и 11F1 на триглицериды сыворотки у яванских макак, где концентрация триглицеридов (мг/дл) нанесена на график по оси Y, и время после введения в днях нанесено по оси X.

Фиг. 45 представляет собой график, иллюстрирующий влияние однократного подкожного введения анти-ГЦФ антитела (контроль), 21B12, 8A3 и 11F1 на уровень Аполипопротеина B (ApoB) у яванских макак, где концентрация APOB (мг/дл) нанесена на график по оси Y, и время после введения в днях нанесено по оси X.

Фиг. 46 представляет собой график, иллюстрирующий средние фармакокинетические профили для анти-ГЦФ антитела (контроль), 21B12, 8A3 и 11F1 у яванских макак, где концентрация антитела (нг/мл) нанесена на график по оси Y, и время после введения в днях нанесено по оси X.

Фиг. 47 иллюстрирует таблицу, суммирующую параметры фармакокинетики для анти-ГЦФ антитела (контроль), 21B12, 8A3 и 11F1 у яванских макак.

Фиг. 48A иллюстрирует сравнение последовательностей аминокислот легких цепей 8A1, 8A3 и 11F1, а также консенсусную последовательность, полученную в результате сравнения. Последовательности CDR подчеркнуты.

Фиг. 48B иллюстрирует сравнение последовательностей аминокислот тяжелых цепей 8A1, 8A3 и 11F1, а также консенсусную последовательность, полученную в результате сравнения. Последовательности CDR подчеркнуты.

Подробное описание изобретения

Антигенсвязывающие белки (такие как антитела и их функциональные фрагменты связывания), которые связываются с PCSK9, раскрыты в данном описании. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки связываются с PCSK9 и различными путями препятствуют функционированию PCSK9. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки блокируют или снижают способность PCSK9 взаимодействовать с другими субстанциями. Например, в некоторых вариантах антигенсвязывающий белок связывается с PCSK9 таким образом, что до некоторой степени предупреждает или снижает вероятность связывания PCSK9 с ЛПНПР. В других вариантах антигенсвязывающие белки связываются с PCSK9, но не блокируют способность PCSK9 взаимодействовать с ЛПНПР. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки представляют собой человеческие моноклональные антитела.

Как будет понятно квалифицированному специалисту в данной области, в свете настоящего описания, изменение взаимодействия между PCSK9 и ЛПНПР может увеличивать количество ЛПНПР, доступного для связывания с ЛПНП, что, в свою очередь уменьшает количество ЛПНП сыворотки у субъекта и приводит к снижению уровня холестерина в сыворотке субъекта. Как таковые, антигенсвязывающие белки против PCSK9 могут применяться в различных способах и композициях для лечения субъектов с повышенными уровнями холестерина сыворотки, подверженными риску повышения уровней холестерина сыворотки, или которые могут получить пользу от снижения уровней холестерина сыворотки. Таким образом, различные способы и методы снижения, поддержания или предупреждения повышения уровня холестерина сыворотки также описаны в данном описании. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок позволяет связывание между PCSK9 и ЛПНПР, но антигенсвязывающий белок предупреждает или

снижает неблагоприятное воздействие PCSK9 на ЛПНПР. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок предупреждает или уменьшает связывание PCSK9 с ЛПНПР.

Для удобства, в следующих разделах, в общем, описаны различные значения терминов, используемых в данном описании. После данного обсуждения, обсуждаются общие аспекты касательно антигенсвязывающих белков, и далее приведены конкретные примеры, демонстрирующие свойства различных вариантов антигенсвязывающих белков, и как они могут применяться.

В некоторых аспектах изобретения предложена стабильная композиция, содержащая по меньшей мере одно моноклональное антитело, которое специфично связывается с PCSK9, причем PCSK9 содержит аминокислоты SEQ ID NO: 1, при этом моноклональное антитело присутствует в количестве от приблизительно 40 до около 300 мг/мл, и фармацевтически приемлемый буфер присутствует в количестве от около 0,05 мМ до около 40 мМ, и фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество присутствует в количестве, которое составляет от 0,01 до около 20% мас./об., и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый стабилизатор присутствует в количестве от около 0,5 до около 10% мас./об., притом, что pH стабильной композиции находится в интервале от около 4,0 до около 6,0. В некоторых вариантах упомянутая выше стабильная композиция содержит фармацевтически приемлемый буфер, выбранный из группы, состоящей из глутамата, фосфата, буферизованного фосфатом раствора соли, натрия ацетата, натрия цитрата и буфера Трис. В конкретных вариантах фармацевтически приемлемый буфер присутствует в упомянутой выше стабильной композиции в количестве 10-20 мМ. В конкретном варианте фармацевтически приемлемый буфер представляет собой натрия ацетат в количестве 10-20 мМ. В некоторых вариантах фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество присутствует в количестве от около 0,004 до около 0,01% мас./об. В конкретных вариантах фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество в упомянутой выше стабильной композиции является полисорбатом 80 или полисорбатом 20. В дополнительных вариантах фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20, присутствующий в количестве от около 0,004 до около 0,01% мас./об.

В некоторых вариантах фармацевтически приемлемый стабилизатор в упомянутой выше стабильной композиции выбран из группы, состоящей из полигидроксиуглеводорода, дисахарида, полиола, пролина, аргинина, лизина, метионина, таурина и бензилового спирта. В некоторых вариантах фармацевтически приемлемый стабилизатор представляет собой полигидроксиуглеводород, выбранный из группы, состоящей из сорбита, маннита и глицерина. В конкретном варианте полигидроксиуглеводород в упомянутой выше стабильной композиции представляет собой сорбиталь. В некоторых вариантах фармацевтически приемлемый стабилизатор представляет собой дисахарид, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, мальтозы, лактозы, фруктозы и трегалозы. В некоторых вариантах дисахаридный стабилизатор присутствует в количестве около 9% мас./об. В некоторых вариантах указанный дисахарид является сахарозой. В конкретных вариантах сахароза присутствует в упомянутой выше стабильной композиции в количестве около 9% мас./об. В некоторых вариантах стабилизатор является аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из пролина, аргинина, лизина, метионина и таурина. В конкретном варианте стабилизатор является пролином. В дополнительном варианте пролин присутствует в упомянутой выше стабильной композиции в количестве от около 2 до 3% мас./об. В некоторых вариантах pH упомянутой выше стабильной композиции находится в интервале от около 5,0 до около 5,5.

В некоторых вариантах упомянутая выше стабильная композиция содержит моноклональное антитело, содержащее вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 49; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 12, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 67; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 461, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 459; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 463, или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 485, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 483.

В некоторых вариантах упомянутая выше стабильная композиция содержит моноклональное антитело, содержащее вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот

SEQ ID NO: 49; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 12, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 67; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 461, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 459; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислоту SEQ ID NO: 463, или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 485, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 483.

В некоторых вариантах упомянутая выше стабильная композиция содержит моноклональное антитело 21B12, 31H4, 8A3, 11F1 или 8A1.

В некоторых вариантах вязкость упомянутой выше стабильной композиции составляет 30 сПа или менее при 25°C. В конкретных вариантах упомянутой выше стабильной композиции моноклональное антитело присутствует в количестве от около 70 мг/мл до около 150 мг/мл, и вязкость стабильной композиции составляет 12 сПа или менее при 25°C. В некоторых вариантах осмоляльность упомянутой выше стабильной композиции составляет от около 250 мОсм/кг до около 350 мОсм/кг. В некоторых вариантах упомянутая выше стабильная композиция остается стабильной по меньшей мере 3, 6, 12 или 24 месяца.

В конкретных вариантах упомянутая выше стабильная композиция содержит моноклональное антитело, содержащее вариабельный участок, который является по меньшей мере на 90% идентичным соответствующему участку SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, который является по меньшей мере на 90% идентичным соответствующему участку SEQ ID NO: 463. В некоторых вариантах упомянутая выше стабильная композиция содержит моноклональное антитело, содержащее вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 463, и, при этом, количество моноклонального антитела составляет около 150.

В некоторых вариантах упомянутая выше стабильная композиция содержит антитело, содержащее вариабельный участок легкой цепи, который является по меньшей мере на 90% идентичным соответствующему участку SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, который является по меньшей мере на 90% идентичным соответствующему участку SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах упомянутая выше стабильная композиция содержит моноклональное антитело, содержащее вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49, и, при этом, количество моноклонального антитела составляет 120 мг/мл или 140 мг/мл.

В некоторых вариантах упомянутая выше стабильная композиция содержит (a) моноклональное антитело в количестве от около 70 мг/мл до около 200 мг/мл, причем указанное моноклональное антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 12, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 67; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 461, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 459; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 463; или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 485, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 483, и около 10 мМ натрия ацетата; около 9,0% мас./об. сахарозы; от около 0,004 до около 0,01% мас./об. полисорбата 20 или полисорбата 80, с pH около 5,2.

В данном аспекте моноклональное антитело может представлять собой 21B12, 8A3, 11F1. В конкретных вариантах данного аспекта моноклональное антитело представляет собой 21B12 и присутствует в упомянутой выше стабильной композиции в количестве около 140 мг/мл. В дополнительных вариантах данного аспекта стабильная композиция по пунктам формулы содержит около 0,004% полисорбата 20. В дополнительных конкретных вариантах данного аспекта упомянутая выше стабильная композиция содержит моноклональное антитело, которое представляет собой 8A3 и присутствует в количестве около 150 мг/мл.

В дополнительных вариантах данного аспекта, упомянутая выше стабильная композиция содержит моноклональное антитело, которое представляет собой 11F1 и присутствует в количестве около 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 мг/мл. В конкретных вариантах стабильная композиция, содержащая 11F1, также содержит около 0,01% полисорбата 80.

В дополнительном варианте стабильная композиция содержит: (a) моноклональное антитело в количестве от около 70 мг/мл до около 200 мг/мл, причем указанное моноклональное антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 12, и ва-

риабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 67; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 461, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 459; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 463, или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 485, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 483, и около 10 мМ натрия ацетата; от около 2,0 до 3,0% мас./об. пролина; около 0,01% мас./об. полисорбата 20 или полисорбата 80, с pH около 5,0. В некоторых вариантах данного аспекта стабильная композиция содержит моноклональное антитело, которое представляет собой 21B12, 8A3 или 11F1.

В другом аспекте изобретения стабильная композиция содержит моноклональное анти-PCSK9 антитело в количестве от около 70 мг/мл до около 200 мг/мл, причем указанное моноклональное антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 577, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 576; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 577, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 576; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 588, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 589, или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 588, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 589; и (б) около 10 мМ натрия ацетата; (в) около 9,0% мас./об. сахарозы; (г) от около 0,004 до около 0,01% мас./об. полисорбата 20 или полисорбата 80, и (д) с pH около 5,2.

В другом аспекте изобретения стабильная композиция содержит моноклональное анти-PCSK9 антитело в количестве от около 70 мг/мл до около 200 мг/мл, причем указанное моноклональное антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 577, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 576; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 577, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 576; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 588, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 589, или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 588, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 589; и (б) около 10 мМ натрия ацетата; (в) от около 2,0 до 3,0% мас./об. пролина; (г) около 0,01% мас./об. полисорбата 20 или полисорбата 80, и (д) с pH около 5,0.

В некоторых аспектах предложенное изобретение включает способ снижения холестерина ЛПНП сыворотки у пациента, включающий введение по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела больному, нуждающемуся в этом, в дозе от около 10 мг до около 3000 мг, таким образом, снижая уровень холестерина ЛПНП сыворотки по меньшей мере на около 15%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке указанного больного до введения дозы. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения уровень холестерина ЛПНП в сыворотке указанного больного снижается по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85% или по меньшей мере на около 90%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке больного до введения дозы.

В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе от около 35 до около 3000 мг, от около 35 до около 2800 мг, от около 35 до около 2500 мг, от около 35 до около 2000 мг, от около 35 до около 1800 мг, от около 35 до около 1400 мг, от около 25 до около 1200 мг, от около 35 до около 1000 мг, от около 35 до около 700 мг, от около 45 до около 700 мг, от около 45 до около 600 мг, от около 45 до около 450 мг, от около 70 до около 450 мг, от около 105 до около 420 мг, от около 120 до около 200 мг, от около 140 до около 200 мг, от около 140 до около 180 мг, или от около 140 до около 170 мг, от около 420 до около 3000 мг, от около 700 до около 3000 мг, от около 1000 до около 3000 мг, от около 1200 до около 3000 мг, от около 1400 до около 3000 мг, от около 1800 до около 3000 мг, от около 2000 до около 3000 мг, от около 2400 до около 3000 мг или от около 2800 до около 3000 мг. В некоторых вариантах данного аспекта анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе около 35 мг, около 45 мг, около 70 мг, около 105 мг, около 120 мг около 140 мг, около 150 мг, около 160 мг, около 170 мг, около 180 мг, около 190 мг, около 200 мг, около 210 мг, около 280 мг, около 360 мг, около 420 мг, около

450 мг, около 600 мг, около 700 мг, около 1200 мг, около 1400 мг, около 1800 мг, около 2000 мг, около 2500 мг, около 2800 мг или около 3000 мг.

В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят больному по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) 1 раз в неделю, (2) 1 раз в 2 недели, (3) 1 раз в месяц, (4) 1 раз в 2 месяца, (5) 1 раз в 3 месяца, (6) 1 раз в 6 месяцев и (7) 1 раз в 12 месяцев. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят парентерально. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят внутривенно. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят подкожно.

В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 49; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 12, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 67; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 461, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 459; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 463; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 485: и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 483; или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 582, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 583. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 12, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 67; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 461, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 459; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 463; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 485, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 483; или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 582, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 583. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело выбрано из группы, состоящей из 21B12, 31H4, 8A3, 11F1 и 8A1.

В некоторых аспектах изобретение включает способ лечения или предупреждения связанного с холестерином расстройства у больного с уровнем холестерина ЛПНП сыворотки, который включает введение по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела больному, нуждающемуся в этом, в дозе от около 10 мг до около 3000 мг, таким образом, осуществляя лечение или предупреждение связанного с холестерином расстройства у больного. В аспекте данного варианта связанное с холестерином расстройство, которое подлежит лечению или предупреждению, представляет собой семейную гиперхолестеринемию, в том числе, гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию и гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, несемейную гиперхолестеринемию, повышенный уровень липопротеина (а), заболевание сердца, метаболический синдром, диабет, заболевание коронарных сосудов сердца, инсульт, сердечно-сосудистое заболевание, болезнь Альцгеймера, заболевание периферический артерий, гиперлипидемию или дислипидемию. В некоторых вариантах данного аспекта уровень холестерина ЛПНП в сыворотке указанного больного снижается по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85% или по меньшей мере на около 90%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке указанного больного до введения дозы.

В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе от около 35 до около 3000 мг, от около 35 до около 2800 мг, от около 35 до около 2500 мг, от около 35 до около 2000 мг, от около 35 до около 1800 мг, от около 35 до около 1400 мг, от около 25 до около 1200 мг, от около 35 до около 1000 мг, от около 35 до около 700 мг, от около 45 до около 700 мг, от около 45 до около 600 мг, от около 45 до около 450 мг, от около 70 до около 450 мг, от около 105 до около 420 мг, от около 120 до около 200 мг, от около 140 до около 200 мг, от около 140 до около 180 мг, или от около 140 до около 170 мг, от около 420 до около 3000 мг, от около 700 до около 3000 мг, от около 1000 до около 3000 мг, от около 1200 до около 3000 мг, от около 1400 до около 3000 мг, от около 1800 до около 3000 мг, от около 2000 до около 3000 мг, от около 2400 до около 3000 мг или от около 2800 до около 3000 мг. В некоторых вариантах данного аспекта, анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе около 35 мг, около 45 мг, около 70 мг, около 105 мг, около 120 мг, около 140 мг, около 150 мг, около 160 мг, около 170 мг, около 180 мг, около 190 мг, около 200 мг, около 210 мг, около 280 мг, около 360 мг, около 420 мг, около 450 мг, около 600 мг, около 700 мг, около 1200 мг, около 1400 мг, около 1800 мг, около 2000 мг, около 2500 мг, около 2800 мг или около 3000 мг.

В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят больному по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) 1 раз в неделю, (2) 1 раз в 2 недели, (3) 1 раз в месяц, (4) 1 раз в 2 месяца, (5) 1 раз в 3 месяца, (6) 1 раз в 6 месяцев и (7) 1 раз в 12 месяцев. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят парентерально. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят внутривенно. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят подкожно.

В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 49; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 12, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 67; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 461, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 459; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 463; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 485, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 483; или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 582, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 583. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 12, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 67; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 461, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 459; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 463; вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 485, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 483; или вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 582, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 583. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело выбрано из группы, состоящей из 21B12, 31H4, 8A3, 11F1 и 8A1.

В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят больному по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) 1 раз в неделю, (2) 1 раз в 2 недели, (3) 1 раз в месяц, (4) 1 раз в 2 месяца, (5) 1 раз в 3 месяца, (6) 1 раз в 6 месяцев и (7) 1 раз в 12 месяцев. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения анти-PCSK9 антитело вводят парентерально. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения, анти-PCSK9 антитело вводят внутривенно. В некоторых вариантах данного аспекта изобретения, анти-PCSK9 антитело вводят подкожно.

В конкретных вариантах изобретения анти-PCSK9 антитело представляет собой 21B12 и 31H4. В некоторых вариантах анти-PCSK9 антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах анти-PCSK9 антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах анти-PCSK9 антитело представляет собой 21B12. В конкретном варианте анти-PCSK9 антитело содержит последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 49, или содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49, или антитело представляет собой 21B12, причем анти-PCSK9 антитело вводят больному подкожно в дозе от около 21 мг до около 70 мг 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 3-10 дней; вводят больному подкожно в дозе около 21 мг 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 3-10 дней; вводят подкожно больному в дозе около 35 мг 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 3-10 дней; вводят больному подкожно в дозе около 70 мг 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 3-10 дней; вводят больному подкожно в дозе от около 70 мг до около 280 мг 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному подкожно в дозе около 70 мг 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному в дозе около 105 мг подкожно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному подкожно в дозе около 120 мг 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному подкожно в дозе около 140 мг 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному подкожно в дозе около 210 мг 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному подкожно в дозе около 280 мг 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному подкожно в дозе от около 280 мг до около 420 мг 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 21-31 день; вводят больному подкожно в дозе около 280 мг 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 21-31 день; вводят больному подкожно в дозе около 350 мг 1 раз в 4 недели притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 21-31 день; вводят больному подкожно в дозе около 420 мг 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 21-31 день.

В другом конкретном варианте, в котором анти-PCSK9 антитело содержит последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 49, или содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49, или антитело представляет собой 21B12, анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе от около 420 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в неделю, причем уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 3-10 дней, вводят больному в дозе около 700 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 3-10 дней; вводят больному в дозе около 1200 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 3-10 дней; вводят больному в дозе от более чем около 1200 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 3-10 дней; вводят больному в дозе от около 420 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному в дозе около 700 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному в дозе около 1200 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 21-31 день; вводят больному в дозе от

более чем около 1200 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному в дозе от около 420 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 21-31 день, вводят больному в дозе около 700 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 21-31 день; вводят больному в дозе около 1200 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 21-31 день; вводят больному в дозе от более чем около 1200 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 21-31 день.

В другом конкретном варианте, в котором анти-PCSK9 антитело содержит последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 49, или содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49, или антитело представляет собой 21B12, анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе около 21 мг подкожно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе около 35 мг подкожно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе около 70 мг подкожно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе около 70 мг подкожно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 105 мг подкожно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 120 мг подкожно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 140 мг подкожно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 210 мг подкожно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 280 мг подкожно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе от около 280 мг до около 420 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе около 280 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе около 350 мг подкожно 1 раз в 4 недели притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе около 420 мг подкожно каждые 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 24-28 дней.

В другом конкретном варианте, в котором анти-PCSK9 антитело содержит последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 49, или содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49, или антитело представляет собой 21B12, анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе от около 420 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе около 700 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе около 1200 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе от более чем около 1200 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе от около 420 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 700 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 1200 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе от более чем около 1200 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе от около 420 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень

холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 24-28 дней, вводят больному в дозе около 700 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе около 1200 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе более чем от около 1200 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 24-28 дней.

В конкретных вариантах изобретения, анти-PCSK9 антитело представляет собой 8A3, 11F1 и 8A1. В некоторых вариантах анти-PCSK9 антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 463. В некоторых вариантах анти-PCSK9 антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 463. В некоторых вариантах анти-PCSK9 антитело представляет собой 11F1. В конкретном варианте анти-PCSK9 антитело содержит последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 463, или содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 463, или антитело представляет собой 11F1, анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе около 45 мг подкожно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 3-10 дней, вводят больному в дозе около 150 мг подкожно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 7-14 дней; вводят больному в дозе около 150 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 21-31 день; вводят больному в дозе от более чем около 150 мг до около 200 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 21-31 день; вводят больному в дозе от около 170 мг до около 180 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 21-31 день; вводят больному в дозе от около 150 мг до около 170 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 21-31 день; вводят больному в дозе около 450 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 21-31 день; вводят больному в дозе около 150 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 31-42 дня; вводят больному в дозе от более чем около 150 мг до около 200 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 31-42 дня; вводят больному в дозе от около 170 мг до около 180 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 31-42 дня; вводят больному в дозе от около 150 мг до около 170 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 31-42 дня; вводят больному в дозе около 450 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 31-42 дня; вводят больному в дозе от около 140 мг до около 200 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 45-56 дней; вводят больному в дозе от около 170 мг до около 180 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 45-56 дней; вводят больному в дозе от около 150 мг до около 170 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 45-56 дней; вводят больному в дозе около 450 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 15-50% на около 45-56 дней; в дозе около 600 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 45-56 дней; в дозе около 700 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 45-56 дней; в дозе около 600 мг подкожно 1 раз в 12 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 74-84 дня; в дозе около 700 мг подкожно 1 раз в 12 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 74-84 дня; в дозе около 600 мг подкожно 1 раз в 16 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 100-112 дней; в дозе около 700 мг подкожно 1 раз в 16 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного

снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 100-112 дней.

В конкретных вариантах изобретения, в которых анти-PCSK9 антитело содержит последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 463, или содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 463, или антитело представляет собой 11F1, анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе около 45 мг подкожно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 7-10 дней, вводят больному в дозе около 150 мг подкожно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 150 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе от более чем около 150 мг до около 200 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе от около 170 мг до около 180 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе от около 150 мг до около 170 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе около 450 мг подкожно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе около 150 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 40-41 день; вводят больному в дозе от более чем около 150 мг до около 200 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 40-41 день; вводят больному в дозе от около 170 мг до около 180 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 40-41 день; вводят больному в дозе от около 150 мг до около 170 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 40-41 день; вводят больному в дозе около 450 мг подкожно 1 раз в 6 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 40-41 день; вводят больному в дозе от около 140 мг до около 200 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 50-56 дней; вводят больному в дозе от около 170 мг до около 180 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 50-56 дней; вводят больному в дозе от около 150 мг до около 170 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 50-56 дней; вводят больному в дозе около 450 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 50-56 дней; в дозе около 600 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 50-56 дней; в дозе около 700 мг подкожно 1 раз в 8 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 50-56 дней; в дозе около 600 мг подкожно 1 раз в 12 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 80-84 дня; в дозе около 700 мг подкожно 1 раз в 12 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 80-84 дня; в дозе около 600 мг подкожно 1 раз в 16 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 105-112 дней; в дозе около 700 мг подкожно 1 раз в 16 недель, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 105-112 дней. В конкретных вариантах изобретения, в которых анти-PCSK9 антитело содержит последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 463, или содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 465, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 463, или антитело представляет собой 11F1, анти-PCSK9 антитело вводят больному анти-PCSK9 антитело вводят больному в дозе от около 420 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе около 700 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе около 1200 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе от более чем около 1200 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в неделю, притом, что уровень холесте-

рина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 7-10 дней; вводят больному в дозе от около 420 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 700 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе около 1200 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе от более чем около 1200 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 2 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 10-14 дней; вводят больному в дозе от около 420 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 24-28 дней, вводят больному в дозе около 700 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе около 1200 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 24-28 дней; вводят больному в дозе от более чем около 1200 мг до около 3000 мг внутривенно 1 раз в 4 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается на 30-50% на около 24-28 дней; вводят в дозе около 1000-3000 мг внутривенно 1 раз в 24 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% в течение около 150-168 дней; вводят в дозе около 1000-3000 мг внутривенно 1 раз в 24 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 160-168 дней; вводят в дозе около 1000-3000 мг внутривенно 1 раз в 52 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 15-50% на около 350-365 дней; вводят в дозе около 1000-3000 мг внутривенно 1 раз в 52 недели, притом, что уровень холестерина ЛПНП в сыворотке больного снижается по меньшей мере на около 30-50% на около 360-365 дней.

В другом аспекте изобретения по меньшей мере одно анти-PCSK9 антитело вводят больному перед, после или одновременно по меньшей мере с еще одним снижающим уровень холестерина средством. Снижающие уровень холестерина средства включают статины, в том числе, аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин, симвастатин, никотиновую кислоту (ниацин), ниацин замедленного высвобождения (СЛО-НИАЦИН), лорапипрант (КОРДАПТИВ), фибриновую кислоту (ЛОПИД (гемфиброзил), ТРИКОР (фенофибрат)), секвестранты желчных кислот, такие как холестирамин (КВЕСТРАН), колезвелам (ВЕЛХОЛ), Колестид (Колестипол)), ингибитор абсорбции холестерина (ЗЕТИА (эзетимиб)), средства для модификации липидов, агонисты активируемого пролифератором пероксисом рецептора (ППАР) гамма, агонисты ППАР альфа/гамма, ингибиторы скваленсинтетазы, ингибиторы транспортного белка холестериновых эфиров (ТБХЭ), антигипертензивные средства, противодиабетические средства, в том числе, сульфонилмочевины, инсулин, аналоги GLP-1, ингибиторы дипептидилдипептидазы 4 (ДДП4), модуляторы АроВ, ингибиторы микросомального белка-переносчика триглицеридов (МБТ) и/или средства для лечения облитерирующего артериосклероза, онкостатин М, эстроген, бербин и терапевтические средства для лечения связанного с иммунной системой расстройства.

В некоторых аспектах изобретение включает способ снижения уровня холестерина ЛПНП в сыворотке больного. Способ включает введение больному, нуждающемуся в этом, дозы от около 10 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, описанного в данном описании. В некоторых вариантах доза составляет от около 10 до около 70 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в неделю (КН). В некоторых вариантах доза составляет от около 14 до около 45 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в неделю. В некоторых вариантах доза составляет от около 14 до около 35 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в неделю. В некоторых вариантах доза составляет от около 70 до около 420 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 70 до около 350 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 105 до около 350 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 140 до около 280 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 250 до около 480 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 280 до около 420 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 350 до около 420 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 420 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которым вводят 1 раз в неделю (КН). В некоторых вариантах доза составляет от около 1000 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в неделю (КН). В некоторых вариантах доза составляет от около 2000 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в неделю (КН). В некоторых вариантах доза составляет от около 420 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариан-

тах доза составляет от около 1000 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 2000 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 420 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в месяц (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 1000 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в месяц (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 2000 до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в месяц (К4Н). В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 15%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы. В некоторых вариантах уровень холестерина Л11Н11 в сыворотке снижается по меньшей мере на около 20%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 85%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 90%.

В некоторых аспектах изобретение включает способ снижения уровня холестерина ЛПНП в сыворотке больного, причем способ включает введение больному, нуждающемуся в этом, дозы по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, притом, что дозу анти-PCSK9 антитела вводят по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) по меньшей мере около 14 мг 1 раз в неделю (КН); (2) по меньшей мере около 35 мг 1 раз в неделю (КН); (3) по меньшей мере около 45 мг 1 раз в неделю (КН); (4) по меньшей мере около 70 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (5) по меньшей мере около 105 мг каждые 2 недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (6) по меньшей мере около 140 мг каждые 2 недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (7) по меньшей мере около 150 мг каждые 2 недели или 1 раз в 2 недели (К2Н) (8) по меньшей мере около 280 мг каждые 2 недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); и (9) по меньшей мере около 150 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (10) по меньшей мере около 160 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (11) по меньшей мере около 170 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (12) по меньшей мере около 180 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (13) по меньшей мере около 190 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (14) по меньшей мере около 200 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (15) по меньшей мере около 280 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (16) по меньшей мере около 350 1 раз в 4 недели (К4Н); (17) по меньшей мере около 420 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (18) по меньшей мере около 1000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (19) по меньшей мере около 2000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); и (20) по меньшей мере около 3000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 15%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 20%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 85%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 90%.

В некоторых аспектах изобретение включает способ снижения значений PCSK9 у больного, причем способ включает введение больному, нуждающемуся в этом, дозы по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, притом, что дозу анти-PCSK9 антитела вводят по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) по меньшей мере около 14 мг 1 раз в неделю (КН); (2) по меньшей мере около 35 мг 1 раз в неделю

(КН); (3) по меньшей мере около 45 мг 1 раз в неделю (КН); (4) по меньшей мере около 70 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (5) по меньшей мере около 105 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (6) по меньшей мере около 140 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (7) по меньшей мере около 150 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (8) по меньшей мере около 280 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (9) по меньшей мере около 150 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (10) по меньшей мере около 160 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (11) по меньшей мере около 170 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (12) по меньшей мере около 180 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (13) по меньшей мере около 190 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (14) по меньшей мере около 200 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (15) по меньшей мере около 280 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (16) по меньшей мере около 350 1 раз в 4 недели (К4Н); (17) по меньшей мере около 420 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (18) по меньшей мере около 1000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (19) по меньшей мере около 2000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); и (20) по меньшей мере около 3000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах значение PCSK9 сыворотки снижается по меньшей мере на около 60%, по сравнению со значением PCSK9 сыворотки до введения дозы. В некоторых вариантах значение PCSK9 сыворотки снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах значение PCSK9 сыворотки снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах значение PCSK9 сыворотки снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах значение PCSK9 сыворотки снижается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах значение PCSK9 сыворотки снижается по меньшей мере на около 85%. В некоторых вариантах значение PCSK9 сыворотки снижается по меньшей мере на около 90%.

В некоторых аспектах изобретение включает способ снижения уровня общего холестерина у больного, причем способ включает введение больному, нуждающемуся в этом, дозы по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, притом, что дозу анти-PCSK9 антитела вводят по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) по меньшей мере около 14 мг 1 раз в неделю (КН); (2) по меньшей мере около 35 мг 1 раз в неделю (КН); (3) по меньшей мере около 45 мг 1 раз в неделю (КН); (4) по меньшей мере около 70 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (5) по меньшей мере около 105 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (6) по меньшей мере около 140 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (7) по меньшей мере около 150 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (8) по меньшей мере около 280 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (9) по меньшей мере около 150 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (10) по меньшей мере около 160 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (11) по меньшей мере около 170 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (12) по меньшей мере около 180 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (13) по меньшей мере около 190 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (14) по меньшей мере около 200 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (15) по меньшей мере около 280 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (16) по меньшей мере около 350 1 раз в 4 недели (К4Н); (17) по меньшей мере около 420 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (18) по меньшей мере около 1000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (19) по меньшей мере около 2000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); и (20) по меньшей мере около 3000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах уровень общего холестерина снижается по меньшей мере на около 20%, по сравнению с уровнем общего холестерина до введения дозы. В некоторых вариантах уровень общего холестерина снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах уровень общего холестерина снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень общего холестерина снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень общего холестерина снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень общего холестерина снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень общего холестерина снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень общего холестерина снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень общего холестерина снижается по меньшей мере на около 60%.

В некоторых аспектах изобретение включает способ снижения уровня не-ЛПВП холестерина у больного, причем способ включает введение больному, нуждающемуся в этом, дозы по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, притом, что дозу анти-PCSK9 антитела вводят по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) по меньшей мере около 14 мг 1 раз в неделю (КН); (2) по меньшей мере около 35 мг 1 раз в неделю (КН); (3) по меньшей мере около 45 мг 1 раз в неделю (КН); (4) по меньшей мере около 70 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (5) по меньшей мере около 105 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (6) по меньшей мере около 140 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (7) по меньшей мере около 150 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (8) по меньшей мере около 280 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (9) по меньшей мере около 150 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (10) по меньшей мере около 160 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (11) по меньшей мере около 170 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (12) по меньшей мере около 180 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (13) по меньшей мере около 190 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (14) по меньшей мере около 200 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (15) по меньшей мере около 280 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (16) по меньшей мере около 350 1 раз в 4 недели (К4Н); (17) по меньшей мере около 420 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (18) по меньшей мере около 1000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (19) по меньшей мере около 2000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); и (20) по меньшей мере около 3000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 30%, по сравнению с уровнем не-ЛПВП холестерина до введения дозы. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по

меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 85%.

В некоторых аспектах изобретение включает способ снижения уровней АроВ у больного, причем способ включает введение больному, нуждающемуся в этом, дозы по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, притом, что дозу анти-PCSK9 антитела вводят по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) по меньшей мере около 14 мг 1 раз в неделю (КН); (2) по меньшей мере около 35 мг 1 раз в неделю (КН); (3) по меньшей мере около 45 мг 1 раз в неделю (КН); (4) по меньшей мере около 70 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (5) по меньшей мере около 105 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (6) по меньшей мере около 140 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (7) по меньшей мере около 150 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (8) по меньшей мере около 280 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (9) по меньшей мере около 150 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (10) по меньшей мере около 160 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (11) по меньшей мере около 170 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (12) по меньшей мере около 180 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (13) по меньшей мере около 190 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (14) по меньшей мере около 200 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (15) по меньшей мере около 280 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (16) по меньшей мере около 350 1 раз в 4 недели (К4Н); (17) по меньшей мере около 420 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 20%, по сравнению с уровнем АроВ до введения дозы. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 75%.

В некоторых аспектах изобретение включает способ снижения уровней липопротеина А ("Lp(a)") у больного, причем способ включает введение больному, нуждающемуся в этом, дозы по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, притом, что дозу анти-PCSK9 антитела вводят по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) по меньшей мере около 14 мг 1 раз в неделю (КН); (2) по меньшей мере около 35 мг 1 раз в неделю (КН); (3) по меньшей мере около 45 мг 1 раз в неделю (КН); (4) по меньшей мере около 70 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (5) по меньшей мере около 105 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (6) по меньшей мере около 140 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (7) по меньшей мере около 150 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (8) по меньшей мере около 280 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (9) по меньшей мере около 150 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (10) по меньшей мере около 160 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (11) по меньшей мере около 170 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (12) по меньшей мере около 180 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (13) по меньшей мере около 190 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (14) по меньшей мере около 200 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (15) по меньшей мере около 280 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (16) по меньшей мере около 350 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (17) по меньшей мере около 420 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (18) по меньшей мере около 1000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (19) по меньшей мере около 2000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); и (20) по меньшей мере около 3000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 10%, по сравнению с уровнем Lp(a) до введения дозы. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 15%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 20%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 65%.

В некоторых аспектах изобретение включает способ лечения или предупреждения связанного с холестерином расстройства у больного, причем способ включает введение больному, нуждающемуся в этом, дозы от около 10 мг до около 3000 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, описанного в данном описании. В некоторых вариантах доза составляет от около 10 мг до около 70 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в неделю (КН). В некоторых вариантах доза составляет от около 14 мг до около 45 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в неделю. В некоторых вариантах доза составляет от около 14 мг до около 35 мг по меньшей мере

одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в неделю. В некоторых вариантах доза составляет от около 70 мг до около 420 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 70 мг до около 350 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 105 мг до около 350 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 140 мг до около 280 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 150 мг до около 280 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 150 мг до около 200 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 2 недели (К2Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 150 мг до около 480 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 150 мг до около 200 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 200 мг до около 480 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 250 мг до около 480 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 280 мг до около 420 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет от около 350 мг до около 420 мг по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, которое вводят 1 раз в 4 недели. В некоторых вариантах доза составляет около 1000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет около 2000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах доза составляет около 3000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 15%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 20%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 25%. недели (К4Н). В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 85%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 90%. В некоторых вариантах связанное с холестерином расстройство представляет собой гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию, гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, несемейную гиперхолестеринемию, гиперлипидемию или дислипидемию.

В некоторых аспектах изобретение включает способ лечения или предупреждения связанного с холестерином расстройства у больного, причем способ включает введение больному, нуждающемуся в этом, дозы по меньшей мере одного анти-PCSK9 антитела, притом, что дозу анти-PCSK9 антитела вводят по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) по меньшей мере около 14 мг 1 раз в неделю (КН); (2) по меньшей мере около 35 мг 1 раз в неделю (КН); (3) по меньшей мере около 45 мг 1 раз в неделю (КН); (4) по меньшей мере около 70 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (5) по меньшей мере около 105 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (6) по меньшей мере около 140 мг 1 раз в 2 недели (К2Н); (7) по меньшей мере около 150 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (8) по меньшей мере около 280 мг каждые две недели или 1 раз в 2 недели (К2Н); (9) по меньшей мере около 150 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (10) по меньшей мере около 160 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (11) по меньшей мере около 170 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (12) по меньшей мере около 180 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (13) по меньшей мере около 190 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (14) по меньшей мере около 200 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (15) по меньшей мере около 280 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (16) по меньшей мере около 350 1 раз в 4 недели (К4Н); (17) по меньшей мере около 420 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (18) по меньшей мере около 1000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); (19) по меньшей мере около 2000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н); и (20) по меньшей мере около 3000 мг 1 раз в 4 недели (К4Н). В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 15%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 20%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на

около 30%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 85%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 90%.

В некоторых вариантах, анти-PCSK9 антитело представляет собой 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 и/или 8A1.

В некоторых вариантах связанное с холестерином расстройство представляет собой гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию, гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, несемейную гиперхолестеринемию, гиперлипидемию или дислипидемию.

В некоторых аспектах изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно анти-PCSK9 антитело, выбранное из группы, состоящей из 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 и 8A1.

Определения и варианты

Следует понимать, что как вышеизложенное общее описание, так и следующее детальное описание являются только примерными и объясняющими, но не ограничивают заявленного изобретения. В данной заявке, использование единственного числа включает множественное число, если только конкретно не указано иное. В данной заявке, использование "или" означает "и/или", если конкретно не указано иное. Кроме того, использование термина "включающий (содержащий)", а также других форм, таких как "включает" и "включенный", не является ограничивающим. Дополнительно, такие термины, как "элемент" или "компонент" включают как элементы, так и компоненты, содержащие одну единицу, и элементы и компоненты, которые содержат более чем одну субъединицу, если только конкретно не указано иное. Дополнительно, использование термина "часть" может включать часть фрагмента или целый фрагмент.

Заголовки разделов, используемые в данном описании, приведены только для организационных целей, и не должны быть интерпретированы как ограничение описанного объекта. Все документы, или части документов, цитируемые в данной заявке, в том числе, но, не ограничиваясь ими, патенты, патентные заявки, статьи, книги и трактаты, таким образом, явно включены путем ссылки в полном объеме для любой цели. В соответствии с настоящим описанием, следующие термины, если только не указано иное, должны пониматься как имеющие следующие значения:

Термин "пропротеин конвертаза субтилизин кексин типа 9" или "PCSK9" обозначает полипептид, определенный в SEQ ID NO: 1 и/или 3 или его фрагменты, а также родственные полипептиды, которые включают, не ограничиваясь ими, аллельные варианты, варианты соединения, производные варианты, варианты замены, варианты делеции и/или варианты вставки, включая добавление N-концевого метионина, слитые полипептиды и межвидовые гомологи. В некоторых вариантах, полипептид PCSK9 содержит концевые остатки, например, не ограничиваясь ими, остатки лидерной последовательности, нацеливающие остатки, амино-концевые остатки метионина, остатки лизина, остатки метки и/или остатки слитого белка. "PCSK9" также обозначается как FH3, NARC1, HCHOLA3, пропротеин конвертаза субтилизин/кексин типа 9 и регулируемая апоптозом нервных клеток конвертаза 1. Ген PCSK9 кодирует белок пропротеин конвертазу, который принадлежит подсемейству протеиназы К семейства секреторной субтилазы. Термин "PCSK9" обозначает как пропротеин, так и продукт, генерируемый после аутокатализа пропротеина. При ссылке только на аутокатализируемый продукт (например, для антигенсвязывающего белка, который избирательно связывается с расщепленным PCSK9), белок может обозначаться как "зрелый", "расщепленный", "обработанный" или "активный" PCSK9. При ссылке только на неактивную форму, белок может обозначаться как "неактивный", "про-форма" или "необработанная" форма PCSK9. Термин PCSK9 в данном описании также включает природные аллели, например, мутации D374Y, S127R и F216L. Термин PCSK9 также включает молекулы PCSK9, содержащие посттрансляционные модификации последовательности аминокислот PCSK9, например, последовательности PCSK9, которые были гликозилированы, пегилированы, последовательности PCSK9, от которых отщеплена сигнальная последовательность, последовательность PCSK9, в которой pro-домен отщеплен от каталитического домена, но не отделен от каталитического домена (например, фиг. 1A и 1B).

Термин "активность PCSK9" включает любой биологический эффект PCSK9. В некоторых вариантах, активность PCSK9 включает способность PCSK9 взаимодействовать или связываться с субстратом или рецептором. В некоторых вариантах активность PCSK9 представлена способностью PCSK9 связы-

ваться с рецептором ЛПНП (ЛПНПР). В некоторых вариантах PCSK9 связывается с и катализирует реакцию с участием ЛПНПР. В некоторых вариантах активность PCSK9 включает способность PCSK9 изменять (например, уменьшать) доступность ЛПНПР. В некоторых вариантах активность PCSK9 включает способность PCSK9 повышать уровень ЛПНП у субъекта. В некоторых вариантах активность PCSK9 включает способность PCSK9 уменьшать количество ЛПНПР, доступное для связывания с ЛПНП. В некоторых вариантах "активность PCSK9" включает любую биологическую активность, которая является результатом проведения сигнала PCSK9. Пример активности включает, не ограничиваясь ими, связывание PCSK9 с ЛПНПР, ферментную активность PCSK9, который расщепляет ЛПНПР или другие белки, связывание PCSK9 с белками, кроме ЛПНПР, которое облегчает действие PCSK9, изменение секреции APOB под действием PCSK9 (Sun X-M et al., "Evidence for effect of mutant PCSK9 on apoliprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia, Human Molecular Genetics 14: 1161-1169, 2005 и Ouguerram K et al., "Apolipoproteim B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9, Arterioscler thromb Vasc Biol. 24: 1448-1453, 2004), роль PCSK9 в регенерации печени и дифференциации нейронов (Seidah NG et al., "The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation" PNAS 100: 928-933, 2003), и роль PCSK9 в печеночном метаболизме глюкозы (Costet et al., "Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c" J. Biol. Chem. 281(10):6211-18, 2006).

Термин "гиперхолестеринемия" в данном описании обозначает состояние, при котором уровни холестерина выше желательного уровня. В некоторых вариантах это означает, что уровни холестерина сыворотки повышены. В некоторых вариантах желательный уровень учитывает различные "факторы риска", которые известны специалисту в данной области (и описаны или на них есть ссылки в данном описании).

Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" включает как одноцепочечные, так и двухцепочечные нуклеотидные полимеры. Нуклеотиды, из которых состоит полинуклеотид, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды или модифицированную форму любого вида нуклеотидов. Указанные модификации включают модификации оснований, например, производные бромуридина и инозина, модификации рибозы, например, 2',3'-дидезоксирибозу, и модификации межнуклеотидной связи, например, фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфораниладат и фосфороамидат.

Термин "олигонуклеотид" обозначает полинуклеотид, содержащий 200 или менее нуклеотидов. В некоторых вариантах длина олигонуклеотидов составляет 10-60 оснований. В других вариантах длина олигонуклеотидов составляет 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, например, для применения в конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды могут быть смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами. Олигонуклеотид может содержать метку, в том числе, радиометку, флуоресцентную метку, гаптен или антигенную метку, для анализов с целью обнаружения. Олигонуклеотиды могут применяться, например, как праймеры ПЦР, праймеры клонирования или зонды гибридизации.

"Молекула выделенной нуклеиновой кислоты" обозначает ДНК или РНК, мРНК, кДНК геномного или синтетического происхождения, или некоторую их комбинацию, которая не связана с полноразмерным или частью полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид найден в природе, или связана с полинуклеотидом, с которым она не связана в природе. Для целей данного описания, следует понимать, что "молекула нуклеиновой кислоты, содержащая" конкретную последовательность нуклеотидов, не включает интактных хромосом. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, "содержащие" указанные последовательности нуклеиновой кислоты, могут содержать, в дополнение к указанным последовательностям, кодирующие последовательности до 10 или даже до 20 других белков или их частей, или может содержать функционально связанные регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию кодирующего участка заявленных последовательностей нуклеиновой кислоты, и/или может содержать векторные последовательности.

Если не указано иное, левый конец любой одноцепочечной последовательности полинуклеотида, обсуждаемой в данном описании, является 5' концом; направление влево для двухцепочечных последовательностей полинуклеотида обозначается как 5' направление. Направление добавления возникающих транскриптов РНК 5'-3' обозначается как направление транскрипции; участки последовательности на цепи ДНК с такой же последовательностью, что и транскрипт РНК, которые расположены в направлении 5' по отношению к 5' концу транскрипта РНК, обозначаются как "расположенные против хода транскрипции"; участки последовательности на цепи ДНК с такой же последовательностью, что и транскрипт РНК, которые расположены в направлении 3' по отношению к 3' концу транскрипта РНК, обозначаются как "расположенные по ходу транскрипции".

Термин "контрольная последовательность" обозначает последовательность полинуклеотида, которая может влиять на экспрессию и обработку кодирующих последовательностей, с которыми она лигирована. Природа таких контрольных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах, контрольные последовательности для прокариот могут содержать промотор, сайт

связывания с рибосомой и последовательность окончания транскрипции. Например, контрольные последовательности для эукариот могут содержать промоторы, содержащие один или несколько сайтов распознавания для факторов транскрипции, последовательности энхансера транскрипции и последовательность окончания транскрипции. "Контрольные последовательности" могут содержать лидерные последовательности и/или последовательности партнера для слияния.

Термин "вектор" обозначает любую молекулу или объект (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), используемую для переноса кодирующей белок информацию в клетку-хозяина.

Термин "вектор экспрессии" или "экспрессионный конструкт" обозначает вектор, который пригоден для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые направляют и/или контролируют (в соединении с клеткой-хозяином) экспрессию одного или более гетерологичных участков кодирования, функционально связанных с ними. Экспрессионный конструкт может содержать, не ограничиваясь ими, последовательности, которые влияют на или контролируют транскрипцию, трансляцию, и, если присутствуют интроны, влияют на соединение РНК кодирующего участка, функционально связанного с ними.

В данном описании "функционально связанный" означает, что компоненты, к которым применяется термин, находятся во взаимосвязи, которая позволяет им осуществлять свойственные им функции в подходящих условиях. Например, контрольная последовательность в векторе, который "функционально связан" с кодирующей белок последовательностью, лигирована с ним таким образом, что экспрессия кодирующей белок последовательности достигается в условиях, совместимых с транскрипциональной активностью контрольных последовательностей.

Термин "клетка-хозяин" обозначает клетку, которая трансформирована или способна к трансформации последовательностью нуклеиновой кислоты, и, таким образом, экспрессирует целевой ген. Термин включает потомка родительской клетки, независимо от того, идентичен ли потомок с точки зрения морфологии или генетической косметики оригинальной родительской клетке, до тех пор, пока присутствует целевой ген.

Термин "трансфекция" обозначает захват чужеродной или экзогенной ДНК клеткой, и клетка была "трансфицирована", если экзогенная ДНК была введена внутрь клеточной мембраны. Целый ряд методов трансфекции хорошо известен в данной области и раскрыт в данном описании. См., например, Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, выше; Davis et al., 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu et al., 1981, Gene 13:197. Такие методы могут применяться для введения одного или более экзогенных фрагментов ДНК в подходящие клетки-хозяева.

Термин "трансформация" обозначает изменение генетических характеристик клетки, и клетка трансформирована, если она модифицирована таким образом, чтобы содержать новую ДНК или РНК. Например, клетка трансформирована, если она генетически модифицирована по сравнению с ее природным состоянием путем введения нового генетического материала посредством трансфекции, трансдукции, или другими методами. После трансфекции или трансдукции, трансформирующая ДНК может рекомбинировать с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки, или может поддерживаться временно, как эписомальный элемент без репликации, или может реплицироваться независимо как плазмида. Клетка считается "стабильно трансформированной", если трансформирующая ДНК реплицируется при делении клетки.

Термины "полипептид" или "белок" обозначают макромолекулу, содержащую последовательность аминокислот природного белка, т.е. белка, вырабатываемого природной, не рекомбинантной клеткой; или вырабатываемого генетически сконструированной или рекомбинантной клеткой, и включает молекулы, содержащие последовательность аминокислот природного белка, или молекулы, содержащие делеции, добавления и/или замены одной или более аминокислот природной последовательности. Термин также включает полимеры аминокислот, в которых одна или более аминокислот представляют собой химические аналоги соответствующей природной аминокислоты и полимеры. Термины "полипептид" и "белок" специфично включают антигенсвязывающие белки против PCSK9, антитела, или последовательности, которые содержат делеции, добавления и/или замены одной или более аминокислот в антигенсвязывающем белке. Термин "полипептидный фрагмент" обозначает полипептид, который содержит аминоконцевую делецию, карбокси-концевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным природным белком. Такие фрагменты могут также содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с природным белком. В некоторых вариантах длина фрагментов составляет от около 5 до 500 аминокислот. Например, длина фрагментов может составлять по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Пригодные полипептидные фрагменты включают иммунологически функциональные фрагменты антител, в том числе, домены связывания. В случае связывающегося с PCSK9 антитела, пригодные фрагменты включают, не ограничиваясь ими, участок CDR, вариабельный домен тяжелой и/или легкой цепи, часть цепи антитела или только его вариабельный участок, в том числе два CDR, и т.п.

Термин "выделенный белок" означает, что указанный белок (1) свободен, по меньшей мере, от некоторых других белков, с которыми его обычно находят, (2) в существенной мере свободен от других

белков из того же источника, например, того же вида, (3) экспрессируется клеткой другого вида, (4) отделен по меньшей мере от около 50% полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которыми он связан в природе, (5) функционально связан (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе, или (6) не встречается в природе. Обычно, "выделенный белок" составляет по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 25% или по меньшей мере около 50% данного образца. Такой выделенный белок может кодироваться геномной ДНК, кДНК, мРНК или другой РНК, синтетического происхождения или любой их комбинацией. Предпочтительно, выделенный белок в существенной мере свободен от белков или полипептидов или других загрязняющих веществ, которые найдены в его природном окружении, и которые препятствовали бы его терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или другому применению.

Термин "аминокислота" включает его обычное значение в уровне техники.

"Вариант" полипептида (например, антигенсвязывающий белок или антитело) содержит последовательность аминокислот, в которую один или более остатков аминокислот вставлены, удалены и/или заменены в последовательности аминокислот относительно другой последовательности полипептида. Варианты включают слитые белки.

Термин "идентичность" обозначает взаимоотношение между последовательностями двух или более молекул полипептида или двух или более молекул нуклеиновых кислот, определенное путем выравнивания и сравнения последовательностей. "Процент идентичности" обозначает процент идентичных остатков между аминокислотами или нуклеотидами в сравниваемых молекулах и вычисляется на основании размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для таких вычислений, к промежуткам в выравниваниях (если они присутствуют) предпочтительно применяют конкретную математическую модель или компьютерную программу (т.е. "алгоритм"). Методы, которые могут применяться для вычисления идентичности выровненных нуклеиновых кислот или полипептидов, включают описанные в Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; и Carillo et al.., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073.

При вычислении процента идентичности, сравниваемые последовательности обычно выравнивают способом, который дает наибольшее совпадение между последовательностями. Одним из примеров компьютерной программы, которая может применяться для определения процента идентичности, является пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 22:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). Компьютерный алгоритм GAP используется для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых должен быть определен процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для оптимального соответствия соответствующей аминокислоты или нуклеотида ("диапазон соответствия", определяемый по алгоритму). Штраф на внесение делеции в выравнивание (который вычисляют как 3x среднюю диагональ, причем "средняя диагональ" представляет собой среднюю величину диагонали используемой матрицы сравнения; "диагональ" - это количество баллов или число, присвоенное каждому идеальному совпадению аминокислот конкретной матрицей сравнения) и штраф на продолжение делеции (который составляет обычно 1/10 от штрафа на внесение делеции в выравнивание), а также матрица сравнения, например, PAM 250 или BLOSum 62, используются в сочетании с алгоритмом. В некоторых вариантах стандартная матрица сравнения (см. Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 относительно матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 относительно матрицы сравнения BLOSum 62) также используется алгоритмом.

Примеры параметров, которые могут применяться для определения процента идентичности для полипептидов или нуклеотидных последовательностей с применением программы GAP, представляют собой следующие.

Алгоритм: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453.

Матрица сравнения: BLOSum 62 от Henikoff et al., 1992, выше.

Штраф за пропуск в последовательности: 12 (но без штрафа за окончание пропуска).

Штраф за удлинение промежутка: 4.

Порог сходства: 0.

Некоторые схемы выравнивания для выравнивания двух последовательностей аминокислот могут приводить к соответствию только короткого участка двух последовательностей, и данный небольшой выровненный участок может обладать самой высокой степенью идентичности последовательностей, даже если отсутствует значимое соотношение между двумя полноразмерными последовательностями. Соответственно, выбранный метод выравнивания (программа GAP) может быть скорректирован, при желании, чтобы давать выравнивание, где диапазоны составляют по меньшей мере 50 или другое количество смежных аминокислот целевого полипептида.

В данном описании двадцать традиционных (например, природных) аминокислот и их сокращения

используются обычным образом. См. Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), которая включена в данное описание путем ссылки для любой цели. Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати традиционных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как α,α-дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты, также могут быть пригодными компонентами для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры нетрадиционных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат, ε-N,N,N-триметиллизин, ε-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ-N-метиларгинин, и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В номенклатуре полипептида, используемой в данном описании, направление влево представляет собой амино-концевое направление, и направление вправо представляет собой карбокси-концевое направление, в соответствии со стандартным применением и конвенцией.

Подобным образом, если не указано иное, левый конец последовательностей одноцепочечного полинуклеотида является 5' концом; направление влево для последовательностей двухцепочечных полинуклеотидов обозначается как 5' направление. Направление 5'-3' добавления возникающих транскриптов РНК обозначается как направление транскрипции; участки последовательности на цепи ДНК с такой же последовательностью, что и транскрипт РНК, которые расположены в направлении 5' по отношению к 5' концу транскрипта РНК, обозначаются как "расположенные против хода транскрипции;" участки последовательности на цепи ДНК с такой же последовательностью, что и РНК, которые расположены в направлении 3' по отношению к 3' концу транскрипта РНК, обозначаются как "расположенные по ходу транскрипции".

Консервативные замены аминокислот могут включить неприродные остатки аминокислот, которые обычно вводят химическим синтезом пептидов вместо синтеза в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие реверсированные или инвертированные формы аминокислотных фрагментов.

Природные остатки можно подразделить на классы, на основании общих свойств боковой цепи:

1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) кислые: Asp, Glu;

4) основные: His, Lys, Arg;

5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и

6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Например, неконсервативные замены могут включать обмен члена одного из этих классов на члена другого класса. Такие замененные остатки могут быть введены, например, в участки человеческого антитела, которые гомологичны нечеловеческим антителам, или в негомологичные участки молекулы.

При введении модификаций в антигенсвязывающий белок или белок PCSK9, согласно некоторым вариантам, может рассматриваться индекс гидрофобности аминокислот. Каждой аминокислоте присвоен индекс гидрофобности на основании ее характеристик гидрофобности и заряда. Он составляет: 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); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5).

Важное значение индекса гидрофобности аминокислот в обеспечении биологической функции взаимодействия на белке известно из уровня техники. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами с подобным индексом или баллами гидрофобности, и все же сохраняют подобную биологическую активность. При введении изменений на основании индекса гидрофобности, в некоторых вариантах включена замена аминокислот, индексы гидрофобности которых находятся в пределах ±2. В некоторых вариантах включены находящиеся в пределах ±1, и в некоторых вариантах включены находящиеся в пределах ±0,5.

Дополнительно, в уровне техники признано, что замена подобных аминокислот может быть эффективно произведена на основании гидрофильности, особенно, если созданный таким образом биологически функциональный белок или пептид предназначен для применения в иммунологических вариантах, как в данном случае. В некоторых вариантах самая большая локальная средняя величина гидрофильности белка, определяемая по гидрофильности смежных аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, т.е. с биологическим свойством белка.

Следующие значения гидрофильности присвоены данным остаткам аминокислот: аргинин (+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). При введении модификаций на основании сходных значений гидрофильности, в некоторых вариантах включена замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ±2, в некоторых вариантах включены находящиеся в пределах ±1, и в некоторых вариантах включены находящиеся в пре-

делах ±0,5. Дополнительно можно идентифицировать эпитопы из первичных последовательностей аминокислот на основании гидрофильности. Данные участки также обозначаются как "ключевые участки эпитопа".

Примеры замен аминокислот приведены в табл. 1.

Таблица 1

Замены аминокислот

Оригинальные остатки	Примеры замен	Предпочтительные замены
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu	норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-диаминоасляная кислота, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин	Leu

Термин "производное" обозначает молекулу, которая содержит химическую модификацию, кроме вставки, делеции или замены аминокислот (или нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах производные содержат ковалентные модификации, в том числе, не ограничиваясь ими, химическую связь с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими фрагментами. В некоторых вариантах химически модифицированный антигенсвязывающий белок может иметь больший период полувыведения из кровотока, чем антигенсвязывающий белок, который химически не модифицирован. В некоторых вариантах химически модифицированный антигенсвязывающий белок может обладать улучшенной способностью к нацеливанию на желательные клетки, ткани и/или органы. В некоторых вариантах производное антигенсвязывающего белка ковалентно модифицировано таким образом, чтобы содержать один или более присоединенных водорастворимых полимерных фрагментов, в том числе, не ограничиваясь ими, полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль. См., например, патенты США № 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337. В некоторых вариантах производное антигенсвязывающего белка содержит один или более полимеров, в том числе, не ограничиваясь ими, монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, целлюлоза или другие полимеры на основе углеводов, поли-(N-винилпирролидон)-полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт, а также смеси таких полимеров.

В некоторых вариантах производное ковалентно модифицировано субъединицами полиэтиленгликоля (ПЭГ). В некоторых вариантах один или более водорастворимых полимеров присоединены в одном или более конкретных положений, например, на амино-конце производного. В некоторых вариантах один или более растворимых в воде полимеров случайным образом присоединены к одной или более боковых цепей производного. В некоторых вариантах ПЭГ используется для улучшения терапевтической емкости антигенсвязывающего белка. В некоторых вариантах ПЭГ используется для улучшения терапевтической емкости гуманизированного антитела. Некоторые из таких способов обсуждаются, например, в патенте США 6133426, который, таким образом, включен путем ссылки для любой цели.

Аналоги пептидов обычно применяются в фармацевтической промышленности как непептидные лекарственные средства со свойствами, аналогичными пептиду-шаблону. Такие виды непептидных соединений называются "миметиками пептидов" или "пептидомиметиками". Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber & Freidinger, TENS, p. 392 (1985); и Evans et al., J. Med. Chem., 30:1229 (1987), которые включены в данное описание путем ссылки для любой цели. Такие соединения часто разрабатывают

с помощью компьютеризированного молекулярного моделирования. Пептидомиметики, которые структурно сходны с терапевтически пригодными пептидами, могут применяться для получения сходного терапевтического или профилактического эффекта. В общем, пептидомиметики структурно подобны образцовому полипептиду (т.е. полипептидом, который обладает биохимическим свойством или фармакологической активностью), такому как человеческое антитело, но в них одна или более пептидных связей, необязательно заменены связью, выбранной из: --CH_2NH--, --CH_2S--, --CH_2-CH_2--, --CH=CH- (цис и транс), --$COCH_2$--, --$CH(OH)CH_2$-- и --CH_2SO--, способами, хорошо известными из уровня техники. В некоторых вариантах может применяться систематическая замена одной или более аминокислот консенсусной последовательности D-аминокислотой такого же типа (например, D-лизин вместо L-лизина), чтобы генерировать более стойкие пептиды. Кроме того, ограниченные пептиды, содержащие консенсусную последовательность или в существенной мере идентичную вариацию консенсусной последовательности, могут генерироваться способами, известными из уровня техники (Rizo and Gierasch, Ann. Rev. Biochem., 61:387 (1992), включена в данное описание путем ссылки для любой цели); например, путем добавления внутренних остатков цистеина, способных к образованию внутримолекулярных дисульфидных мостиков, которые циклизуют пептид.

Термин "природный", используемый в описании в связи с биологическими материалами, такими как полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева, и т.п., обозначает материалы, которые найдены в природе, или форму материалов, которая найдена в природе.

"Антигенсвязывающий белок (АСБ)" в данном описании обозначает любой белок, который связывается с указанным антигеном-мишенью. В настоящем изобретении указанный антиген-мишень представляет собой белок PCSK9 или его фрагмент. "Антигенсвязывающий белок" включает, не ограничиваясь ими, антитела и их ответственные за связывание части, такие как иммунологически функциональные фрагменты. Пептитела представляют собой другой пример антигенсвязывающих белков. В данном описании термин "иммунологически функциональный фрагмент" (или просто "фрагмент") антитела или цепи иммуноглобулина (тяжелой или легкой цепи) антигенсвязывающего белка обозначает разновидность антигенсвязывающего белка, содержащую часть (независимо от того, каким образом такая часть получена или синтезирована) антитела, в которой отсутствует, по меньшей мере, часть аминокислот, присутствующих в полноразмерной цепи, но которая все же способна специфично связываться с антигеном. Такие фрагменты биологически активны в том смысле, что они связываются с антигеном-мишенью и могут конкурировать с другими антигенсвязывающими белками, в том числе, интактными антителами, за связывание с данным эпитопом. В некоторых вариантах фрагменты представляют собой нейтрализующие фрагменты. В некоторых вариантах фрагменты могут блокировать или снижать вероятность взаимодействия между ЛПНПР и PCSK9. В одном из аспектов такой фрагмент сохраняет по меньшей мере один CDR, присутствующий в полноразмерной легкой или тяжелой цепи, и в некоторых вариантах будет содержать одинарную тяжелую цепь и/или легкую цепь или ее часть. Такие биологически активные фрагменты могут быть получены методами рекомбинации ДНК, или могут быть получены ферментным или химическим расщеплением антигенсвязывающих белков, в том числе, интактных антител. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулина включают, не ограничиваясь ими, Fab, диатело (вариабельный участок тяжелой цепи на том же полипептиде, что и вариабельный участок легкой цепи, соединенные коротким пептидным линкером, слишком коротким, чтобы позволить спаривание между двумя доменами на одной цепи), Fab', $F(ab')_2$, Fv, доменные антитела и одноцепочечные антитела, и может происходить из любого относящегося к млекопитающим источника, в том числе, но, не ограничиваясь ими, человек, мышь, крыса, верблюд или кролик. Кроме того, предусматривается, что функциональная часть антигенсвязывающих белков, раскрытая в данном описании, например, один или более CDR, может быть ковалентно связана со вторым белком или молекулой небольшого размера, для получения терапевтического агента, направленного на конкретную мишень в организме, обладающего бифункциональными терапевтическими свойствами или длительным периодом полувыведения из сыворотки. Как будет понятно специалисту в данной области, антигенсвязывающий белок может содержать небелковые компоненты. В некоторых разделах данного описания, примеры АСБ описаны в терминах "число/буква/число" (например, 25A7). В этих случаях, точное название обозначает конкретное антитело. Т.е. антигенсвязывающий белок под названием 25A7 не обязательно является таким же, как антитело под названием 25A7.1 (если только в описании они явно не обозначены как одинаковые, например, 25A7 и 25A7.3). Как будет понятно специалисту в данной области, в некоторых вариантах ЛПНПР не является антигенсвязывающим белком. В некоторых вариантах ответственные за связывание подразделы ЛПНПР не являются антигенсвязывающими белками, например, EGFa. В некоторых вариантах другие молекулы, которые проводят сигнал PCSK9 in vivo, не являются антигенсвязывающими белками. Такие варианты будут явно идентифицированы соответствующим образом.

Некоторые антигенсвязывающие белки, описанные в данном описании, представляют собой антитела или происходят от антител. В некоторых вариантах полипептидная структура антигенсвязывающих белков базируется на антителах, в том числе, не ограничиваясь ими, моноклональных антителах, антителах с двойной специфичностью, мини-телах, доменных антителах, синтетических антителах (иногда обозначаемых в данном описании как "миметические антитела"), химерных антителах, гуманизированных

антителах, человеческих антителах, слитых антителах (иногда обозначаемых в данном описании как "конъюгаты антител") и их фрагментах соответственно. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит или состоит из авимеров (прочно связанный пептид). Такие различные антигенсвязывающие белки дополнительно описаны в данном описании.

Участок "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены C_H1 и C_H2 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями доменов C_H3.

"Фрагмент Fab" содержит одну легкую цепь и C_H1 и вариабельные участки одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

"Фрагмент Fab'" содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен VH и домен C_H1, а также участок между доменами C_H1 и C_H2, таким образом, что межцепочечная дисульфидная связь может быть образована между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab', с образованием молекулы $F(ab')_2$.

"Фрагмент $F(ab')_2$ содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константного участка между доменами C_H1 и C_H2, таким образом, что межцепочечная дисульфидная связь образуется между двумя тяжелыми цепями. Фрагмент $F(ab')_2$, таким образом, состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

"Участок Fv" содержит вариабельные участки как тяжелой, так и легкой цепей, но не содержит константных участков.

"Одноцепочечные антитела" - это молекулы Fv, в которых вариабельные участки тяжелой и легкой цепи соединены гибким линкером, чтобы образовать единую полипептидную цепь, которая формирует антигенсвязывающий участок. Одноцепочечные антитела обсуждаются подробно в публикации международной патентной заявки WO 88/01649 и патентах США № 4946778 и 5260203, раскрытие которых включено путем ссылки.

"Доменное антитело" представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только вариабельный участок тяжелой цепи или вариабельный участок легкой цепи. В некоторых случаях, два или более участков V_H ковалентно соединены пептидным линкером с образованием двухвалентного доменного антитела. Два участка V_H двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

"Двухвалентный антигенсвязывающий белок" или "двухвалентное антитело" содержит два сайта связывания с антигеном. В некоторых случаях, два сайта связывания обладают специфичностью в отношении одного и того же антигена. Двухвалентные антигенсвязывающие белки и двухвалентные антитела могут быть биспецифичными, см. ниже. Двухвалентное антитело, кроме "полиспецифичного" или "полифункционального" антитела, в некоторых вариантах обычно понимается как содержащее идентичные сайты связывания.

"Полиспецифичный антигенсвязывающий белок" или "полиспецифичное антитело" нацелено на более чем один антиген или эпитоп.

"Биспецифичный", "с двойной специфичностью" или "бифункциональный" антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой гибридный антигенсвязывающий белок или антитело, соответственно, содержащий два различных сайта связывания с антигеном. Антигенсвязывающие белки и антитела с двойной специфичностью являются разновидностями полиспецифичного антигенсвязывающего белка антитела и могут быть получены разнообразными способами, в том числе, но, не ограничиваясь ими, слияние гибридом или соединение фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. Два сайта связывания антигенсвязывающего белка или антитела с двойной специфичностью будут связываться с двумя различными эпитопами, которые могут быть расположены на одном и том же или различных белках-мишенях.

Говорят, что антигенсвязывающий белок "специфично связывается" с антигеном-мишенью, если константа диссоциации (K_D) составляет $\leq 10^{-7}$ М. АСБ специфично связывается с антигеном с "высоким сродством", если K_d составляет $\leq 5\times10^{-9}$ М, и с "очень высоким сродством", если K_d составляет $\leq 5\times10^{-10}$ М. В одном из вариантов K_d АСБ составляет $\leq 10^{-9}$ М. В одном из вариантов скорость диссоциации составляет $<1\times10^{-5}$. В других вариантах АСБ будут связываться с PCSK9 человека с K_d от около 10^{-9} М до 10^{-13} М, и еще в одном варианте АСБ будут связываться с $K_d \leq 5\times10^{-10}$. Как будет понятно специалисту в данной области, в некоторых вариантах любой или все антигенсвязывающие фрагменты могут специфично связываться с PCSK9.

Антигенсвязывающий белок является "селективным", если он связывается с одной мишенью прочнее, чем он связывается со второй мишенью.

"Антигенсвязывающий участок" обозначает белок или часть белка, которая специфично связывается с указанным антигеном (например, паратопом). Например, та часть антигенсвязывающего белка, которая содержит остатки аминокислот, взаимодействующие с антигеном и обеспечивающие антигенсвязывающему белку его специфичность и сродство с антигеном, обозначается как "антигенсвязывающий

участок". Антигенсвязывающий участок обычно содержит один или более "комплементарных участков связывания" ("CDR"). Некоторые антигенсвязывающие участки также содержат один или более "каркасных" участков. "CDR" представляет собой последовательность аминокислот, которая способствует специфичности связывания и сродству с антигеном. "Каркасные" участки могут способствовать сохранению соответствующей конформации CDR, чтобы способствовать связыванию между антигенсвязывающим участком и антигеном. Структурно, каркасные участки могут быть размещены в антителах между CDR. Примеры каркасных и CDR участков показаны на фиг. 2A-3D, 3CCC-3JJJ. В некоторых вариантах последовательности CDR для легкой цепи антитела 3B6 являются следующими: CDR1 TLSSGYSSYEVD (SEQ ID NO: 279); CDR2 VDTGGIVGSKGE (SEQ ID NO: 280); CDR3 GADHGSGTNFVVV (SEQ ID NO: 281), и каркасные участки (FR) являются следующими: FR1 QPVLTQPLFASASLGASVTLTC (SEQ ID NO: 282); FR2 WYQQRPGKGPRFVMR (SEQ ID NO: 283); FR3 GIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHC (SEQ ID NO: 284); и FR4 FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 285).

В некоторых аспектах предлагаются рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые связываются с PCSK9, например, человеческим PCSK9. В данном контексте "рекомбинантный антигенсвязывающий белок" представляет собой белок, полученный с применением рекомбинантных методов, т.е. посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном описании. Способы и методы получения рекомбинантных белков хорошо известны из уровня техники.

Термин "антитело" обозначает интактный иммуноглобулин любого изотипа или его фрагмент, который может конкурировать с интактным антителом за специфическое связывание с антигеном-мишенью, и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифичные антитела. "Антитело" представляет собой разновидность антигенсвязывающего белка. Интактное антитело, в общем, содержит по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях может содержать меньше цепей, например, антитела, от природы встречающиеся у верблюдовых, которые могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут происходить исключительно из единственного источника, или могут быть "химерными", т.е. различные части антитела могут происходить от двух различных антител, как дополнительно описано ниже. Антигенсвязывающие белки, антитела или фрагменты связывания могут быть продуцированы в гибридомах, методами рекомбинантных ДНК, а также ферментным или химическим расщеплением интактных антител. Если не указано иное, термин "антитело" включает, в дополнение к антителам, содержащим две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, их производные, варианты, фрагменты и мутеины, примеры которых описаны ниже. К тому же, если только это не исключено явно, антитела включают моноклональные антитела, антитела с двойной специфичностью (биспецифичные), мини-тела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда обозначенные в данном описании как "миметики антитела"), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые антитела (иногда обозначенные в данном описании, как "конъюгат антитела") и их фрагменты соответственно. В некоторых вариантах термин также включает пептитела.

Природные структурные единицы антитела обычно составляют тетрамер. Каждый такой тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну полноразмерную "легкую" (в некоторых вариантах около 25 кДа) и одну полноразмерную "тяжелую" цепь (в некоторых вариантах около 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи обычно содержит вариабельный участок размером около 100-110 или более аминокислот, которые обычно ответственны за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи обычно определяет константный участок, который может быть ответственен за эффекторную функцию. Человеческие легкие цепи обычно классифицируются, как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи обычно классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG включает несколько подклассов, в том числе, не ограничиваясь ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM включает подклассы, в том числе, не ограничиваясь ими, IgM1 и IgM2. IgA также подразделяется на подклассы, в том числе, но, не ограничиваясь ими, IgA1 и IgA2. В пределах полноразмерных легких и тяжелых цепей, обычно, вариабельные и константные участки соединяются участком "J" длиной около 12 или более аминокислот, притом, что тяжелая цепь также содержит участок "D" длиной еще около 10 аминокислот. См., например, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включена путем ссылки в полном объеме для всех целей). Вариабельные участки каждой пары легкой/тяжелой цепей обычно формируют сайт связывания с антигеном.

Вариабельные участки обычно демонстрируют такую же общую структуру относительно консервативных каркасных участков (FR), соединенных тремя гипервариабельными участками, которые также называют участками, определяющими комплементарность, или CDR. CDR двух цепей каждой пары обычно выровнены каркасными участками, что может позволить связывание с конкретным эпитопом. От N-конца к C-концу, вариабельные участки как легкой, так и тяжелой цепи обычно содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому из доменов обычно осуществляют в соответствии с определениями Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:878-883 (1989).

В некоторых вариантах тяжелая цепь антитела связывается с антигеном в отсутствие легкой цепи антитела. В некоторых вариантах легкая цепь антитела связывается с антигеном в отсутствие тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах участок связывания антитела связывается с антигеном в отсутствие легкой цепи антитела. В некоторых вариантах участок связывания антитела связывается с антигеном в отсутствие тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах отдельный вариабельный участок специфично связывается с антигеном в отсутствие других вариабельных участков.

В некоторых вариантах определяющее изображение CDR и идентификацию остатков, составляющих сайт связывания с антителом, выполняют путем прояснения структуры антитела и/или прояснения структуры комплекса антитело-лиганд. В некоторых вариантах это может быть достигнуто любым из различных способов, известных специалистам в данной области, таких как рентгеновская кристаллография. В некоторых вариантах различные методы анализа могут применяться для идентификации или аппроксимации участков CDR. Примеры таких способов включают, не ограничиваясь ими, определение Kabat, определение Chothia, определение AbM и контактное определение.

Определение Kabat представляет собой стандарт для нумерации остатков в антителе и обычно используется, чтобы идентифицировать участки CDR. См., например, Johnson & Wu, Nucleic Acids Res., 28: 214-8 (2000). Определение Chothia подобно определению Kabat, но определение Chothia принимает во внимание положения определенных структурных участков петли. См., например, Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901-17 (1986); Chothia et al., Nature, 342:877-83 (1989). Определение AbM использует объединенный набор компьютерных программ, созданных Оксфордской Молекулярной Группой (Oxford Molecular Group), которые моделируют структуру антитела. См., например, Martin et al., Proc Natl Acad Sci (USA), 86:9268-9272 (1989); "AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies," Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd. Определение AbM моделирует третичную структуру антитела на основе первичной последовательности, с применением комбинации баз данных знаний и способов ab initio, таких как описанные Samudrala et al., "Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach", в PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl., 3:194-198 (1999). Контактное определение основано на анализе доступных сложных кристаллических структур. См., например, MacCallum et al., J. Mol. Biol., 5:732-45 (1996).

Согласно конвенции, участки CDR в тяжелой цепи обычно обозначаются как H1, H2 и H3, и нумеруются последовательно в направлении от амино-конца к карбокси-концу. Участки CDR в легкой цепи обычно обозначаются как L1, L2 и L3, и нумеруются последовательно в направлении от амино-конца к карбокси-концу.

Термин "легкая цепь" включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, содержащие достаточную последовательность вариабельного участка, чтобы обеспечить специфичность связывания. Полноразмерная легкая цепь содержит домен вариабельного участка, V_L, и домен константного участка, C_L. Домен вариабельного участка легкой цепи находится на амино-конце полипептида. Легкие цепи включают цепи каппа и цепи лямбда.

Термин "тяжелая цепь" включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, содержащие достаточную последовательность вариабельного участка, чтобы обеспечить специфичность связывания. Полноразмерная тяжелая цепь содержит домен вариабельного участка, Vh, и три домена константного участка, C_H1, C_H2 и C_H3. Домен V_H находится на амино-конце полипептида, и домены C_H находятся на карбокси-конце, причем C_H3 расположен ближе всего к карбокси-концу полипептида. Тяжелые цепи могут относиться к любому изотипу, в том числе, IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Биспецифичное или бифункциональное антитело обычно представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две различные пары тяжелой/легкой цепей и два различных сайта связывания. Антитела с двойной специфичностью могут быть получены разнообразными способами, в том числе, но, не ограничиваясь ими, слияние гибридом или соединение фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai et al., Clin. Exp. Immunol., 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-1553 (1992).

Некоторые виды млекопитающих также вырабатывают антитела, содержащие только одну тяжелую цепь.

Каждая индивидуальная цепь иммуноглобулина обычно состоит из нескольких "иммуноглобулиновых доменов", каждый из которых состоит грубо из 90-110 аминокислот и обладает характерным образцом сворачивания. Эти домены являются базовыми единицами, из которых скомпонованы полипептиды антитела. У человека, изотипы IgA и IgD содержат четыре тяжелые цепи и четыре легкие цепи; изотипы IgG и IgE содержат две тяжелые цепи и две легкие цепи; и изотип IgM содержит пять тяжелых цепей и пять легких цепей. Участок C тяжелой цепи обычно содержит один или более доменов, которые могут быть ответственны за эффекторную функцию. Количество доменов константного участка тяжелой цепи будет зависеть от изотипа. Тяжелые цепи IgG, например, содержат три домена участка C, известные как C_H1, C_H2 и C_H3. Антитела, которые предлагаются, могут относиться к любому из этих изотипов и подтипов. В некоторых вариантах настоящего изобретения, анти-PCSK9 антитело относится к подтипу IgG2 или IgG4.

Термин "вариабельный участок" или "вариабельный домен" обозначает часть легкой и/или тяжелой

цепей антитела, обычно содержащую приблизительно 120-130 амино-концевых аминокислот в тяжелой цепи и около 100-110 амино-концевых аминокислот в легкой цепи. В некоторых вариантах последовательность аминокислот вариабельных участков различных антител значительно отличается даже среди антител одного вида. Вариабельный участок антитела обычно определяет специфичность конкретного антитела в отношении его мишени.

Термин "нейтрализующий антигенсвязывающий белок" или "нейтрализующее антитело" обозначает антигенсвязывающий белок или антитело, соответственно, которое связывается с лигандом и предупреждает или уменьшает биологическое действие такого лиганда. Это может быть осуществлено, например, путем непосредственного блокирования сайта связывания на лиганде или путем связывания с лигандом и изменения способности лиганда к связыванию через косвенные средства (такие как структурные или энергетические модификации в лиганде). В некоторых вариантах термин может также обозначать антигенсвязывающий белок, который препятствует выполнению биологической функции белка, с которым он связан. При оценке связывания и/или специфичности антигенсвязывающего белка, например, антитела или его иммунологически функционального фрагмента, антитело или фрагмент может, в существенной мере, препятствовать связыванию лиганда с его партнером связывания, когда избыток антитела уменьшает количество партнера связывания, связанного с лигандом, по меньшей мере на около 1-20, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-85%, 85-90, 90-95%, 95-97%, 97-98%, 98-99% или более (по данным анализа конкурентного связывания in vitro). В некоторых вариантах, в случае антигенсвязывающих белков против PCSK9, такая нейтрализующая молекула может снижать способность PCSK9 связываться с ЛПНПР. В некоторых вариантах нейтрализующая способность характеризуется и/или описывается посредством конкурентного анализа. В некоторых вариантах нейтрализующая способность описана в терминах значения IC_{50} или EC_{50}. В некоторых вариантах АСБ 27B2, 13H1, 13B5 и 3C4 представляют собой не нейтрализующие АСБ, 3B6, 9C9 и 31A4 представляют собой слабые нейтрализаторы, и остальные АСБ в табл. 2 представляют собой высокоактивные нейтрализаторы. В некоторых вариантах антитела или антигенсвязывающие белки нейтрализуют связывание с PCSK9 и препятствуют связыванию PCSK9 с ЛПНПР (или снижают способность PCSK9 связываться с ЛПНПР). В некоторых вариантах антитела или АСБ нейтрализуют связывание с PCSK9, и хотя они все же позволяют PCSK9 связываться с ЛПНПР, но предупреждают или уменьшают опосредованное PCSK9 разложение ЛПНПР. Таким образом, в некоторых вариантах нейтрализующий АСБ или антитело все же может позволять связывание PCSK9/ЛПНПР, но будет предупреждать (или уменьшать) последующее разложение ЛПНПР с участием PCSK9.

Термин "мишень" обозначает молекулу или часть молекулы, способную к связыванию с антигенсвязывающим белком. В некоторых вариантах мишень может содержать один или более эпитопов. В некоторых вариантах мишень является антигеном. Использование термина "антиген" в выражении "антигенсвязывающий белок" просто означает, что белковая последовательность, которая содержит антиген, может связываться с антителом. В данном контексте, это не требует, чтобы белок был чужеродным, или чтобы он обладал способностью индуцировать иммунную реакцию.

Термин "конкурировать" в контексте антигенсвязывающих белков (например, нейтрализующих антигенсвязывающих белков или нейтрализующих антител), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками, что определяется анализом, в котором антигенсвязывающий белок (например, антитело или его иммунологически функциональный фрагмент) предупреждает или ингибирует (например, уменьшает) специфичное связывание референтного антигенсвязывающего белка (например, лиганда или референтного антитела) с общим антигеном (например, PCSK9 или его фрагментом). Многочисленные виды конкурентных анализов связывания могут применяться для определения того, конкурирует ли один из антигенсвязывающих белков с другим, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), сэндвичевый конкурентный анализ (см., например, Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253); твердофазный непрямой ИФА биотин-авидин (см., например, Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619), твердофазный анализ с прямой меткой, твердофазный сэндвичевый анализ с прямой меткой (см., например, Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); твердофазный РИА с прямой меткой с применением метки I-125 (см., например, Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7-15); твердофазный направленный ИФА биотин-авидин (см., например, Cheung, et al., 1990, Virology 176:546-552); и РИА с прямой меткой (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Обычно, такой анализ проводят с применением очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из следующего: немеченый исследуемый антигенсвязывающий белок и меченный референтный антигенсвязывающий белок. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии исследуемого антигенсвязывающего белка. Обычно, исследуемый антигенсвязывающий белок присутствует в избытке. Антигенсвязывающие белки, идентифицированные конкурентным анализом (конкурирующие антигенсвязывающие белки), включают антигенсвязывающие белки, которые связываются с тем же эпитопом, что и референтные антигенсвязывающие белки, и антигенсвязывающие белки, которые связываются со смежным эпитопом, расположенным в достаточной степе-

ни проксимально по отношению к эпитопу, связанному с референтным антигенсвязывающим белком, чтобы обеспечить стерические помехи. Дополнительные подробности относительно способов определения конкурентного связывания предложены в примерах данного описания. Обычно, если конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет препятствовать (например, уменьшать) специфичное связывание референтного антигенсвязывающего белка с общим антигеном по меньшей мере на 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75 или 75% или более. В некоторых случаях, связывание ингибируется по меньшей мере на 80-85, 85-90, 90-95, 95-97 или 97% или более.

Термин "антиген" обозначает молекулу или часть молекулы, способную к связыванию с селективным агентом связывания, таким как антигенсвязывающий белок (в том числе, например, антитело или его иммунологически функциональный фрагмент). В некоторых вариантах антиген может применяться у животного для продуцирования антител, способных к связыванию с указанным антигеном. Антиген может содержать один или более эпитопов, способных к взаимодействию с различными антигенсвязывающими белками, например, антителами.

Термин "эпитоп" включает любой детерминант, способный связываться с антигенсвязывающим белком, например, антителом или рецептором Т-клетки. Эпитоп представляет собой участок антигена, который связывается с антигенсвязывающим белком, нацеленным на данный антиген, и если антиген представляет собой белок, то содержит специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антигенсвязывающим белком. Чаще всего, эпитопы расположены на белках, но в некоторых случаях могут быть расположены на других видах молекул, таких как нуклеиновые кислоты. Детерминанты эпитопа могут содержать химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи Сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда. В общем, антитела, специфичные в отношении конкретного антигена-мишени, предпочтительно будут распознавать эпитоп на антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

В данном описании "в существенной мере чистый" означает, что описанные виды молекул представляют собой доминирующие виды в данном контексте, т.е. в молярном соотношении их больше, чем любых других отдельных видов в той же смеси. В некоторых вариантах, в существенной мере чистая молекула представляет собой композицию, в которой целевой вид составляет по меньшей мере 50% (в молярном соотношении) от всех присутствующих видов макромолекул. В других вариантах, в существенной мере чистая композиция будет содержать по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% от всех присутствующих в композиции видов макромолекул. В других вариантах целевые виды очищены до существенной однородности, причем загрязняющие виды не могут быть обнаружены в композиции обычными методами обнаружения, и, таким образом, композиция состоит из единственного обнаружимого вида макромолекул.

Термин "агент (средство)" используется в данном описании для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов.

В данном описании термины "метка" или "меченый" обозначают введение обнаружимого маркера, например, путем введения радиомеченной аминокислоты или прикрепления к полипептиду биотиновых фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или обладающего ферментной активностью, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими методами). В некоторых вариантах метка или маркер также может быть терапевтической. Различные способы введения меток в полипептиды и гликопротеины известны из уровня техники и могут применяться. Примеры меток для полипептидов включают, не ограничиваясь ими, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), флуоресцентные метки (например, ФИТЦ, родамин, лантанид фосфора), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, β-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), биотинильные группы, предварительно определенные эпитопы полипептида, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейцинового зиппера, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания с металлом, метки эпитопа). В некоторых вариантах метки присоединяются с помощью спейсерных веток различной длины для уменьшения потенциальных стерических помех.

Термин "биологический образец" в данном описании, включает, но, не ограничиваясь ими, любое количество субстанции из живого существа или в прошлом живого существа. Такие живые существа включают, не ограничиваясь ими, людей, мышей, обезьян, крыс, кроликов и других животных. Такие субстанции включают, не ограничиваясь ими, кровь, сыворотку, мочу, клетки, органы, ткани, кость, костный мозг, лимфатические узлы и кожу.

Термин "композиция фармацевтического агента" (или агент или лекарственное средство) в данном описании обозначает химическое соединение, композицию, агент или лекарственное средство, способное вызывать желательный терапевтический эффект при введении должным образом больному. Это не обязательно требует более чем одного вида ингредиента.

Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает определенное количество антигенсвязывающего белка против PCSK9 для получения терапевтической реакции у млекопитающего. Такие

терапевтически эффективные количества легко определяются средним специалистом в данной области.

Термин "модулятор" в данном описании обозначает соединение, которое изменяет или модифицирует активность или функцию молекулы. Например, модулятор может вызывать возрастание или снижение величины определенного вида активности или функции молекулы, в сравнении с величиной вида активности или функции, наблюдаемой в отсутствие модулятора. В некоторых вариантах модулятор представляет собой ингибитор, который уменьшает величину по меньшей мере одного вида активности или функцию молекулы. Некоторые примеры видов активности и функции молекулы включают, не ограничиваясь ими, сродство связывания, ферментную активность и преобразование сигнала. Некоторые примеры ингибиторов включают, не ограничиваясь ими, белки, пептиды, антитела, пептитела, углеводы или органичные молекулы небольшого размера. Пептитела описаны, например, в патенте США 6660843 (соответствует заявке PCT WO 01/83525).

Термины "пациент (больной)" и "субъект" используются равнозначно и включают людей и негуманоидных животных, в том числе, субъектов с формально диагностированными расстройствами, субъектов без формально распознанных расстройств, субъектов, получающих медицинский уход, субъектов, подверженных риску развития расстройств, и т.п.

Термины "лечить" и "лечение" включают терапевтическое лечение, профилактическое лечение, и виды применения, при которых снижается риск развития у субъекта расстройства или другой фактор риска. Лечение не требует полного излечения расстройства и включает варианты, в которых оно уменьшает симптомы или базовые факторы риска.

Термин "предупреждать" не требует 100% устранения вероятности события. Скорее, он означает, что вероятность наступления события снижается в присутствии соединения или способа.

Стандартные методы могут применяться для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, а также культуры и трансформации ткани (например, электропорация, липофекция). Ферментные реакции и способы очистки могут быть проведены согласно спецификациям производителя, или как обычно принято в данной области, или как описано в данном описании. Вышеизложенные способы и методики могут, в целом, выполняться в соответствии с обычными способами, хорошо известными из уровня техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, Sambrook et al.,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), которая включена в данное описание путем ссылки для любой цели. Если только не были предложены конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с, а также лабораторные методики и методы аналитической химии, синтетической органичной химии и медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном описании, представляют собой хорошо известные и обычно применяемые в данной области. Стандартные процедуры могут применяться для химического синтеза, химического анализа, получения, разработки и введения фармацевтических композиций, а также лечения больных.

Антигенсвязывающие белки против PCSK9

Пропротеин конвертаза субтилизин кексин тип 9 (PCSK9) - это серинпротеаза, участвующая в регуляции уровней белка рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛПНПР) (Horton et al., 2007; Seidah and Prat, 2007). PCSK9 представляет собой прогормон-пропротеин конвертазу в семействе серинпротеаз субтилизина (S8) (Seidah et al., 2003). Пример последовательности аминокислот PCSK9 человека представлен как SEQ ID NO: 1 и 3 на фиг. 1A ("pro" домен белка показан подчеркнутым) и фиг. 1B (сигнальная последовательность показана полужирным начертанием шрифта, и pro домен подчеркнут). Пример последовательности, кодирующей человеческий PCSK9, представлен как SEQ ID NO: 2 (фиг. 1B). Как проиллюстрировано в данном описании, белки PCSK9 могут также содержать фрагменты полноразмерного белка PCSK9. Структура белка PCSK9 была установлена двумя группами (Cunningham et al., Nature Structural & Molecular Biology, 2007 и Piper et al., Structure, 15:1-8, 2007), обе из которых включены в данное описание путем ссылки в полном объеме. PCSK9 содержит сигнальную последовательность, N-концевой pro-домен, субтилизин-подобный каталитический домен и C-концевой домен.

Антигенсвязывающие белки (АСБ), которые связываются с PCSK9, в том числе, человеческим PCSK9, предложены в данном описании. В некоторых вариантах предложенные антигенсвязывающие белки представляют собой полипептиды, которые содержат один или более дополнительных участков, определяющих комплементарность (CDR), как описано в данном описании. В некоторых антигенсвязывающих белках CDR встроены в "каркасный" участок, который ориентирует CDR, таким образом, что обеспечиваются соответствующие антигенсвязывающие свойства CDR. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки, предложенные в данном описании, могут препятствовать, блокировать, уменьшать или модулировать взаимодействие между PCSK9 и ЛПНПР. Такие антигенсвязывающие белки обозначают как "нейтрализующие". В некоторых вариантах связывание между PCSK9 и ЛПНПР все же может происходить, даже если антигенсвязывающий белок является нейтрализующим и связывается с PCSK9. Например, в некоторых вариантах АСБ предупреждает или уменьшает неблагоприятное влияние PCSK9 на ЛПНПР без блокирования сайта связывания с ЛПНПР на PCSK9. Таким образом, в некоторых вариантах АСБ модулирует или модифицирует способность PCSK9 приводить к разложению ЛПНПР, без необ-

ходимости препятствовать взаимодействию связывания между PCSK9 и ЛПНПР. Такой АСБ может быть конкретно описан как "не конкурентно нейтрализующий" АСБ. В некоторых вариантах нейтрализующий АСБ белок связывается с PCSK9 в таком положении и/или таким образом, который препятствует связыванию PCSK9 с ЛПНПР. Такие АСБ могут быть конкретно описаны как "конкурентно нейтрализующие" АСБ. Оба упомянутых выше нейтрализаторы могут приводить к большему количеству свободного ЛПНПР в организме субъекте, что приводит к большему уровню связывания ЛПНПР с ЛПНП (таким образом, уменьшая количества ЛПНП в организме субъекта). В свою очередь, это ведет к уменьшению количества холестерина, присутствующего в сыворотке субъекта.

В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки, предложенные в данном описании, способны воспрепятствовать опосредованной PCSK9 активности (в том числе, связыванию). В некоторых вариантах связывание антигенсвязывающих белков с данными эпитопами препятствует, среди прочего, взаимодействию между PCSK9 и ЛПНПР и другим физиологическим эффектам, опосредованным PCSK9. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки являются человеческими, например, полностью человеческие антитела против PCSK9.

В некоторых вариантах АСБ связывается с каталитическим доменом PCSK9. В некоторых вариантах АСБ связывается со зрелой формой PCSK9. В некоторых вариантах связывание АСБ происходит в pro-домене PCSK9. В некоторых вариантах АСБ селективно связывается со зрелой формой PCSK9. В некоторых вариантах АСБ связывается с каталитическим доменом, до некоторой степени таким образом, что PCSK9 не может связываться или связываться эффективно с ЛПНПР. В некоторых вариантах АСБ не связывается с с-концом каталитического домена. В некоторых вариантах АСБ не связывается с n-концом каталитического домена. В некоторых вариантах АСБ не связывается с n- или с-концом белка PCSK9. В некоторых вариантах АСБ связывается с любым из эпитопов, с которым связываются антитела, обсуждаемые в данном описании. В некоторых вариантах это может быть определено анализами конкуренции между антителами, раскрытыми в данном описании, и другими антителами. В некоторых вариантах АСБ связывается с эпитопом, с которым связывается одно из антител, описанных в табл. 2. В некоторых вариантах АСБ связываются с PCSK9 в конкретном конформационном состоянии, чтобы воспрепятствовать взаимодействию PCSK9 с ЛПНПР. В некоторых вариантах АСБ связывается с V доменом PCSK9. В некоторых вариантах АСБ связывается с V доменом PCSK9 и препятствует (или уменьшает) связыванию PCSK9 с ЛПНПР. В некоторых вариантах АСБ связывается с V доменом PCSK9, и хотя он не предупреждает (или уменьшает) связывания PCSK9 с ЛПНПР, АСБ предупреждает или уменьшает опосредованное PCSK9 неблагоприятное воздействие на ЛПНПР.

Антигенсвязывающие белки, которые раскрыты в данном описании, обладают различными полезными свойствами. Некоторые из антигенсвязывающих белков, например, пригодны для анализов специфичного связывания, очистки сродства к PCSK9, в частности, человеческому PCSK9 или его лигандам, и для скрининговых анализов с целью идентификации других антагонистов активности PCSK9. Некоторые из антигенсвязывающих белков пригодны для воспрепятствования связыванию PCSK9 с ЛПНПР, или ингибирования опосредованных PCSK9 эффектов.

Антигенсвязывающие белки могут применяться в разнообразных терапевтических сферах, как проиллюстрировано в данном описании. Например, в некоторых вариантах антигенсвязывающие белки PCSK9 пригодны для лечения состояний, связанных с PCSK9, таких как связанные с холестерином расстройства (или "связанные с холестерином сыворотки расстройства"), например, гиперхолестеринемии, как дополнительно проиллюстрировано в данном описании. Другие виды применения антигенсвязывающих белков включают, например, диагностику связанных с PCSK9 заболеваний или состояний и скрининговые анализы с целью определения присутствия или отсутствия PCSK9. Некоторые из антигенсвязывающих белков, описанных в данном описании, пригодны для лечения последствий, симптомов и/или патологии, связанной с активностью PCSK9.

В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки, которые предложены, содержат один или более CDR (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR). В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит (а) структуру полипептида и (б) один или более CDR, которые введены внутрь и/или присоединены к структуре полипептида. Структура полипептида может принимать множество различных форм. Например, она может представлять собой или содержать каркас природного антитела или его фрагмент или вариант, или может быть полностью синтетической по своей природе. Примеры различных полипептидных структур дополнительно проиллюстрированы ниже.

В некоторых вариантах полипептидная структура антигенсвязывающих белков представляет собой антитело или происходит от антитела, в том числе, не ограничиваясь ими, моноклональных антител, антител с двойной специфичностью, мини-тел, доменных антител, синтетических антител (иногда называемых в данном описании "миметиками антител"), химерных антител, гуманизированных антител, слитых антител (иногда называемых "конъюгатами антител") и частей или фрагментов каждого из них соответственно. В некоторых случаях антигенсвязывающий белок представляет собой иммунологический фрагмент антитела (например, Fab, Fab', $F(ab')_2$ или scFv). Различные структуры дополнительно описаны и определены в данном описании.

Некоторые из антигенсвязывающих белков, предложенных в данном описании, специфично и/или

селективно связываются с человеческим PCSK9. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок специфично и/или селективно связывается с человеческим белком PCSK9, содержащим и/или состоящим из остатков 153-692 SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах АСБ специфично и/или селективно связывается с человеческим PCSK9, содержащим и/или состоящим из остатков 31-152 SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах АСБ селективно связывается с человеческим белком PCSK9, как проиллюстрировано на фиг. 1A (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок специфично связывается, по меньшей мере, с фрагментом белка PCSK9 и/или полноразмерным белком PCSK9, с сигнальной последовательностью или без нее.

В вариантах, где антигенсвязывающий белок используется для терапевтического применения, антигенсвязывающий белок может ингибировать, препятствовать или модулировать один или более биологических эффектов PCSK9. В одном из вариантов антигенсвязывающий белок специфично связывается с человеческим PCSK9 и/или в существенной мере ингибирует связывание человеческого PCSK9 с ЛПНПР по меньшей мере на около 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-85% или более (например, по данным измерения связывания в анализе конкурентного связывания in vitro). Некоторые из антигенсвязывающих белков, предложенных в данном описании, являются антителами. В некоторых вариантах K_d АСБ составляет менее чем (более прочное связывание) 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13} М. В некоторых вариантах IC_{50} АСБ для блокирования связывания ЛПНПР с PCSK9 (D374Y, вариант с высоким сродством) составляет менее 1 мкМ, от 1000 до 100 нМ, от 100 до 10 нМ, от 10 до 1 нМ, от 1000 до 500 пМ, от 500 до 200 пМ, менее 200 пМ, от 200 до 150 пМ, от 200 до 100 пМ, от 100 до 10 пМ, от 10 до 1 пМ.

Один из примеров константного домена тяжелой цепи IgG2 анти-PCSK9 антитела по настоящему изобретению содержит последовательность аминокислот, как показано в SEQ ID NO: 154, фиг. 3KK.

Один из примеров константного домена тяжелой цепи IgG4 анти-PCSK9 антитела по настоящему изобретению содержит последовательность аминокислот, как показано в SEQ ID NO: 155, фиг. 3KK.

Один из примеров константного домена легкой цепи каппа анти-PCSK9 антитела содержит последовательность аминокислот, как показано в SEQ ID NO: 157, фиг. 3KK.

Один из примеров константного домена легкой цепи лямбда анти-PCSK9 антитела содержит последовательность аминокислот, как показано в SEQ ID NO: 156, фиг. 3KK.

Вариабельные участки цепей иммуноглобулина, в общем, демонстрируют одинаковую общую структуру, содержащую относительно консервативные каркасные участки (FR), соединенные тремя гипервариабельными участками, чаще называемыми "участками определения комплементарности" или CDR. CDR от двух цепей каждой пары тяжелая цепь/легкая цепь, упомянутой выше, обычно выровнен каркасными участками таким образом, чтобы сформировать структуру, которая специфично связывается с конкретным эпитопом на белке-мишени (например, PCSK9). От N-конца к С-концу, природные вариабельные участки легкой и тяжелой цепей обычно оба согласуются со следующим порядком данных элементов: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Система нумерации изобретена для присвоения номеров аминокислотам, которые занимают положения в каждом из этих доменов. Данная система нумерации определена в Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD) или Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883.

Различные вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи предложены в данном описании и проиллюстрированы на фиг. 2A-3JJ и 3LL-3BBB. В некоторых вариантах каждый из этих вариабельных участков может быть присоединен к упомянутым выше константным участкам тяжелой и легкой цепей, чтобы сформировать полноразмерную тяжелую и легкую цепь антитела соответственно. Дополнительно, каждая из таких генерируемых последовательностей тяжелой и легкой цепи может быть скомбинирована с образованием полной структуры антитела.

Конкретные примеры некоторых из вариабельных участков легкой и тяжелой цепей предложенных антител и их соответствующие последовательности аминокислот суммированы в табл. 2.

Таблица 2

Примеры вариабельных участков тяжелой и легкой цепи

Антитело	Легкая/тяжелая SEQ ID NO
30A4	5/74
3C4	7/85
23B5	9/71
25G4	10/72
31H4	12/67
27B2	13/87
25A7	15/58
27H5	16/52
26H5	17/51
31D1	18/53
20D10	19/48
27E7	20/54
30B9	21/55
19H9	22/56
26E10	23/49
21B12	23/49
17C2	24/57
23G1	26/50
13H1	28/91
9C9	30/64
9H6	31/62
31A4	32/89
1A12	33/65
16F12	35/79
22E2	36/80
27A6	37/76
28B12	38/77
28D6	39/78
31G11	40/83
13B5	42/69
31B12	44/81
3B6	46/60
5H5	421/419
24F7	425/423
22B11	429/427
30F1	433/431
24B9.1	437/435
24B9.2	441/439
20A5.1	445/443
20A5.2	449/447
20E5.1	453/451
20E5.2	457/455
8A3	461/459
11F1	465/463
12H11	469/467
11H4	473/471
11H8	477/475
11G1	481/479
8A1	485/483

Снова, каждый из примеров вариабельных тяжелых цепей, приведенных в табл. 2, может быть объединен с любым из примеров вариабельных легких цепей, показанных в табл. 2, с образованием антитела. В табл. 2 показаны примеры спаривания легких и тяжелых цепей, найденные в некоторых антителах, раскрытых в данном описании. В некоторых случаях, антитела содержат по меньшей мере одну вариабельную тяжелую цепь и одну вариабельную легкую цепь из числа приведенных в табл. 2. В других случаях, антитела содержат две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи. В качестве примера, антитело или антигенсвязывающий белок может содержать тяжелую цепь и легкую цепь, две тяжелые цепи или две легкие цепи. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит (и/или состоит из) 1, 2 и/или 3 CDR тяжелой и/или легкой цепи из по меньшей мере одной из последовательно-

стей, приведенных в табл. 2 (CDR для последовательностей проиллюстрированы на фиг. 2A-3D, и другие варианты на фиг. 3CCC-3JJJ и 15A-15D). В некоторых вариантах все 6 CDR (CDR1-3 из легкой (CDRL1, CDRL2, CDRL3) и CDR1-3 из тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3)) являются частью АСБ. В некоторых вариантах 1, 2, 3, 4, 5 или более CDR входят в АСБ. В некоторых вариантах один тяжелый и один легкий CDR из числа CDR в последовательностях табл. 2 входят в АСБ (CDR для последовательностей в табл. 2 проиллюстрированы на фиг. 2A-3D). В некоторых вариантах дополнительные секции (например, как проиллюстрировано на фиг. 2A-2D, 3A-3D, и другие варианты в 3CCC-3JJJ и 15A-15D) также входят в АСБ. Примеры CDR и FR для тяжелых и легких цепей, отмеченных в табл. 2, проиллюстрированы на фиг. 2A-3D (и другие варианты на фиг. 3CCC-3JJJ и 15A-15D). Необязательные вариабельные последовательности легкой цепи (в том числе, CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 и FR4) могут быть выбраны из следующих: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44, 46, 421, 425, 429, 433, 437, 441, 445, 449, 453, 457, 461,465, 469, 473, 477, 481 и 485. Необязательные вариабельные последовательности тяжелой цепи (в том числе, CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 и FR4) могут быть выбраны из следующих: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81,60, 419, 423, 427, 431, 435, 439, 443, 447, 451, 455, 459, 463, 467, 471, 475, 479 и 483. В некоторых из входных данных на фиг. 2A-3D, идентифицированы вариации последовательностей или альтернативные границы CDR и FR. Эти альтернативы показаны с помощью "v1" после названия АСБ. Поскольку большинство таких альтернатив незначительны по своей природе, только секции с отличиями приведены в таблице. Следует понимать, что остальная секция легкой или тяжелой цепи является такой же, как показано для базового АСБ на других панелях. Поэтому, например, 19H9v1 на фиг. 2C содержит такие же FR1, CDR1 и FR2, как 19H9 на фиг. 2A, поскольку единственная разница отмечена на фиг. 2C. Для трех из последовательностей нуклеиновых кислот (АСБ 26E10, 30B9 и 31B12), дополнительные альтернативные последовательности нуклеиновых кислот предложены на фигурах. Как будет понятно специалисту в данной области, не более чем одна такая последовательность фактически должна быть использована в создании антитела или АСБ. Действительно, в некоторых вариантах, существует потребность в присутствии только одной или ни одной из конкретных нуклеиновых кислот тяжелой или легкой цепи.

В некоторых вариантах АСБ кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая может кодировать любую из последовательностей белка в табл. 2.

В некоторых вариантах АСБ связывается селективно с формой PCSK9, которая связывается с ЛПНПР (например, аутокатализируемая форма молекулы). В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок не связывается с с-концом каталитического домена (например, 5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40 и более аминокислот на с-конце). В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок не связывается с n-концом каталитического домена (например, 5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40 и более аминокислот на n-конце). В некоторых вариантах АСБ связывается с аминокислотами в пределах аминокислот 1-100 зрелой формы PCSK9. В некоторых вариантах АСБ связывается с аминокислотами в пределах (и/или последовательностями аминокислот, состоящими из) аминокислот 31-100, 100-200, 31-152, 153-692, 200-300, 300-400, 452-683, 400-500, 500-600, 31-692, 31-449, и/или 600-692. В некоторых вариантах АСБ связывается с каталитическим доменом. В некоторых вариантах нейтрализующий и/или не нейтрализующий АСБ связывается с pro-доменом. В некоторых вариантах АСБ связывается как с каталитическим, так и с pro-доменом. В некоторых вариантах АСБ связывается с каталитическим доменом, чтобы блокировать область на каталитическом домене, которая взаимодействует с pro-доменом. В некоторых вариантах АСБ связывается с каталитическим доменом в положении или на поверхности, с которой взаимодействует pro-домен, как проиллюстрировано в Piper et al. (Structure 15:1-8 (2007), которая, таким образом, включена путем ссылки в полном объеме, в том числе структурные представления в данном описании). В некоторых вариантах АСБ связывается с каталитическим доменом и ограничивает подвижность pro-домена. В некоторых вариантах АСБ связывается с каталитическим доменом без связывания с pro-доменом. В некоторых вариантах АСБ связывается с каталитическим доменом, без связывания с pro-доменом, при этом, препятствуя переориентации pro-домена, которая позволила бы связывание PCSK9 с ЛПНПР. В некоторых вариантах связывание АСБ происходит на том же эпитопе, что и окружающие остатки 149-152 pro-домена в Piper с соавт. В некоторых вариантах АСБ связываются с желобком (как проиллюстрировано в общих чертах в Piper с соавт.) на V домене. В некоторых вариантах АСБ связываются с богатым гистидином участком, проксимальным по отношению к желобку на V домене. В некоторых вариантах такие антитела (которые связываются с V доменом) не являются нейтрализующими. В некоторых вариантах антитела, которые связываются с V доменом, являются нейтрализующими. В некоторых вариантах нейтрализующие АСБ предупреждают связывание PCSK9 с ЛПНПР. В некоторых вариантах нейтрализующие АСБ, хотя и предупреждают разложение ЛПНПР под действием PCSK9, не предупреждают связывания PCSK9 с ЛПНПР (например, АСБ 31A4). В некоторых вариантах АСБ связывается с или блокирует по меньшей мере один из остатков гистидина, проиллюстрированных на фиг. 4 работы Piper с соавт. В некоторых вариантах АСБ блокирует каталитическую триаду в PCSK9.

В некоторых вариантах антитело связывается селективно с различными белками PCSK9, например, D374Y, по сравнению с PCSK9 дикого типа. В некоторых вариантах такие антитела связываются с вари-

антом по меньшей мере в 2 раза прочнее, чем с диким типом, и предпочтительно в 2-5, 5-10, 10-100, 100-1000, 1000-10000 раз или более - с мутантом, чем с диким типом (по данным K_d). В некоторых вариантах антитело селективно ингибирует взаимодействие варианта D374Y PCSK9 с ЛПНПР по сравнению со способностью PCSK9 дикого типа взаимодействовать с ЛПНПР. В некоторых вариантах такие антитела блокируют способность варианта связываться с ЛПНПР прочнее, чем способность дикого типа, например, по меньшей мере в 2 раза прочнее по сравнению с диким типом и предпочтительно прочнее в 2-5, 5-10, 10-100, 100-1000 или более раз для мутанта, чем для дикого типа (по данным IC_{50}). В некоторых вариантах антитело связывается с и нейтрализует как PCSK9 дикого типа, так и варианты PCSK9, например, D374Y при сходных уровнях. В некоторых вариантах антитело связывается с PCSK9, чтобы воспрепятствовать связыванию вариантов ЛПНПР с PCSK9. В некоторых вариантах варианты ЛПНПР являются по меньшей мере на 50% идентичными ЛПНПР человека. Отмечается, что варианты ЛПНПР известны специалисту в данной области (например, Brown MS et al., "Calcium cages, acid baths and recycling receptors" Nature 388: 629-630, 1997). В некоторых вариантах АСБ может повышать уровень эффективного ЛПНПР при гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (если присутствует вариант с утратой функции ЛПНПР).

В некоторых вариантах АСБ связывается (но не блокирует) с вариантами PCSK9, которые являются по меньшей мере на 50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99% или более идентичными форме PCSK9, проиллюстрированной на фиг. 1A и/или фиг. 1B. В некоторых вариантах АСБ связывается (но не блокирует) с вариантами PCSK9, которые являются по меньшей мере 50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99% или более идентичными зрелой форме PCSK9, проиллюстрированной на фиг. 1A и/или фиг. 1B. В некоторых вариантах АСБ связывается с и предупреждает взаимодействие с ЛПНПР вариантов PCSK9, которые являются по меньшей мере на 50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99% или более идентичными форме PCSK9, проиллюстрированной на фиг. 1A и/или фиг. 1B. В некоторых вариантах АСБ связывается с и предупреждает взаимодействие с ЛПНПР вариантов PCSK9, которые являются по меньшей мере на 50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99% или более идентичными зрелой форме PCSK9, проиллюстрированной на фиг. 1B. В некоторых вариантах вариант PCSK9 представляет собой человеческий вариант, например, варианты в положении 474, E620G и/или E670G. В некоторых вариантах аминокислота в положении 474 представляет собой валин (как в других человеческих вариантах) или треонин (как у обезьяны и мыши). При условии, что данные перекрестной реактивности приведены в данном описании, мы считаем, что настоящие антитела будут легко связываться с описанными выше вариантами.

В некоторых вариантах АСБ связывается с эпитопом, связанным с одним из антител, описанных в табл. 2. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки связываются со специфическим конформационным состоянием PCSK9, чтобы воспрепятствовать взаимодействию PCSK9 с ЛПНПР.

Гуманизированные антигенсвязывающие белки (например, антитела)

Как описано в данном описании, антигенсвязывающий белок против PCSK9 может содержать гуманизированное антитело и/или его часть. Важным практическим применением такой стратегии является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши.

В некоторых вариантах гуманизированное антитело в существенной мере не иммуногенно для человека. В некоторых вариантах гуманизированное антитело обладает в существенной мере таким же сродство к мишени, как антитело другого вида, из которого получено гуманизированное антитело. См., например, патент США 5530101, патент США 5693761; патент США 5693762; патент США 5585089.

В некоторых вариантах идентифицированы аминокислоты вариабельного домена антитела, которые могут быть модифицированы без снижения природного сродства антигенсвязывающего домена, при уменьшении его иммуногенности. См., например, патенты США 5766886 и 5869619.

В некоторых вариантах модификация антитела способами, известными из уровня техники, обычно конструируется таким образом, чтобы обеспечить повышенное сродство связывания с мишенью и/или снизить иммуногенность антитела для реципиента. В некоторых вариантах гуманизированные антитела модифицируют для исключения сайтов гликозилирования с целью повышения сродства антитела к родственному антигену. См., например, Co et al., Mol. Immunol., 30:1361-1367 (1993). В некоторых вариантах для получения гуманизированных антител применяются такие способы, как "реконструирование", "гиперхимеризация" или "покрытие/модификация поверхности". См., например, Vaswami et al., Annals of Allergy, Asthma, & Immunol. 81:105 (1998); Roguska et al., Prot. Engineer., 9:895-904 (1996); и патент США 6072035. В некоторых из таких вариантов, подобные методы обычно снижают иммуногенность антитела, уменьшая количество чужеродных остатков, но не предупреждают анти-идиотипических и анти-аллотипических реакций, следующих за повторным введением антител. Описаны некоторые другие способы снижения иммуногенности, например, в Gilliland et al., J. Immunol., 62(6):3663-71 (1999).

В определенных случаях, гуманизация антител приводит к ущербу для емкости связывания с антигеном. В некоторых вариантах гуманизированные антитела "обратно мутировали". В некоторых из таких вариантов, гуманизированное антитело видоизменено таким образом, чтобы содержать один или более остатков аминокислот, найденных в донорском антителе. См., например, Saldanha et al., Mol. Immunol. 36:709-19 (1999).

В некоторых вариантах участки определения комплементарности (CDR) вариабельных участков

легкой и тяжелой цепи антитела против PCSK9 могут быть пересажены на каркасные участки (FR) того же или другого вида. В некоторых вариантах CDR вариабельных участков легкой и тяжелой цепи антитела против PCSK9 могут быть пересажены на консенсусные человеческие FR. Для создания консенсусных человеческих FR, в некоторых вариантах FR из нескольких последовательностей аминокислот человеческих тяжелых цепей или легких цепей выравнивают, чтобы идентифицировать консенсусную последовательность аминокислот. В некоторых вариантах FR тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PCSK9 заменяют FR из другой тяжелой цепи или легкой цепи. В некоторых вариантах редкие аминокислоты в FR тяжелых и легких цепей антитела против PCSK9 не заменяют, тогда, как остальные аминокислоты FR заменяют. Редкие аминокислоты представляют собой специфические аминокислоты, которые находятся в положениях, в которых они обычно не найдены в FR. В некоторых вариантах пересаженные вариабельные участки от антитела против PCSK9 могут применяться с константным участком, который отличается от константного участка антитела против PCSK9. В некоторых вариантах пересаженные вариабельные участки представляют собой часть одноцепочечного антитела Fv. Пересаживание CDR описано, например, в патентах США 6180370, 6054297, 5693762, 5859205, 5693761, 5565332, 5585089 и 5530101, и в Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988), Winter, FEBS Letts., 430:92-94 (1998), которые, таким образом, включены путем ссылки для любой цели.

Человеческие антигенсвязывающие белки (например, антитела)

Как описано в данном описании, антигенсвязывающий белок, который связывается с PCSK9, может содержать человеческое (т.е. полностью человеческое) антитело и/или его часть. В некоторых вариантах предложены нуклеотидные последовательности, которые кодируют, и последовательности аминокислот, которые содержат молекулы тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, особенно последовательности, соответствующие вариабельным участкам. В некоторых вариантах предложены последовательности, соответствующие участкам определения комплементарности (CDR), конкретно, от CDR1 до CDR3. В соответствии с некоторыми вариантами, предложена линия клеток гибридомы, экспрессирующая такую молекулу иммуноглобулина. В соответствии с некоторыми вариантами, предложена линия клетки гибридомы, экспрессирующая такое моноклональное антитело. В некоторых вариантах линию клетки гибридомы выбирают по меньшей мере из одной линии клеток, описанной в табл. 2, например, 21B12, 16F12 и 31H4. В некоторых вариантах предложено очищенное человеческое моноклональное антитело против человеческого PCSK9.

Можно сконструировать породы мышей с недостаточной выработкой мышиных антител с крупными фрагментами человеческих локусов Ig в предположении, что такие мыши вырабатывали бы человеческие антитела в отсутствие мышиных антител. Крупные человеческие фрагменты Ig могут сохранять широкое разнообразие вариабельного гена, а также надлежащую регуляцию выработки и экспрессии антитела. С применением мышиной "фабрики" для диверсификации и селекции антител при отсутствии иммунологической толерантности к человеческим белкам, воспроизведенный человеческий репертуар антител у таких пород мышей может давать полностью человеческие антитела с высоким сродством против любого целевого антигена, в том числе, человеческих антигенов. При применении технологии гибридомы, антиген специфические человеческие MAb с желательной специфичностью могут быть получены и отобраны. Некоторые примеры способов описаны в WO 98/24893, патенте США 5545807, EP 546073 и EP 546073.

В некоторых вариантах можно применять константные участки других видов, кроме человека, наряду с человеческим вариабельным участком(ами).

Способность клонировать и реконструировать человеческие локусы размером в миллионы оснований в искусственных хромосомах дрожжей (ИХД) и вводить их в зародышевую линию мыши предлагает подход для прояснения функциональных компонентов очень крупно или грубо картированных локусов, а также для генерации полезных моделей заболеваний человека. Кроме того, применение такой технологии для замены локусов мыши их человеческими эквивалентами могло бы обеспечить интуитивное проникновение в экспрессию и регуляцию генных продуктов у человека в ходе развития, их коммуникацию с другими системами, и их вовлечение в индукцию и прогрессирование заболевания.

Человеческие антитела позволяют избежать некоторых проблем, связанных с антителами, которые содержат мышиные или крысиные вариабельные и/или константные участки. Присутствие таких белков мышиного или крысиного происхождения может приводить к быстрому клиренсу антител или генерации иммунной реакции больного против антитела. Во избежание применения антител мышиного или крысиного происхождения, полностью человеческие антитела могут генерироваться посредством введения функциональных человеческих локусов антитела в организм грызуна, другого млекопитающего или животного, таким образом, что грызун, другое млекопитающее или животное вырабатывает полностью человеческие антитела.

Гуманизированные антитела представляют собой такие антитела, которые, хотя изначально содержали последовательности аминокислот антитела, не являющиеся человеческими, но впоследствии, по меньшей мере, некоторые из этих нечеловеческих последовательностей аминокислот антитела были заменены последовательностями человеческих антител. Они составляют противоположность человеческим

антителам, в которых антитело кодируется (или может кодироваться) генами, принадлежащими человеку.

Варианты антигенсвязывающего белка

Другие предложенные антитела являются вариантами АСБ, приведенного выше, которые образованы комбинацией или подчастями вариабельных тяжелых и вариабельных легких цепей, приведенных в табл. 2, и содержат вариабельные легкие и/или вариабельные тяжелые цепи, каждая из которых является по меньшей мере на 50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-97, 97-99% или более чем на 99% идентичной последовательностям аминокислот приведенных в табл. 2 последовательностей (полная последовательность или подчасть последовательности, например, один или более CDR). В некоторых случаях такие антитела содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, тогда как в других случаях варианты содержат две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи (или их подчасти). В некоторых вариантах сравнение последовательностей на фиг. 2A-3D (и 13A-13J, другие варианты в 15A-15D и на фиг. 48A и 48B) может применяться для того, чтобы идентифицировать секции антител, которые могут быть модифицированы, путем наблюдения за теми вариациями, которые влияют на связывание и теми вариациями, которые, по-видимому, не влияют на связывание. Например, сравнивая сходные последовательности, можно идентифицировать те секции (например, конкретные аминокислоты), которые могут быть модифицированы, и как они могут быть модифицированы, чтобы все же сохранить (или улучшить) функциональность АСБ. В некоторых вариантах варианты АСБ содержат такие консенсусные группы и последовательности, которые проиллюстрированы на фиг. 13A, 13C, 13F, 13G, 13H, 13I, 13J и/или 48A и 48B, и вариации разрешены в положениях, идентифицированных на фигурах как вариабельные. CDR, проиллюстрированные на фиг. 13A, 13C, 13F, 13G, 48A и 48B, были определены на основании гибридной комбинации способа Chothia (базируется на расположении структурных участков петли, см., например, "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Bissan Al-Lazikani, Arthur M. Lesk and Cyrus Chothia, Journal of Molecular Biology, 273(4):927-948, 7 November (1997)) и способа Kabat (базируется на изменчивости последовательности, см., например, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, Kabat et al. (1991)). Каждый остаток, определенный любым из способов, включен в заключительный перечень остатков CDR (и представлен на фиг. 13A, 13C, 13F, 13G, и 48A и 48B). CDR на фиг. 13H, 13I и 13J были получены только способом Kabat. Если не указано иное, определенные консенсусные последовательности, CDR и FR на фиг. 13H-13J будут определять и контролировать отмеченные CDR и FR на указанных АСБ на фиг. 13.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельный участок, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 и 60. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельный участок, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 и 60. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельный участок, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 и 60.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 90-95 и/или 95-99% идентичной одному или более CDR из числа CDR по меньшей мере в одной из последовательностей SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 и 60. В некоторых вариантах присутствует 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR (каждый из которых по меньшей мере на 90, 90-95% и/или 95-99% идентичен упомянутым выше последовательностям).

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 90-95 и/или 95-99% идентичной одному или более FR из числа FR, по меньшей мере в одной из последовательностей SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 и 60. В некоторых вариантах присутствует 1, 2, 3 или 4 FR (каждый из которых является по меньшей мере на 90, 90-95% и/или 95-99% идентичным упомянутым выше последовательностям).

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит легкую цепь, содержащую вариабельный участок, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 и 46. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит легкую цепь, содержащую вариабельный участок, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44

и 46. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит легкую цепь, содержащую вариабельный участок, содержащий последовательность аминокислот, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 и 46.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 90-95 и/или 95-99% идентичной одному или более CDR из числа CDR, по меньшей мере в одной из последовательностей SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 и 46. В некоторых вариантах присутствует 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR (каждый из которых является по меньшей мере на 90, 90-95 и/или 95-99% идентичным упомянутым выше последовательностям).

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 90-95 и/или 95-99% идентичной одному или более FR из числа FR, по меньшей мере в одной из последовательностей SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 и 46. В некоторых вариантах присутствует 1, 2, 3, или 4 FR (каждый из которых является по меньшей мере на 90, 90-95 и/или 95-99% идентичным упомянутым выше последовательностям).

В свете настоящего раскрытия, квалифицированный специалист сможет определить подходящие варианты АСБ, как было описано в данном описании, с применением известных методов. В некоторых вариантах специалист в данной области может идентифицировать подходящие области молекулы, которые могут быть модифицированы без уничтожения активности, нацеливающими участками, которые не считаются важными для активности. В некоторых вариантах можно идентифицировать остатки и части молекул, которые являются консервативными среди подобных полипептидов. В некоторых вариантах даже области, которые могут быть важны с точки зрения биологической активности или структуры, могут подлежать консервативным заменам аминокислот без уничтожения биологической активности или без неблагоприятного влияния на структуру полипептида.

Дополнительно, специалист в данной области может рассматривать исследования структуры-функции, идентифицирующие остатки в подобных полипептидах, которые важны для активности или структуры. Принимая во внимание такое сравнение, можно предсказать важность остатков аминокислот в белке, которые соответствуют остаткам аминокислот, важным с точки зрения активности или структуры в подобных белках. Специалист в данной области может выбрать замены химически подобных аминокислот для таких остатков аминокислот с предсказанной важностью.

Специалист в данной области может также проанализировать трехмерную структуру и последовательность аминокислот относительно такой структуры в подобном АСБ. Принимая во внимание такую информацию, специалист в данной области может предсказать выравнивание остатков аминокислот антитела с учетом его трехмерной структуры. В некоторых вариантах специалист в данной области может сделать выбор не вносить радикальных изменений в остатки аминокислот, предсказанные как находящиеся на поверхности белка, поскольку такие остатки могут принимать участие в значимых взаимодействиях с другими молекулами. Кроме того, специалист в данной области может генерировать тестовые варианты, содержащие одинарную замену аминокислоты в каждом желательном остатке аминокислоты. Далее может быть проведен скрининг вариантов с применением анализов активности, известных специалистам в данной области. Такие варианты могут применяться для сбора информации о пригодных вариантах. Например, если обнаружено, что модификация конкретного остатка аминокислоты приводила к уничтожению, нежелательному снижению или неподходящей активности, вариантов с такой модификацией можно избегать. Другими словами, на основании информации, полученной в результате таких шаблонных экспериментов, специалист в данной области, может легко определить аминокислоты, в которых дополнительных замен следует избегать, отдельно или в комбинации с другими мутациями.

Целый ряд научных публикаций посвящен предсказанию вторичной структуры. См. Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou et al., Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chou et al., Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); Chou et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou et al., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 и Chou et al., Biophys. J., 26:367-384 (1979). Кроме того, в настоящий момент доступны компьютерные программы, которые помогают предсказать вторичную структуру. Один из способов предсказания вторичной структуры основан на моделировании гомологии. Например, два полипептида или белка, для которых идентичность последовательностей составляет более 30% или более 40%, часто обладают сходной структурной топологией. Недавнее увеличение базы данных о структуре белков (БДБ) обеспечило повышение предсказуемости вторичной структуры, в том числе, потенциальное количество сворачиваний в пределах полипептида или структуры белка. См. Holm et al., Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999). Высказано мнение (Brenner et al., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)) о существовании ограниченного количества сворачиваний в данном полипептиде или белке, и о том, что как только будет определено критическое количество структур, предсказание структуры станет намного более точным.

Дополнительные способы предсказания вторичной структуры включают "нанизывание" (Jones, D.,

Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl et al., Structure, 4(1):15-19 (1996)), "анализ профиля" (Bowie et al., Science, 253:164-170 (1991); Gribskov et al., Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskov et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84(13):4355-4358 (1987)), и "эволюционное соединение" (см. Holm, выше (1999), и Brenner, выше (1997)).

В некоторых вариантах варианты антигенсвязывающего белка включают варианты гликозилирования, в которых количество и/или тип сайта гликозилирования модифицированы по сравнению с последовательностями аминокислот родительского полипептида. В некоторых вариантах варианты белка включают большее или меньшее количество N-связанных сайтов гликозилирования, чем природный белок. N-Связанный сайт гликозилирования характеризуется последовательностью: Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, в которой остаток аминокислоты, обозначенный как X, может быть остатком любой аминокислоты, кроме пролина. Замена остатков аминокислот для создания данной последовательности предлагает потенциальный новый сайт для добавления N-связанной углеводной цепи. Альтернативно, замены, которые исключают данную последовательность, будут исключать существующую N-связанную углеводную цепь. Дополнительно предложена реорганизация N-связанных углеводных цепей, при которой один или более N-связанных сайтов гликозилирования (обычно природных) исключаются, и один или более новых N-связанных сайтов создаются. Дополнительные предпочтительные варианты антитела включают цистеиновые варианты, в которых один или более остатков цистеина удаляют или заменяют другой аминокислотой (например, серином) по сравнению с родительской последовательностью аминокислот. Цистеиновые варианты могут быть пригодными, если антитела должны быть повторно свернуты в биологически активную конформацию, например, после выделения нерастворимых телец включения. Цистеиновые варианты, в общем, содержат меньше остатков цистеина, чем природный белок, и обычно содержат четное количество, чтобы минимизировать взаимодействия, которые являются результатом нечетных остатков цистеина.

В соответствии с некоторыми вариантами, замены аминокислот являются такими, которые: (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) снижают чувствительность к окислению, (3) модифицируют сродство связывания для формирования белковых комплексов, (4) модифицируют сродство связывания, и/или (4) обеспечивают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких полипептидов. В соответствии с некоторыми вариантами однократные или множественные замены аминокислот (в некоторых вариантах консервативные замены аминокислот) могут быть осуществлены в природной последовательности (в некоторых вариантах - в части полипептида за пределами домена(ов), образующих межмолекулярные контакты). В некоторых вариантах консервативная замена аминокислоты обычно может в существенной мере не менять структурных характеристик родительской последовательности (например, замена аминокислоты не должна демонстрировать тенденции к разрушению спирали, которая существует в родительской последовательности, или разрушать другие виды вторичной структуры, которая характеризует родительскую последовательность). Примеры признанных в уровне техники вторичных и третичных структур полипептида описаны в Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden & J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, NY. (1991)); и Thornton et al., Nature, 354:105 (1991), каждая из которых включена в данное описание путем ссылки.

В некоторых вариантах, варианты представляют собой варианты последовательностей нуклеиновых кислот АСБ, раскрытых в данном описании. Специалисту в данной области будет понятно, что приведенное выше обсуждение может применяться для идентификации, оценки и/создания вариантов белка АСБ, а также для последовательностей нуклеиновых кислот, которые могут кодировать такие варианты белка. Таким образом, предусмотрены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие такие варианты белка (а также последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют АСБ в табл. 2, но отличные от явно раскрытых в данном описании). Например, вариант АСБ может быть по меньшей мере на 80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-97, 97-99 или более идентичным по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в SEQ ID NO: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, или по меньшей мере от 1 до 6 (и различным их комбинациям) CDR, кодируемых последовательностями нуклеиновых кислот в SEQ ID NO: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 и 151.

В некоторых вариантах антитело (или кодирующая его последовательность нуклеиновой кислоты) является вариантом, если последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный АСБ (или непосредственно последовательность нуклеиновой кислоты), может селективно гибридизоваться с любой из последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют белки в табл. 2 (например, но, не ограничиваясь ими, SEQ ID NO: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 и

151) в строгим условиях. В одном из вариантов пригодные умеренно строгие условия включают предварительное промывание в растворе 5 × натрия хлорида и цитрата (НХЦ); 0,5% натрия лаурилсульфата, 1,0 мМ ЭДТА (pH 8:0); гибридизацию при 50, -65°C, 5 × НХЦ на протяжении ночи, или, в случае перекрестно-видовой гомологии, при 45°C с 0,5 × НХЦ; с последующим промыванием дважды при 65°C в течение 20 мин каждым из 2×, 0,5× и 0,2 × НХЦ, содержащим 0,1% натрия лаурилсульфата. Такие последовательности, гибридизующиеся с ДНК, также находятся в пределах контекста данного изобретения, поскольку существуют нуклеотидные последовательности, которые, в результате вырождения кода, кодируют полипептид антитела, который кодируется последовательностью гибридизующейся ДНК, и последовательности аминокислот, которые кодируются такими последовательностями нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах, варианты CDR содержат последовательности нуклеиновых кислот и последовательности аминокислот, кодируемые такими последовательностями, которые гибридизуются с одним или более CDR в пределах последовательностей, отмеченных выше (индивидуальные CDR могут легко быть определены в свете фиг. 2A-3D, и другие варианты на фиг. 3CCC-3JJJ и 15A-15D). Выражение "селективно гибридизоваться" в данном контексте обозначает обнаружимое и селективное связывание. Полинуклеотиды, олигонуклеотиды и их фрагменты в соответствии с изобретением селективно гибридизуются с цепями нуклеиновой кислоты в условиях гибридизации и промывания, которые минимизируют поддающиеся определению количества обнаружимого связывания с неспецифическими нуклеиновыми кислотами. Условия высокой строгости могут применяться для обеспечения условий селективной гибридизации, как известно из уровня техники и обсуждается в данном описании. В общем, гомология последовательностей нуклеиновых кислот между полинуклеотидами, олигонуклеотидами и фрагментами по изобретению и целевой последовательностью нуклеиновой кислоты будет составлять по меньшей мере 80%, и более типично, с увеличением гомологии по меньшей мере до 85, 90, 95, 99 и 100%. Две последовательности аминокислот гомологичны, если существует частичная или полная идентичность между ними. Например, гомология 85% означает, что 85% аминокислот идентичны, если две последовательности выровнены для максимального соответствия. Промежутки (в любой из двух совпадающих последовательностей) разрешены для максимизации соответствия; длина промежутка 5 или менее предпочтительна, причем 2 или менее является более предпочтительной. Альтернативно и предпочтительно, две последовательности белка (или происходящие от них полипептидные последовательности длиной по меньшей мере 30 аминокислот) гомологичны, в том значении, в котором данный термин используется в настоящем описании, если для них балл выравнивания составляет более 5 (в единицах стандартного отклонения), с применением программы ALIGN с матрицей данных мутации и штрафом промежутка 6 или более. См. Dayhoff, M. O., в Atlas of Protein Sequence and Structure, p. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) и дополнение 2 к данному тому, с. 1-10. Две последовательности или их части, более предпочтительно, являются гомологичными, если идентичность их аминокислот составляет ≥50%, при оптимальном выравнивании с применением программы ALIGN. Термин "соответствует" используется в данном описании для обозначения того, что последовательность полинуклеотида гомологична (т.е. идентична, но не связана строго эволюционно) всей или части референтного полинуклеотида, или что последовательность полипептида идентична последовательности референтного полипептида. В противоположность этому, термин "комплементарный" используется в данном описании для обозначения того, что комплементарная последовательность гомологична всей или части последовательности референтного полинуклеотида. Для иллюстрации, нуклеотидная последовательность "TATAC" соответствует референтной последовательности "TATAC" и комплементарна референтной последовательности "GTATA".

Получение антигенсвязывающих белков (например, антител)

В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки (такие как антитела) получают путем иммунизации антигеном (например, PCSK9). В некоторых вариантах антитела могут быть продуцированы путем иммунизации полноразмерным PCSK9, растворимой формой PCSK9, только каталитическим доменом, зрелой формой PCSK9, показанной на фиг. 1A, укороченной вариантной формой PCSK9 или его фрагментом. В некоторых вариантах антитела по изобретению могут быть поликлональными или моноклональными, и/или могут быть рекомбинантными антителами. В некоторых вариантах антитела по изобретению представляют собой человеческие антитела, полученные, например, иммунизацией трансгенных животных, способных к выработке человеческих антител (см., например, опубликованную заявку PCT WO 93/12227).

В некоторых вариантах могут применяться определенные стратегии, чтобы манипулировать присущими антителу свойствами, такими как сродство антитела к его мишени. Такие стратегии включают, не ограничиваясь ими, применение сайт-специфического или случайного мутагенеза молекулы полинуклеотида, кодирующей антитело, чтобы генерировать вариант антитела. В некоторых вариантах такая генерация завершается скринингом вариантов антитела, которые демонстрируют желательное изменение, например повышенное или сниженное сродство.

В некоторых вариантах остатки аминокислоты, являющиеся целью в стратегиях мутагенеза, представляют собой остатки CDR. В некоторых вариантах мишенью служат аминокислоты в каркасных уча-

стках вариабельных доменов. В некоторых вариантах показано, что такие каркасные участки вносят свой вклад в свойства связывания с мишенью некоторых антител. См., например, Hudson, Curr. Opin. Biotech., 9:395-402 (1999) и процитированные в ней ссылки.

В некоторых вариантах получают библиотеки меньшего размера с более эффективным скринингом вариантов антитела путем ограничения случайного или сайт-направленного мутагенеза сайтами гипермутации в CDR, которые представляют собой сайты, соответствующие областям, склонным к мутации в ходе соматического процесса созревания сродства. См., например, Chowdhury & Pastan, Nature Biotech., 17:568-572 (1999) и процитированные в ней ссылки. В некоторых вариантах определенные виды элементов ДНК могут применяться для идентификации сайтов гипермутации, в том числе, но, не ограничиваясь ими, некоторые прямые и обратные повторы, некоторые консенсусные последовательности, некоторые вторичные структуры и некоторые палиндромы. Например, такие элементы ДНК, которые могут применяться для идентификации сайтов гипермутации включают, не ограничиваясь ими, последовательность тетрааснования, содержащую пурин (A или G), с последующим гуанином (G), и далее пиримидин (C или T), с последующим аденозином или тимидином (A или T) (т.е. A/G-G-C/T-A/T). Другой пример элемента ДНК, который может применяться для идентификации сайтов гипермутации, - это кодон серина, A-G-C/T.

Получение полностью человеческих АСБ (например, антител)

В некоторых вариантах техника показа фага применяется для генерации моноклональных антител. В некоторых вариантах такая техника дает полностью человеческие моноклональные антитела. В некоторых вариантах полинуклеотид, кодирующий одинарный Fab или Fv фрагмент антитела, экспрессируется на поверхности частицы фага. См., например, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991); патент США 5885793. В некоторых вариантах проводят "скрининг" фага, чтобы идентифицировать фрагменты антитела, обладающие сродством к мишени. Таким образом, некоторые из этих процессов имитируют иммунную селекцию путем показа репертуаров фрагментов антител на поверхности волокнистого бактериофага и последующей селекции фага по их связыванию с мишенью. В некоторых из таких методик выделены функциональные нейтрализующие фрагменты антител с высоким сродством. В некоторых из таких вариантов (обсуждаемых более подробно ниже), полный репертуар генов человеческих антител создан путем клонирования природным образом реорганизованных генов V человека из лимфоцитов периферической крови. См., например, Mullinax et al., Proc Natl Acad Sci (USA), 87:8095-8099 (1990).

В соответствии с некоторыми вариантами, антитела по изобретению получают с применением трансгенной мыши, организм которой содержит существенную часть вставленного генома, продуцирующего человеческое антитело, но у которой присутствует дефицит выработки эндогенных, мышиных антител. Такие мыши способны к выработке молекул человеческого иммуноглобулина и антител, и не способны к выработке молекул мышиного иммуноглобулина и антител. Технологии, применяемые для достижения данного результата, раскрыты в патентах, заявках и ссылках, приведенных в настоящем описании. В некоторых вариантах можно применять, например, такие способы, как раскрыты в опубликованной заявке PCT WO 98/24893 или в Mendez et al., Nature Genetics, 15:146-156 (1997), которые таким образом включены путем ссылки для любой цели.

В общем, полностью человеческие моноклональные АСБ (например, антитела), специфичные в отношении PCSK9, могут быть получены, как указано ниже. Трансгенных мышей, несущих человеческие гены иммуноглобулина, иммунизируют целевым антигеном, например, PCSK9, и получают лимфатические клетки мышей (например, B-клетки), экспрессирующих антитела. Осуществляют слияние таких выделенных клеток с линией клеток миелоидного типа, чтобы получить бессмертные линии клеток гибридомы, и такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и селекции, чтобы идентифицировать линии клеток гибридомы, которые вырабатывают антитела, специфичные в отношении целевого антигена. В некоторых вариантах предложено получение линии клеток гибридомы, которая вырабатывает антитела, специфичные в отношении PCSK9.

В некоторых вариантах полностью человеческие антитела продуцируют, обеспечивая контакт спленоцитов человека (B- или T-клетки) с антигеном in vitro, с последующим введением таких клеток иммуноскомпрометированной мыши, например, SCID или nod/SCID. См., например, Brams et al., J.Immunol. 160:2051-2058 (1998); Carballido et al., Nat. Med., 6:103-106 (2000). В некоторых из таких подходов, энграфтмент эмбриональной ткани человека мышам SCID (SCID-hu) приводит к длительному гематопоэзу и развитию человеческих T-клеток. См., например, McCune et al., Science, 241:1532-1639 (1988); Ifversen et al., Sem. Immunol., 8:243-248 (1996). В некоторых случаях, гуморальная иммунная реакция у таких химерных мышей зависит от со-развития человеческих T-клеток в организме животных. См., например, Martensson et al., Immunol., 83:1271-179 (1994). В определенных подходах, лимфоциты периферической крови человека пересаживают мышам SCID. См., например, Mosier et al., Nature, 335:256-259 (1988). В некоторых из таких вариантов, если такие пересаженные клетки обрабатывают праймирующим агентом, таким как стафилококковый энтеротоксин A (СЭА), или моноклональными антителами против CD40 человека, обнаружены более высокие уровни выработки B-клеток. См., например, Martensson et al., Immunol., 84:224-230 (1995); Murphy et al., Blood, 86:1946-1953 (1995).

Таким образом, в некоторых вариантах полностью человеческие антитела могут быть продуцирова-

ны экспрессией рекомбинантной ДНК в клетках-хозяевах или экспрессией в клетках гибридомы. В других вариантах антитела могут быть продуцированы с применением методов показа фага, описанных в данном описании.

Антитела, описанные в данном описании, получали с применением технологии XenoMouse®, как описано в данном описании. Такие мыши способны к выработке молекул человеческого иммуноглобулина и антител и не способны к выработке молекул мышиного иммуноглобулина и антител. Технологии, применяемые для достижения такого результата, раскрыты в патентах, заявках и ссылках, приведенных в разделе "Уровень техники" настоящего описания. В частности, однако, предпочтительный вариант получения трансгенных мышей и антител от них раскрыт в патентной заявке США, серийный номер 08/759620, поданной 3 декабря 1996 г., и Международных патентных заявках WO 98/24893, опубликованной 11 июня 1998 г., и WO 00/76310, опубликованной 21 декабря 2000 г., раскрытие которых таким образом включено путем ссылки. См. также Mendez et al., Nature Genetics, 15:146-156 (1997), раскрытие которой таким образом включено путем ссылки.

Посредством применения такой технологии, получены полностью человеческие моноклональные антитела к различным антигенам. По существу, линии мышей XenoMouse® иммунизируют целевым антигеном (например, PCSK9), лимфатические клетки (например, B-клетки) выделяют у гипериммунизированных мышей, и осуществляют слияние выделенных лимфоцитов с линией клеток миелоидного типа, чтобы получить бессмертные линии клеток гибридомы. Такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и селекции, чтобы идентифицировать линии клеток гибридомы, которые вырабатывают антитела, специфичные в отношении целевого антигена. В данном описании предложены способы получения множественных линий клеток гибридомы, которые вырабатывают антитела, специфичные в отношении PCSK9. Кроме того, в данном описании предложена характеристика антител, продуцированных такими линиями клеток, в том числе, анализы последовательности нуклеотидов и аминокислот тяжелых и легких цепей таких антител.

Получение пород мышей XenoMouse® дополнительно обсуждается и иллюстрируется в патентных заявках США, серийный номер 07/466008, поданной 12 января 1990 г., 07/61515, поданной 8 ноября 1990 г., 07/919297, поданной 24 июля 1992 г., 07/922649, поданной 30 июля 1992 г., 08/031801, поданной 15 марта 1993 г., 08/112848, поданной 27 августа 1993 г., 08/234145, поданной 28 апреля 1994 г., 08/376279, поданной 20 января 1995 г., 08/430938, поданной 27 апреля 1995 г., 08/464584, поданной 5 июня 1995 г., 08/464582, поданной 5 июня 1995 г., 08/463191, поданной 5 июня 1995 г., 08/462837, поданной 5 июня 1995 г., 08/486853, поданной 5 июня 1995 г., 08/486857, поданной 5 июня 1995 г., 08/486859, поданной 5 июня 1995 г., 08/462513, поданной 5 июня 1995 г., 08/724752, поданной 2 октября 1996 г., 08/759620, поданной 3 декабря 1996 г., публикации США 2003/0093820, поданной 30 ноября 2001 г., и патентах США 6162963, 6150584, 6114598, 6075181 и 5939598, а также японских патентах 3068180B2, 3068506B2 и 3068507B2. См. также Европейский Патент EP 0463151B1, предоставленный для публикации 12 июня 1996 г., международную патентную заявку WO 94/02602, опубликованную 3 февраля 1994 г., международную патентную заявку WO 96/34096, опубликованную 31 октября 1996 г., WO 98/24893, опубликованную 11 июня 1998 г., WO 00/76310, опубликованную 21 декабря 2000 г. Раскрытие каждого из процитированных выше патентов, заявок и ссылок, таким образом, включено путем ссылки в полном объеме.

В альтернативном подходе, другие, в том числе, GenPharm International, Inc., применяли подход "минилокуса". В подходе минилокуса, экзогенный локус Ig имитируют путем введения фрагментов (индивидуальные гены) локуса Ig. Таким образом, один или более генов V_H, один или более генов D_H, один или более генов J_H, константный участок mu, и, обычно, второй константный участок (предпочтительно, константный участок гамма) формируют конструкт для вставки в организм животного. Данный подход описан в патенте США 5545807, выданном Surani с соавт., и патентах США 5545806, 5625825, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, 5789650, 5814318, 5877397, 5874299 и 6255458, каждый из которых выдан Lonberg и Kay, патентах США 5591669 и 6023010, выданных Krimpenfort и Berns, патентах США 5612205, 5721367 и 5789215, выданных Berns с соавт., и патенте США 5643763, выданном Choi и Dunn, патентных заявках США GenPharm International, серийный номер 07/574748, поданной 29 августа 1990 г., 07/575962, поданной 31 августа 1990 г., 07/810279, поданной 17 декабря 1991 г., 07/853408, поданной 18 марта 1992 г., 07/904068, поданной 23 июня 1992 г., 07/990860, поданной 16 декабря 1992 г., 08/053131, поданной 26 апреля 1993 г., 08/096762, поданной 22 июля 1993 г., 08/155301, поданной 18 ноября 1993 г., 08/161739, поданной 3 декабря 1993 г., 08/165699, поданной 10 декабря 1993 г., 08/209741, поданной 9 марта 1994 г., раскрытие которых таким образом включено путем ссылки. См. также Европейский патент № 0546073B1, международные патентные заявки WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884 и патент США 5981175, раскрытие которых таким образом включено путем ссылки в полном объеме. См. также Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuaillon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonberg et al. (1994), Taylor et al. (1994), и Tuaillon et al. (1995), Fishwild et al. (1996), раскрытие которых таким образом включено путем ссылки в полном объеме.

Kirin также продемонстрировал генерацию человеческих антител мышами, которым были введены,

посредство микроклеточного слияния, большие фрагменты хромосом или полноразмерные хромосомы. См. Европейские патентные заявки 773288 и 843961, раскрытие которых таким образом включено путем ссылки. Дополнительно, получены мыши KM™, которые представляют собой результат скрещивания мышей Tc Kirin с минилокусными мышами Medarex (Humab). Такие мыши несут человеческую трансхромосому IgH мышей Kirin и фтрансгенные цепи каппа мышей Genpharm (Ishida et al., Cloning Stem Cells (2002) 4:91-102).

Человеческие антитела также могут быть получены способами in vitro. Подходящие примеры включают, не ограничиваясь ими, показ фага (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (в прошлом Proliferon), Affimed), показ рибосомы (CAT), показ дрожжей, и т.п.

В некоторых вариантах антитела, описанные в данном описании, содержат тяжелые цепи IgG4 человека, а также тяжелые цепи IgG2. Антитела также могут принадлежать к другим человеческим изотипам, в том числе, IgG1. Антитела обладали высоким сродством, обычно с K_d от около 10^{-6} до около 10^{-13} М или ниже, при измерении различными методами.

Следует понимать, что антитела могут экспрессироваться в других линиях клеток, кроме линий клеток гибридомы. Последовательности, кодирующие конкретные антитела, могут применяться для преобразования подходящей клетки-хозяина млекопитающего. Трансформация может быть осуществлена любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина, в том числе, например, упаковкой полинуклеотида в вирус (или в вирусный вектор) и трансфекцию клетки-хозяина вирусом (или вектором) или методиками трансфекции, известными из уровня техники, например, патенты США 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455 (указанные патенты, таким образом, включены в данное описание путем ссылки). Применяемая методика трансформации зависит от хозяина, который подлежит трансформации. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны из уровня техники и включают опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение кальция фосфатом, опосредованную полибреном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра.

Доступные линии клеток млекопитающих в качестве хозяев для экспрессии хорошо известны из уровня техники и включают множество бессмертных линий клеток, доступных от Американской Коллекции Типовых Культур (АКТК), в том числе, но, не ограничиваясь ими, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HeLa, почечные клетки детенышей хомяка (ВНК), почечные клетки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки почечного эпителия человека 293, и целый ряд других линий клеток. Особенно предпочтительные линии клеток выбирают путем отбора линий клеток с высокими уровнями экспрессии и выработкой антител с конститутивными свойствами связывания с PCSK9.

В некоторых вариантах антитела и/или АСБ продуцирует по меньшей мере одна из следующих гибридом: 21B12, 31H4, 16F12, любые другие гибридомы, приведенные в табл. 2 или раскрыфтые в примерах. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки связываются с PCSK9 с константой диссоциации (K_D) менее чем приблизительно 1 нМ, например от 1000 до 100 пМ, от 100 до 10 пМ, от 10 до 1 пМ и/или от 1 до 0,1 пМ или менее.

В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат молекулу иммуноглобулина по меньшей мере одного из изотипов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD и IgM. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат человеческую легкую цепь каппа и/или человеческую тяжелую цепь. В некоторых вариантах тяжелая цепь относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD или IgM. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки клонированы для экспрессии в клетках млекопитающих. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат другой константный участок, кроме любого из константных участков изотипа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD и IgM.

В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат человеческую легкую цепь лямбда и человеческую тяжелую цепь IgG2. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат человеческую легкую цепь лямбда и человеческую тяжелую цепь IgG4. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат человеческую легкую цепь лямбда и человеческую тяжелую цепь IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD или IgM. В других вариантах антигенсвязывающие белки содержат человеческую легкую цепь каппа и человеческую тяжелую цепь IgG2. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат человеческую легкую цепь каппа и человеческую тяжелую цепь IgG4. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат человеческую легкую цепь каппа и человеческую тяжелую цепь IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD или IgM. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат вариабельные участки антител, лигированные с константным участком, который не является ни константным участком для изотипа IgG2, ни константным участком для изотипа IgG4. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки клонированы для экспрессии в клетках млекопитающих.

В некоторых вариантах консервативные модификации тяжелых и легких цепей антител из по меньшей мере одной из линий гибридомы: 21B12, 31H4 и 16F12 (и соответствующие модификации кодирующих нуклеотидов) будет давать антитела против PCSK9, обладающие функциональными и химическими характеристиками, сходными с антителами из линий гибридомы: 21B12, 31H4 и 16F12. И, наоборот, в некоторых вариантах существенные модификации функциональных и/или химических харак-

теристик антител против PCSK9 могут быть достигнуты путем выбора замен в последовательности аминокислот тяжелых и легких цепей, которые существенно отличаются по их влиянию на сохранение (а) структуры молекулярного скелета основы в области замены, например, как листовой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы на целевом сайте, или (в) большей части боковой цепи.

Например, "консервативная замена аминокислоты" может включать замену природного остатка аминокислоты неприродным остатком, таким образом, что присутствует незначительное или отсутствует влияние на полярность или заряд остатка аминокислоты в данном положении. Кроме того, любой природный остаток в полипептиде также может быть заменен аланином, как было описано ранее для "аланинсканирующего мутагенеза".

Желательные замены (консервативные или неконсервативные) аминокислот могут быть определены специалистом в данной области в то время, когда такие замены будут желательными. В некоторых вариантах замены аминокислот могут применяться для идентификации значимых остатков антител против PCSK9, или повышения или снижения сродства антител к PCSK9, как описано в данном описании.

В некоторых вариантах антитела по настоящему изобретению могут экспрессироваться в других линиях клеток, кроме линий клеток гибридомы. В некоторых вариантах последовательности, кодирующие конкретные антитела, могут применяться для трансформации пригодной клетки-хозяина млекопитающих. В соответствии с некоторыми вариантами, трансформация может быть осуществлена любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина, в том числе, например упаковкой полинуклеотида в вирус (или в вирусный вектор) и трансфекцию клетки-хозяина вирусом (или вектором) или методиками трансфекции, известными из уровня техники, например, патенты США 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455 (указанные патенты, таким образом, включены в данное описание путем ссылки для любой цели). В некоторых вариантах применяемая методика трансформации может зависеть от хозяина, который подлежит трансформации. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны из уровня техники и включают, не ограничиваясь ими, опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение кальция фосфата, опосредованную полибреном трансфекцию, слияние протопласта, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра.

Доступные линии клеток млекопитающих в качестве хозяев для экспрессии хорошо известны из уровня техники и включают множество бессмертных линий клеток, доступных от американской коллекции типовых культур (АКТК), в том числе, но, не ограничиваясь ими, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HeLa, почечные клетки детенышей хомяка (ВНК), почечные клетки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), и целый ряд других линий клеток. В некоторых вариантах линии клеток могут быть выбраны путем отбора линий клеток с высокими уровнями экспрессии и выработкой антител с конститутивными свойствами связывания с фактором роста гепатоцитов (ФРГ). Пригодные векторы экспрессии для клеток-хозяев млекопитающих хорошо известны.

В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки содержат один или более полипептидов. В некоторых вариантах любая из разнообразных систем вектор экспрессии/хозяин может применяться для экспрессии молекул полинуклеотида, кодирующих полипептиды, содержащие один или более компонентов АСБ или непосредственно АСБ. Такие системы включают, не ограничиваясь ими, микроорганизмы, например, бактерии, трансформированные рекомбинантным бактериофагом, плазмиду или космидные векторы экспрессии ДНК; дрожжи, трансформированные дрожжевыми векторами экспрессии; системы клеток насекомых, инфицированные вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирус); системы растительных клеток, трансфицированные вирусными векторами экспрессии (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV, вирус мозаики табака, TMV) или трансформированные бактериальными векторами экспрессии (например, Ti или плазмида pBR322); или системы клеток животных.

В некоторых вариантах полипептид, содержащий один или более компонентов АСБ или непосредственно АСБ, рекомбинантно экспрессируется в дрожжах. В некоторых из таких вариантов используются коммерчески доступные системы экспрессии, например, система экспрессии Pichia (Invitrogen, Сан Диего, Калифорния), в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах такая система зависит от последовательности pre-pro-альфа для направления секреции. В некоторых вариантах транскрипцией вставки управляет промотор алкогольоксидазы (AOX1) в условиях индукции метанолом.

В некоторых вариантах выделенный полипептид, содержащий один или более компонентов АСБ или непосредственно АСБ, очищают из среды культивирования дрожжей. В некоторых вариантах способы, используемые для очистки полипептида из среды культивирования дрожжей, такие же, как применяются для очистки полипептида от супернатантов бактериальных клеток и клеток млекопитающих.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит один или более компонентов АСБ или непосредственно АСБ, клонирована в вектор экспрессии бакуловируса, например, pVL1393 (PharMingen, Сан Диего, Калифорния). В некоторых вариантах такой вектор может применяться согласно указаниям производителя (PharMingen) для инфицирования клеток Spodoptera frugiperda в свободных от белка средах sF9 и выработки рекомбинантного полипептида. В некоторых вариантах полипептид очищают и концентрируют из такой среды с применением колонки гепарин-Сефароза

(Pharmacia).

В некоторых вариантах полипептид, содержащий один или более компонентов АСБ или непосредственно АСБ, экспрессируется в системе насекомого. Некоторые системы насекомого для экспрессии полипептида хорошо известны специалистам в данной области. В одной из таких систем, вирус ядерного полиэдроза Autographa californica (AcNPV) используется в качестве вектора, чтобы экспрессировать чужеродные гены в клетках Spodoptera frugiperda или в личинках Trichoplusia. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, может быть вставлена в несущественный ген вируса, например, в пределах гена полиэдрина, и размещена под контролем промотора для указанного гена. В некоторых вариантах успешная вставка молекулы нуклеиновой кислоты будет удерживать несущественный ген в неактивном состоянии. В некоторых вариантах такая инактивация дает обнаружимую характеристику. Например, инактивация гена полиэдрина приводит к образованию вируса без оболочечного белка.

В некоторых вариантах рекомбинантные вирусы могут применяться для инфицирования клеток S. frugiperda или личинок Trichoplusia. См., например, Smith et al., J. Virol., 46584 (1983); Engelhard et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 91:3224-7 (1994).

В некоторых вариантах полипептиды, содержащие один или более компонентов АСБ или непосредственно АСБ, получают в бактериальных клетках, продуцированными в виде нерастворимых телец включения в бактериях. В некоторых вариантах клетки-хозяева, содержащие такие тельца включения, отделяют центрифугированием; промывают в 0,15 М NaCl, 10 мМ Трис, pH 8, 1 мМ ЭДТА; и обрабатывают 0,1 мг/мл лизоцима (Sigma, St. Louis, MO) в течение 15 мин при комнатной температуре. В некоторых вариантах лизат осветляют ультразвуком, и обломки клеток гранулируют центрифугированием в течение 10 мин со скоростью 12000×g. В некоторых вариантах содержащую полипептид гранулу ресуспендируют в 50 мМ Трис, pH 8, и 10 мМ ЭДТА; наслаивают на 50% глицерин; и центрифугируют в течение 30 мин при 6000×g. В некоторых вариантах такая гранула может быть ресуспендирована в стандартном буферизованном фосфатом солевом растворе (ФБР), свободном от Mg^{++} и Ca^{++}. В некоторых вариантах полипептид дополнительно очищают, фракционируя ресуспендированную гранулу в денатурирующем натрий лаурилсульфат-полиакриламидном геле (см., например, Sambrook с соавт., выше). В некоторых вариантах такой гель может быть пропитан 0,4 М KCl для визуализации белка, который может быть вырезан и электроэлюирован в буфере для анализа на геле, не содержащем натрия лаурилсульфата. В соответствии с некоторыми вариантами, слитый белок глутатион-S-трансфераза (ГСТ) вырабатывается в бактериях как растворимый белок. В некоторых вариантах такой слитый белок ГСТ очищают с применением модуля очистки ГСТ (Pharmacia).

В некоторых вариантах желательно "повторно свернуть" некоторые полипептиды, например, полипептиды, содержащие один или более компонентов АСБ или непосредственно АСБ. В некоторых вариантах такие полипептиды продуцируют с применением некоторых рекомбинантных систем, обсуждаемых в данном описании. В некоторых вариантах полипептиды "повторно сворачивают" и/или окисляют, чтобы сформировать желательную третичную структуру и/или генерировать дисульфидные связи. В некоторых вариантах такая структура и/или связи имеют отношение к определенной биологической активности полипептида. В некоторых вариантах повторное сворачивание осуществляют с применением любой из целого ряда методик, известных из уровня техники. Примеры способов включают, не ограничиваясь ими, контакт с солюбилизирующим полипептид агентом, обычно, при pH выше 7 в присутствии хаотропного агента. Примером хаотропного агента является гуанидин. В некоторых вариантах раствор для повторного сворачивания/окисления также содержит восстанавливающий агент и окисленную форму такого восстанавливающего агента. В некоторых вариантах восстанавливающий агент и его окисленная форма присутствуют в соотношении, которое будет генерировать конкретный редокс-потенциал, позволяющий дисульфидную перетасовку. В некоторых вариантах такая перетасовка позволяет образование цистеиновых мостиков. Пример редокс-пар включает, не ограничиваясь ими, цистеин/цистамин, глутатион/дитиобисглутатион, меди хлорид, дитиотрейтол ДТТ/дитиан ДТТ и 2-меркаптоэтанол (2МЭ)/дитио-2МЭ. В некоторых вариантах, со-растворитель используется для повышения эффективности повторного сворачивания. Примеры сорастворителей включают, не ограничиваясь ими, глицерин, полиэтиленгликоль с различной молекулярной массой и аргинин.

В некоторых вариантах проводят существенную очистку полипептида, содержащего один или более компонентов АСБ или непосредственно АСБ. Некоторые методы очистки белка известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах очистка белка включает фракционирование неочищенного вещества для отделения полипептидных частиц от неполипептидных частиц. В некоторых вариантах полипептиды очищают с применением хроматографических и/или электрофоретических методов. Примеры методов очистки включают, не ограничиваясь ими, осаждение сульфатом аммония; осаждение ПЭГ; иммунопреципитацию; денатурирование нагреванием с последующим центрифугированием; хроматографию, в том числе, но, не ограничиваясь ими, аффинную хроматографию (например, протеин-А-Сефароза), ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию и обращенно-фазовую хроматографию; гель-фильтрацию; хроматографию на гидроксиапатите; изоэлектрическое фокусирование;

электрофорез на полиакриламидном геле; и комбинации указанных и других методов. В некоторых вариантах полипептид очищают быстрой жидкостной хроматографией белка или жидкостной хроматографией с высоким давлением (ВЭЖХ). В некоторых вариантах стадии очистки могут быть модифицированы, или некоторые стадии могут быть опущены, и все же будут давать пригодный способ получения в существенной мере очищенного полипептида.

В некоторых из вариантов количественно определяют степень очистки препарата полипептида. Некоторые способы количественного определения степени очистки известны специалистам в данной области. Некоторые примеры способов включают, не ограничиваясь ими, определение специфической активности связывания препарата и оценку количества полипептида в препарате методом SDS/PAGE. Некоторые примеры способов количественной оценки очистки препарата полипептида включают вычисление активности связывания препарата и сравнение ее с активностью связывания исходного экстракта. В некоторых вариантах результаты такого вычисления выражают как "кратность очистки". Единицы, используемые для количественного представления активности связывания, зависят от конкретного проводимого анализа.

В некоторых вариантах полипептид, содержащий один или более компонентов АСБ или непосредственно АСБ, частично очищен. В некоторых вариантах частичная очистка может быть проведена с применением меньшего количества стадий очистки или различных форм одной и той же общей схемы очистки. Например, в некоторых вариантах катионнообменная колоночная хроматография, проводимая с применением аппаратуры ВЭЖХ, будет, в общем, давать более высокую "кратность очистки", чем такая же методика с применением системы хроматографии с низким давлением. В некоторых вариантах способы, дающие более низкую степень очистки, могут давать преимущество с точки зрения общего выхода полипептида или сохранения у полипептида активности связывания.

В некоторых случаях, электрофоретическая миграция полипептида может варьировать, иногда существенно, при различных условиях SDS/PAGE. См., например, Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Coram., 76:425 (1977). Следует понимать, что в различных условиях электрофореза очевидная молекулярная масса очищенного или частично очищенного полипептида может отличаться.

Примеры эпитопов

Предложены эпитопы, с которыми связываются анти-PCSK9 антитела. В некоторых вариантах эпитопы, с которыми связываются раскрытые в данном описании антитела, являются особенно пригодными. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки, которые связываются с любым из эпитопов, связывающихся с антителами, описанными в данном описании, являются пригодными. В некоторых вариантах эпитопы, связанные с любым из антител, приведенных в табл. 2 и на фиг. 2 и 3, являются особенно пригодными. В некоторых вариантах эпитоп расположен на каталитическом домене PCSK9.

В некоторых вариантах эпитоп PCSK9 может применяться для предупреждения (например, уменьшения) связывания анти-PCSK9 антитела или антигенсвязывающего белка с PCSK9. В некоторых вариантах эпитоп PCSK9 может применяться для уменьшения связывание анти-PCSK9 антитела или антигенсвязывающего белка с PCSK9. В некоторых вариантах эпитоп PCSK9 может применяться, чтобы в существенной мере воспрепятствовать связыванию анти-PCSK9 антитела или антигенсвязывающего белка с PCSK9.

В некоторых вариантах эпитоп PCSK9 может применяться для выделения антител или антигенсвязывающих белков, которые связываются с PCSK9. В некоторых вариантах эпитоп PCSK9 может применяться для генерации антител или антигенсвязывающих белков, которые связываются с PCSK9. В некоторых вариантах эпитоп PCSK9 или последовательность, содержащая эпитоп PCSK9, может применяться в качестве иммуногенного средства для генерации антител или антигенсвязывающих белков, которые связываются с PCSK9. В некоторых вариантах эпитоп PCSK9 можно вводить животному, и антитела, которые связываются с PCSK9, могут быть впоследствии получены от животного. В некоторых вариантах эпитоп PCSK9 или последовательность, содержащая эпитоп PCSK9, может применяться, чтобы воспрепятствовать нормальной опосредованной PCSK9 активности, такой как ассоциация PCSK9 с ЛПНПР.

В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки, раскрытые в данном описании, связываются специфично с N-концевым pro-доменом, субтилизин-подобным каталитическим доменом и/или С-концевым доменом. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок связывается с желобком связывания PCSK-9 с субстратом (описан в Cunningham с соавт., включена в данное описание в полном объеме путем ссылки).

В некоторых вариантах домен(ы)/участок(ки), содержащий остатки, которые находятся в контакте с или скрыты антителом, может быть идентифицирован путем мутации конкретных остатков в PCSK9 (например, антиген дикого типа) и определения того, может ли антигенсвязывающий белок связываться с мутантным или вариантным белком PCSK9. Путем создания ряда индивидуальных мутаций, могут быть идентифицированы остатки, которые играют прямую роль в связывании или которые находятся в достаточной близости к антителу, таким образом, что мутация может повлиять на связывание между антигенсвязывающим белком и антигеном. Определение таких аминокислот может пролить свет на домен(ы) или участок(ки) антигена, которые содержат остатки в контакте с антигенсвязывающим белком или покрытые антителом. Такой домен может содержать эпитоп связывания с антигенсвязывающим белком. В

одном из конкретных примеров данного общего подхода используется протокол сканирования аргинина/глутаминовой кислоты (см., например, Nanevicz, T., et al., 1995, J. Biol. Chem., 270:37, 21619-21625 и Zupnick, A., et al., 2006, J. Biol. Chem., 281:29, 20464-20473). В целом, аргинином и глутаминовой кислотой заменяют (обычно, индивидуально) аминокислоты в полипептиде дикого типа, поскольку данные аминокислоты заряжены и громоздки, и, таким образом обладают потенциалом разрушения связывания между антигенсвязывающим белком и антигеном на участке антигена, где осуществлена мутация. Остатки аргинина, которые присутствуют в антигене дикого типа, заменяют глутаминовой кислотой. Получают спектр таких индивидуальных мутантов, и полученные результаты связывания анализируют с целью определения того, какие остатки влияют на связывание.

Модификация (например, уменьшение или увеличение) связывания между антигенсвязывающим белком и вариантом PCSK9 в данном описании означает, что присутствует изменение сродства связывания (например, измеренное известными методами, такими как испытания Biacore или анализ на основе гранул, описанные в примерах ниже), EC_{50} и/или изменение (например, уменьшение) общей емкости связывания антигенсвязывающего белка (например, по данным уменьшения Bmax на графике концентрации антигенсвязывающего белка против концентрации антигена).

Существенное изменение связывания указывает на то, что мутантный остаток непосредственно участвует в связывание с антигенсвязывающим белком или находится в достаточной близости к связывающему белку, когда связывающий белок связывается с антигеном.

В некоторых вариантах существенное уменьшение связывания означает, что сродство связывания, EC_{50} и/или емкость между антигенсвязывающим белком и мутантным антигеном PCSK9 снижена более чем на 10%, больший чем 20%, более чем на 40%, более чем на 50%, более чем на 55%, более чем на 60%, более чем на 65%, более чем на 70%, более чем на 75%, более чем на 80%, более чем на 85%, более чем на 90% или более чем на 95%, относительно связывания между антигенсвязывающим белком и PCSK9 дикого типа (например, показанным в SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: (303). В некоторых вариантах связывание уменьшается ниже пределов обнаружения. В некоторых вариантах говорят о существенном уменьшении связывания, если связывание антигенсвязывающего белка с вариантом белка PCSK9 составляет менее чем 50% (например, менее чем 40, 35, 30, 25, 20, 15 или 10%) от связывания, наблюдаемого между антигенсвязывающим белком и белком PCSK9 дикого типа (например, белок SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 303). Такие измерения связывания могут быть проведены с применением различных анализов связывания, известных из уровня техники.

В некоторых вариантах предложены антигенсвязывающие белки, которые демонстрируют существенное снижение связывания с вариантом белка PCSK9, в котором остаток в белке PCSK9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303) заменен аргинином или глутаминовой кислотой. В некоторых вариантах связывание антигенсвязывающего белка существенно уменьшено или увеличено для варианта белка PCSK9, содержащего любую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 244) из следующих мутаций: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R, E582R, D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R и Q554R, по сравнению с белком PCSK9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303). В краткой нотации, используемой в данном описании, формат является следующим: остаток дикого типа: положение в полипептиде: мутантный остаток, с нумерацией остатков, как показано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303.

В некоторых вариантах связывание антигенсвязывающего белка существенно уменьшено или увеличено для мутантного белка PCSK9, содержащего одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более) мутаций в следующих положениях: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 и 554, как показано в SEQ ID NO: 1, по сравнению с белком PCSK9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303). В некоторых вариантах связывание антигенсвязывающего белка уменьшено или увеличено для мутантного белка PCSK9, содержащего одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, или более) мутаций в следующих положениях: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 и 554, как показано в SEQ ID NO: 1, по сравнению с белком PCSK9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303). В некоторых вариантах связывание антигенсвязывающего белка в существенной мере уменьшено или увеличено для мутантного белка PCSK9, содержащего одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более) мутаций в следующих положениях: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 и 554, в пределах SEQ ID NO: 1, по сравнению с белком PCSK9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303.

В некоторых вариантах связывание с АСБ существенно уменьшено или увеличено для мутантного белка PCSK9, содержащего одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, и т.п.) из следующих мутаций: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R, E582R, D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R и Q554R в пределах SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303, по сравнению с белком PCSK9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303).

В некоторых вариантах связывание с АСБ существенно уменьшено или увеличено для мутантного белка PCSK9, содержащего одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, и т.п.) из следующих мутаций: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R и E582R в пределах SEQ ID

NO: 1 или SEQ ID NO: 303, по сравнению с белком PCSK9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303). В некоторых вариантах связывание уменьшено. В некоторых вариантах уменьшение связывания наблюдается как изменение EC_{50}. В некоторых вариантах изменение EC50 представляет собой увеличение численного значения EC_{50} (и таким образом представляет уменьшение связывания).

В некоторых вариантах связывание с АСБ существенно уменьшено или увеличено для мутантного белка PCSK9, содержащего одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, и т.п.) из следующих мутаций: D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R и Q554R в пределах SEQ ID NO: 1, по сравнению с белком PCSK9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303). В некоторых вариантах связывание уменьшено. В некоторых вариантах уменьшение связывания наблюдается как изменение Bmax. В некоторых вариантах сдвиг Bmax представляет уменьшение максимального сигнала, генерируемого АСБ. В некоторых вариантах для аминокислоты, которая является частью эпитопа, значение Bmax снижено по меньшей мере на 10%, например, снижение по меньшей мере на любую из следующих величин: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 или 100% может, в некоторых вариантах, указывать на то, что остаток является частью эпитопа.

Хотя на приведенные непосредственно выше варианты ссылаются относительно последовательности дикого типа, показанной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303, следует понимать, что в аллельном варианте PCSK9 аминокислота в указанном положении может отличаться. Антигенсвязывающие белки, демонстрирующие существенно более низкое связывание с такими аллельными формами PCSK9, также предусмотрены. Соответственно, в некоторых вариантах любой из упомянутых выше вариантов может скорее сравниваться с аллельной последовательностью, чем исключительно с последовательностью дикого типа, показанной на фиг. 1А.

В некоторых вариантах связывание антигенсвязывающего белка существенно уменьшено для варианта белка PCSK9, в котором остаток в выбранном положении белка PCSK9 дикого типа мутирован до любого другого остатка. В некоторых вариантах данного описания описанные замены аргинина/глутаминовой кислоты используются для идентифицированных положений. В некоторых вариантах аланин используется для идентифицированных положений.

Как отмечалось выше, остатки, непосредственно принимающие участие в связывании или покрытые антигенсвязывающим белком, могут быть идентифицированы на основе результатов сканирования. Такие остатки могут, таким образом, обеспечить указание на домены или участки SEQ ID NO: 1 (или SEQ ID NO: 303 или SEQ ID NO: 3), которые содержат участок(и) связывания, с которым связываются антигенсвязывающие белки. Как можно увидеть из результатов, суммированных в примере 39, в некоторых вариантах антигенсвязывающий белок связывается с областью, содержащей по меньшей мере одну из аминокислот: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 и 554 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок связывается с участком, содержащим по меньшей мере одну из аминокислот 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 и 554 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок связывается с участком, содержащим по меньшей мере одну из аминокислот 162, 164, 167, 207 и/или 208 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303. В некоторых вариантах более чем один (например, 2, 3, 4, или 5) из идентифицированных остатков представляют собой часть участка, который связывается с АСБ. В некоторых вариантах АСБ конкурирует с АСБ 21B12.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок связывается с участком, содержащим по меньшей мере одну из аминокислоты 185 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303. В некоторых вариантах АСБ конкурирует с АСБ 31H4.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок связывается с участком, содержащим по меньшей мере одну из аминокислот 439, 513, 538 и/или 539 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303. В некоторых вариантах более чем один (например, 2, 3 или 4) из идентифицированных остатков представляет собой часть участка, который связывается с АСБ. В некоторых вариантах АСБ конкурирует с АСБ 31A4.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок связывается с участком, содержащим по меньшей мере одну из аминокислот 123, 129, 311, 313, 337, 132, 351, 390 и/или 413 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303. В некоторых вариантах более чем один (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9) из идентифицированных остатков представляет собой часть участка, который связывается с АСБ. В некоторых вариантах АСБ конкурирует с АСБ 12H11.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок связывается с участком, содержащим по меньшей мере одну из аминокислот 582, 519, 521 и/или 554 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303. В некоторых вариантах более чем один (например, 2, 3 или 4) из идентифицированных остатков представляет собой часть участка, который связывается с АСБ. В некоторых вариантах АСБ конкурирует с АСБ 3C4.

В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки связываются с вышеописанными участками в пределах фрагмента или полноразмерной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303. В других вариантах антигенсвязывающие белки связываются с полипептидами, состоящими из таких участков. Ссылка на "SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 303" означает, что одна или обе из этих последовательно-

стей могут применяться или уместны. Выражение не означает, что следует использовать только одну.

Как отмечается выше, в вышеизложенном описании конкретные положения аминокислот приведены со ссылкой на SEQ ID NO: 1. Однако, в описании в целом, ссылка сделана на домен Pro/Cat, который начинается в положении 31, предложенном в SEQ ID NO: 3. Как отмечается ниже, в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 303 отсутствует сигнальная последовательность PCSK9. Таким образом, любое сравнение между этими различными раскрытиями должно принимать во внимание данную разницу в нумерации. В частности, любое положение аминокислоты в SEQ ID NO: 1, будет соответствовать положению аминокислоты на 30 аминокислот дальше в белке SEQ ID NO: 3. Например, положение 207 SEQ ID NO: 1 соответствует положению 237 SEQ ID NO: 3 (полноразмерная последовательность и система нумерации, в общем используемая в настоящем описании). Табл. 39.6 в общих чертах показывает, как отмеченные выше положения со ссылкой на SEQ ID NO: 1 (и/или SEQ ID NO: 303) соответствуют SEQ ID NO: 3 (которая содержит сигнальную последовательность). Таким образом, любой из отмеченных выше вариантов, которые описаны со ссылкой на SEQ ID NO: 1 (и/или SEQ ID NO: 303), описан со ссылкой на SEQ ID NO: 3 соответствующими отмеченными положениями.

В некоторых вариантах АСБ 21B12 связывается с эпитопом, содержащим остатки 162-167 (например, остатки D162-E 167 SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах АСБ 12H11 связывается с эпитопом, который содержит остатки 123-132 (например, S123-T132 SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах АСБ 12H11 связывается с эпитопом, который содержит остатки 311-313 (например, A311-D313 SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах АСБ могут связываться с эпитопом, содержит любую из последовательностей этих цепей.

Конкурирующие антигенсвязывающие белки

В другом аспекте предложены антигенсвязывающие белки, которые конкурируют с одним из примеров антител или функциональных фрагментов, связывающихся с эпитопом, описанному в данном описании, за специфическое связывание с PCSK9. Такие антигенсвязывающие белки могут также связываться с тем же эпитопом, что и один из приведенных в данном описании в качестве примера антигенсвязывающих белков, или с частично перекрывающимся эпитопом. Ожидается, что антигенсвязывающие белки и фрагменты, которые конкурируют или связываются с тем же эпитопом, что и приведенные в качества примера антигенсвязывающие белки, будут демонстрировать подобные функциональные свойства. Приведенные в качестве примера антигенсвязывающие белки и фрагменты включают описанные выше, в том числе, содержащие тяжелые и легкие цепи, домены вариабельных участков и CDR, проиллюстрированные в табл. 2 и/или на фиг. 2-3. Таким образом, в качестве конкретного примера, предложенные антигенсвязывающие белки включает такие, которые конкурируют с антителом или антигенсвязывающим белком, содержащим:

(а) все 6 CDR, перечисленные для антитела, приведенного на фиг. 2-3;

(б) VH и VL, перечисленные для антитела, приведенного в табл. 2; или

(в) две легкие цепи и две тяжелые цепи, как определено для антитела, приведенного в табл. 2.

Терапевтические фармацевтические композиции и введение

В настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие белки против PCSK9. В данном описании "фармацевтическая композиция (препарат)" - это стерильная композиция фармацевтически активного лекарственного средства, а именно по меньшей мере одного антигенсвязывающего белка против PCSK9, которая пригодна для парентерального введения (в том числе, но, не ограничиваясь ими, внутривенного, внутримышечного, подкожного, аэрозольного, внутрилегочного, интраназального или интратекального) больному, нуждающемуся в этом, и содержит только фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, разбавители и другие добавки, признанные безопасными Федеральным Управлением Лекарственных Средств или национальными ведомствами других стран. Фармацевтические композиции включают жидкость, например, водные растворы, которые могут быть введены непосредственно, и лиофилизированные порошки, которые могут быть разбавлены с получением растворов путем добавления разбавителя перед введением. Конкретно исключены из контекста термина "фармацевтическая композиция (препарат)" композиции для местного применения у больных, композиции для приема внутрь и композиции для парентерального питания.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция представляет собой стабильную фармацевтическую композицию. В данном описании выражения "стабильная фармацевтическая композиция (препарат)", "стабильная композиция (препарат)" или "фармацевтическая композиция (препарат) является стабильной" обозначают фармацевтическую композицию биологически активных белков, которая демонстрирует повышенную агрегацию и/или сниженную потерю биологической активности не более чем 5% в условиях хранения при 2-8°C, по меньшей мере в течение 1, или 2, или 3, или 6 месяцев, или 1 года, или 2 лет, по сравнению с контрольным образцом композиции. Стабильность композиции может быть легко определена специалистом в данной области с применением любого количества стандартных анализов, в том числе, но, не ограничиваясь ими, эксклюзионной ВЭЖХ ("ЭК-ВЭЖХ"), катионообменной ВЭЖХ (КО-ВЭЖХ), обнаружением микроскопических частиц по рассеиванию света ("HIAC") и/или визуальной проверкой.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит любой из антигенсвязывающих

белков против PCSK9, проиллюстрированных в табл. 2 и на фиг. 2 и/или 3 и фиг. 48A и 48B. В некоторых других вариантах фармацевтическая композиция может содержать другие антигенсвязывающие белки против PCSK9; а именно, антитело, состоящее из вариабельного домена легкой цепи, SEQ ID NO: 588, и вариабельного домена тяжелой цепи, SEQ ID NO: 589. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит любой из 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 или 8A1.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит более чем один другой антигенсвязывающий белок против PCSK9. В некоторых вариантах фармацевтические композиции содержат более чем один антигенсвязывающий белок против PCSK9, причем антигенсвязывающие белки против PCSK9 связываются более чем с одним эпитопом. В некоторых вариантах различные антигенсвязывающие белки не будут конкурировать друг с другом за связывание с PCSK9. В некоторых вариантах любые из антигенсвязывающих белков, проиллюстрированных в табл. 2 и на фиг. 2 и/или 3 могут быть объединены в фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 и/или терапевтическая молекула соединены с носителем, увеличивающим период полувыведения, который известен в данной области. Такой носитель включает, не ограничиваясь ими, полиэтиленгликоль, гликоген (например, гликозилирование АСБ) и декстран. Такой носитель описан, например, в заявке США, серийный номер 09/428,082, в настоящее время патент США 6660843, и опубликованной заявке PCT WO 99/25044, которые таким образом включены путем ссылки для любой цели.

В некоторых вариантах приемлемые материалы композиции предпочтительно нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях. В некоторых вариантах материал(ы) композиции предназначены для п/к и/или в/в введения. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит материалы композиции для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции.

В некоторых вариантах подходящие материалы композиции включают, не ограничиваясь ими, аминокислоты (например, пролин, аргинин, лизин, метионин, таурин, глицин, глутамин или аспарагин); противомикробные вещества; антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, натрия сульфит или натрия гидросульфит); буферы (например, борат, бикарбонат, натрия фосфат ("NaOAC"), Трис-HCl, буфер Трис, цитраты, фосфатный буфер, буферизованный фосфатом солевой раствор (т.е. буфер ФБР) или другие органические кислоты); наполнители (например, маннит или глицин); хелатные агенты (например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразующие агенты (например, кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (например, глюкоза, сахароза, фруктоза, лактоза, манноза, трегалоза или декстрины); белки (например, альбумин сыворотки, желатин или иммуноглобулины); красители, вкусовые добавки и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (например, поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (например, натрий); консерванты (например, бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (например, глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (например, маннит или сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или увлажнители (например, плюроники, ПЭГ, эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); агенты для повышения стабильности (например, сахароза или сорбит); агенты для увеличения тоничности (например, галогениды щелочных металлов, предпочтительно, натрия или калия хлорид, маннит, сорбит); растворитель для введения; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адъюванты. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995).

В некоторых вариантах оптимальная фармацевтическая композиция будет определена специалистом в данной области в зависимости от, например, предусмотренного способа введения, формата введения и желательных доз. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, выше. В некоторых вариантах такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения in vivo и скорость клиренса антител по изобретению in vivo.

В одном из аспектов фармацевтическая композиция содержит высокие концентрации антигенсвязывающего белка против PCSK9. В некоторых вариантах интервал концентрации АСБ составляет от около 70 до около 250 мг/мл, например, около 70 мг/мл, около 80 мг/мл, около 90 мг/мл, около 100 мг/мл, около 100 мг/мл, около 120 мг/мл, около 130 мг/мл, около 140 мг/мл, около 150 мг/мл, около 160 мг/мл, около 170 мг/мл, около 180 мг/мл, около 190 мг/мл, около 200 мг/мл, около 210 мг/мл, около 220 мг/мл, около 230 мг/мл, около 240 мг/мл или около 250 мг/мл, и, в том числе, все значения между ними. В некоторых вариантах концентрация 21B12, 26H5 или 31H4 находится в интервале от около 100 мг/мл до около 150 мг/мл, например, 100 мг/мл, около 100 мг/мл, около 120 мг/мл, около 130 мг/мл, около 140 мг/мл или около 150 мг/мл. В некоторых вариантах концентрация 8A3, 11F1 или 8A1 варьирует от около 140 мг/мл до около 220 мг/мл, например, 140 мг/мл, около 150 мг/мл, около 160 мг/мл, около 170 мг/мл, около 180 мг/мл, около 190 мг/мл, около 200 мг/мл, около 210 мг/мл, около 220 мг/мл или около 250 мг/мл.

В другом аспекте фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один буферизующий агент, такой как, например, натрия ацетат, натрия хлорид, фосфаты, буферизованный фосфатом солевой раствор ("ФБР") и/или буфер Трис, pH около 7,0-8,5. Буфер служит для поддержания физиологически приемлемого значения pH. Кроме того, буфер может служить целям повышения изотоничности и химической стабильности фармацевтической композиции. В некоторых вариантах содержание буферизующего агента варьирует от около 0,05 мМ до около 40 мМ, например, около 0,05 мМ, около 0,1 мМ, около 0,5 мМ, около 1,0 мМ, около 5,0 мМ, около 10 мМ, около 15 мМ, около 20 мМ, около 30 мМ, около 40 мМ, около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ, или около 100 нМ буферизующего агента, включая все значения между ними. В некоторых вариантах буферизующий агент представляет собой NaOAC. Примеры значений pH фармацевтической композиции включают от около 4 до около 6, или от около 4,8 до около 5,8, или от около 5,0 до около 5,2, или около 5, или около 5,2.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция является изотонической, с осмоляльностью в пределах от около 250 до около 350 мОсм/кг, например, около 250 мОсм/кг, около 260 мОсм/кг, около 270 мОсм/кг, около 280 мОсм/кг, около 290 мОсм/кг, около 300 мОсм/кг, около 310 мОсм/кг, около 320 мОсм/кг, около 330 мОсм/кг, около 340 мОсм/кг или около 350 мОсм/кг, и в том числе все значения между ними. В данном описании "осмоляльность" представляет собой меру соотношения растворимых веществ к объему жидкости. Другими словами, это количество молекул и ионов (или молекул) на кг раствора. Осмоляльность может быть измерена на аналитическом приборе под названием осмометр, таком как осмометр Advanced Instruments 2020 Multi-sample, Norwood, Массачусетс. Осмометр Advanced Instruments 2020 Multi-sample измеряет осмоляльность с применением метода снижения точки замерзания. Чем выше содержание осмолитов в растворе, тем ниже снижается температура, при которой он замерзает. Осмоляльность также можно измерить с применением любых других методов и в любых других единицах, известных из уровня техники, например, линейной экстраполяцией.

Еще в одном аспекте фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, в том числе, но, не ограничиваясь ими, Полисорбат-80, Полисорбат-60, Полисорбат-40 и Полисорбат-20. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, варьирующей от около 0,004 до около 10% мас./об. ("мас./об.") композиции, например, около 0,004%, около 0,005%, около 0,006%, около 0,007%, около 0,008%, около 0,009%, около 0,01%, около 0,05%, около 0,1%, около 0,5%, около 1%, около 5%, или около 10% мас./об. поверхностно-активного вещества в композиции. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит полисорбат 80 в концентрации, варьирующей от около 0,004 до около 0,1% мас./об. композиции. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит полисорбат 20 в концентрации, варьирующей от около 0,004 до около 0,1% мас./об. композиции.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один стабилизирующий агент, например, полигидроксиуглеводород (в том числе, но, не ограничиваясь ими, сорбит, маннит, глицерин и дульцит) и/или дисахарид (в том числе, но, не ограничиваясь ими, сахарозу, лактозу, мальтозу и трегалозу) и/или аминокислоту (в том числе, но, не ограничиваясь ими, пролин, аргинин, лизин, метионин и таурин) и/или бензиловый спирт; общее содержание указанного полигидроксиуглеводорода и/или дисахарида и/или аминокислоты и/или бензилового спирта составляет от около 0,5 до около 10% мас./об. композиции. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент в концентрации около 1%, около 2%, около 3%, около 4%, около 5%, около 6%, около 7%, около 8%, около 9% или около 10% сахарозы. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент в концентрации около 5% сахарозы. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент в концентрации около 1%, около 2%, около 3%, около 4%, около 5%, около 6%, около 7%, около 8%, около 9% или около 10% сорбиталя. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент в концентрации около 9% сорбиталя. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент в концентрации около 1%, около 2%, около 3%, около 4%, около 5% пролина, аргинина, лизина, метионина и/или таурина. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент в концентрации в интервале около 2-3% пролина. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент в концентрации около 1%, около 2%, около 3%, около 4%, около 5% бензилового спирта. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент в концентрации в интервале около 1-2% бензилового спирта.

В одном из аспектов фармацевтическая композиция обладает вязкостью на уровне менее чем около 30 сантипуаз (сП), измеренной при комнатной температуре (т.е. 25°C). В данном описании "вязкость" представляет собой сопротивление жидкости вытеканию, и может быть измерена в единицах сантипуазы (сП) или миллипаскаль-с (мПа-с), причем 1 сП=1 мПа-с, при заданной скорости сдвига. Вязкость может быть измерена с применением вискозиметра, например, Brookfield Engineering Dial Reading Viscometer, модель LVT. Вязкость также может быть измерена с применением любых других способов и в любых других единицах, известных из уровня техники (например, абсолютная, кинематическая или динамическая вязкость или абсолютная вязкость). В некоторых вариантах уровень вязкости фармацевтической композиции составляет менее чем около 25, около 20, около 18, около 15, около 12, около 10, около 8,

около 6, около 4, около 2 или около 1 сП.

В одном из аспектов фармацевтическая композиция является стабильной по данным измерения по меньшей мере с помощью одного анализа стабильности, известного специалисту в данной области, например, анализа, в котором исследуют биофизические или биохимические характеристики биологически активных белков во времени. Как упомянуто выше, стабильная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию биологически активных белков, которые демонстрируют повышенную агрегацию и/или уменьшенное снижение биологической активности не более чем 5%, в условиях хранения при 2-8°C, по меньшей мере в течение 1, или 2, или 3, или 6 месяцев, или 1 года, или 2 лет, по сравнению с контрольным образцом композиции. В некоторых вариантах стабильность фармацевтической композиции измеряют с применением эксклюзионной ВЭЖХ ("ЭК-ВЭЖХ"). ЭК-ВЭЖХ разделяет белки на основании их отличий в гидродинамических объемах. Молекулы с большим гидродинамическим объемом белков элюируются раньше, чем молекулы с меньшими объемами. В случае ЭК-ВЭЖХ, стабильная фармацевтическая композиция должна продемонстрировать увеличение содержания высокомолекулярных форм не более чем на 5%, по сравнению с контрольной выборкой. В некоторых других вариантах фармацевтическая композиция должна продемонстрировать увеличение содержания высокомолекулярных форм не более 4%, не более 3%, не более 2%, не более 1%, не более 0,5%, по сравнению с контрольной выборкой.

В некоторых вариантах стабильность фармацевтической композиции измеряют с применением катионообменной ВЭЖХ (КО-ВЭЖХ). КО-ВЭЖХ разделяет белки на основании отличий их поверхностного заряда. При установленном значении pH, заряженные изоформы анти-PCSK9 АСБ разделяют на катионообменной колонке и элюируют с применением градиента соли. Элюент контролируют по УФ-поглощению. Распределение заряженной изоформы оценивают, определяя площадь пика каждой изоформы как процент общей площади пика. В случае КО-ВЭЖХ, стабильная фармацевтическая композиция должна продемонстрировать уменьшение не более чем на 5% основного пика изоформы по сравнению с контрольной выборкой. В некоторых других вариантах, стабильная фармацевтическая композиция должна продемонстрировать уменьшение не более чем на 3-5% основного пика изоформы по сравнению с контрольной выборкой. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция должна продемонстрировать уменьшение не более чем на 4%, уменьшение не более чем на 3%, уменьшение не более чем на 2%, уменьшение не более чем на 1%, уменьшение не более чем на 0,5% основного пика изоформы по сравнению с контрольной выборкой.

В некоторых вариантах стабильность фармацевтической композиции измеряют, с применением обнаружение микроскопических частиц по рассеиванию света ("HIAC"). Электронная система подсчета частиц в жидкости (HIAC/Royco 9703 или эквивалентная), оборудованная датчиком рассеивания света (HIAC/Royco HRLD-150 или эквивалентным) с устройством для отбора образцов жидкости определяет количество частиц и интервал их размера в данном исследуемом образце. Если частицы в жидкости проходят между источником света и детектором, они уменьшают или "затемняют" пучок света, который падает на детектор. Если концентрация частиц находится в пределах нормального интервала датчика, такие частицы обнаруживают по одной. Прохождение каждой частицы через зону обнаружения уменьшает свет, который падает на фотодетектор, и напряжение на выходе фотодетектора немедленно снижается. Изменения напряжения регистрируют как электрические импульсы, которые прибор переводит в количество присутствующих частиц. Метод является неспецифическим, и измеряет частицы независимо от их происхождения. Контролируемые размеры частицы составляют, в общем, 10 мкм и 25 мкм. В случае HIAC, стабильная фармацевтическая композиция должна продемонстрировать не более 6000 частиц размером 10 мкм на контейнер (или единицу), по сравнению с контрольной выборкой. В некоторых вариантах стабильная фармацевтическая композиция должна продемонстрировать не более 5000, не более 4000, не более 3000, не более 2000, не более 1000 частиц размером 10 мкм на контейнер (или единицу), по сравнению с контрольной выборкой. В других вариантах стабильная фармацевтическая композиция должна продемонстрировать не более 600 частиц размером 25 мкм на контейнер (или единицу), по сравнению с контрольной выборкой. В некоторых вариантах стабильная фармацевтическая композиция должна продемонстрировать не более 500, не более 400, не более 300, не более 200, не более 100, не более 50 частиц размером 25 мкм на контейнер (или единицу), по сравнению с контрольной выборкой.

В некоторых вариантах стабильность фармацевтической композиции измеряют с применением визуальной оценки. Визуальная оценка представляет собой качественный метод, используемый для описания видимых физических характеристик образца. Образец рассматривают против черного фона и/или белого фона в камере для проверки, в зависимости от оцениваемой характеристики (например, цвет, прозрачность, присутствие частиц или инородного вещества). Образцы также рассматривают против референтного стандарта опалесценции и референтных стандартов цветности. В случае визуальной оценки, стабильная фармацевтическая композиция не должна демонстрировать существенного изменения цвета, прозрачности, присутствия частиц или инородного вещества, по сравнению с контрольной выборкой.

Одним из аспектов настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, которая содержит: (i) от около 70 мг/мл до около 250 мг/мл антигенсвязывающего белка против PCSK9; (ii) от около 0,05 мМ до около 40 мМ буфера, такого как натрия ацетат ("NaOAC") в роли буферизующего агент;

(iii) от около 1 до около 5% пролина, аргинина, лизина, метионина или таурина (также известного, как 2-аминоэтансульфоновая кислота) и/или от 0,5 до около 5% бензилового спирта, который служит стабилизирующим агентом; и (iv) от около 0,004 до около 10% мас./об. композиции неионного поверхностно-активного вещества (в том числе, но, не ограничиваясь ими, Полисорбата-80, Полисорбата-60, Полисорбата-40 и Полисорбата-20); причем pH указанной композиции находится в интервале от около 4,0 до 6,0. В некоторых других вариантах фармацевтические композиции по данному изобретению содержат (i) по меньшей мере около 70 мг/мл, около 100 мг/мл, около 120 мг/мл, около 140 мг/мл, около 150 мг/мл, около 160 мг/мл, около 170 мг/мл, около 180 мг/мл, около 190 мг/мл, около 200 мг/мл анти-PCSK9 антитела; (ii) около 10 мМ NaOAC; (iii) около 0,01% полисорбата 80; и (iv) около 2-3% пролина (или от около 250 мМ до около 270 мМ пролина), притом, что pH композиции составляет около 5. В некоторых других вариантах фармацевтические композиции по данному изобретению содержат (i) по меньшей мере около 70 мг/мл, около 100 мг/мл, около 120 мг/мл, около 140 мг/мл анти-PCSK9 антитела, 21B12, 26H5 и/или 31H4; (ii) около 10 мМ NaOAC; (iii) около 0,01% полисорбата 80; и (iv) около 2-3% пролина (или от около 250 мМ до около 270 мМ пролина), притом, что pH композиции составляет около 5. В некоторых других вариантах, фармацевтические композиции по данному изобретению содержат (i) по меньшей мере около 150 мг/мл, около 160 мг/мл, около 170 мг/мл, около 180 мг/мл, около 190 мг/мл, около 200 мг/мл анти-PCSK9 антитела, 8A3, 11F1 и/или 8A1; (ii) около 10 мМ NaOAC; (iii) около 0,01% полисорбата 80; и (iv) около 2-3% пролина (или от около 250 мМ до около 270 мМ пролина), притом, что pH композиции составляет около 5.

Одним из аспектов настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, которая содержит (i) по меньшей мере от около 70 до около 250 мг/мл анти-PCSK9 антитела; (ii) от около 5 до около 20 мМ буфера, например, NaOAC; (iii) от около 1 до около 10% мас./об. композиции полигидроксиуглеводорода, например, сорбита, или дисахарида, например, сахарозы; и (iv) от около 0,004 до около 10% мас./об. композиции поверхностно-активного вещества, например, полисорбата 20 или полисорбата 80; причем pH указанной композиции составляет около от 4,8 до 5,8; притом, что фармацевтическая композиция необязательно содержит от около 80 до около 300 мМ пролина, аргинина, лизина, метионина или таурина и/или от 0,5 до около 5% бензилового спирта, который служит цели снижения вязкости. В некоторых других вариантах фармацевтические композиции по данному изобретению содержат (i) по меньшей мере от около 70 мг/мл до около 250 мг/мл анти-PCSK9 антитела; (ii) около 10 мМ NaOAC; (iii) около 9% сахарозы; и (iv) около 0,004% полисорбата 20, причем pH композиции составляет около 5,2. В некоторых других вариантах фармацевтические композиции по данному изобретению содержат (i) по меньшей мере около 70 мг/мл, около 100 мг/мл, около 120 мг/мл, около 140 мг/мл, около 160 мг/мл, около 180 мг/мл, около 200 мг/мл анти-PCSK9 антитела; (ii) около 15 мМ NaOAC; (iii) около 9% сахарозы; и (iv) около 0,01% полисорбата 20, притом, что pH композиции составляет около 5,2. В некоторых других вариантах фармацевтические композиции по данному изобретению содержат (i) по меньшей мере около 70 мг/мл, около 100 мг/мл, около 120 мг/мл, около 140 мг/мл, около 160 мг/мл, около 180 мг/мл, около 200 мг/мл анти-PCSK9 антитела; (ii) около 20 мМ NaOAC; (iii) около 9% сахарозы; и (iv) около 0,01% полисорбата 20, причем pH композиции составляет около 5,2. В некоторых других вариантах фармацевтические композиции по данному изобретению содержат (i) по меньшей мере около 70 мг/мл, около 100 мг/мл, около 120 мг/мл, около 140 мг/мл, около 160 мг/мл, около 180 мг/мл, около 200 мг/мл анти-PCSK9 антитела; (ii) около 10 мМ NAOAC; (iii) около 9% сахарозы; (iv) около 0,01% полисорбата 80; и (v) около 250 мМ пролина, причем pH композиции составляет около 5.

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими средствами. В некоторых вариантах комбинированная терапия включает антигенсвязывающий белок, способный к связыванию с PCSK9, в комбинации по меньшей мере с одним антихолестеринемическим средством. Средства включают, не ограничиваясь ими, полученные in vitro синтетические химические композиции, антитела, антигенсвязывающие участки, а также их комбинации и конъюгаты. В некоторых вариантах агент может действовать как агонист, антагонист, аллостерический модулятор или токсин. В некоторых вариантах действие агента может заключаться в ингибировании или стимуляции мишени (например, активация или ингибирование рецептора или фермента), и таким образом содействии повышению экспрессии ЛПНПР или снижению уровней холестерина в сыворотке.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 может вводиться до, одновременно с и после лечения средством для снижения уровня холестерина (в сыворотке и/или общего холестерина). В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 можно вводить профилактически, чтобы предупредить или смягчить начало гиперхолестеринемии, заболевания сердца, диабета и/или любого из связанных с холестерином расстройств. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 можно вводить для лечения существующего гиперхолестеринемического состояния. В некоторых вариантах АСБ отодвигает начало расстройства и/или симптомов, связанных с расстройством. В некоторых вариантах АСБ предлагают субъекту, у которого отсутствуют какие-либо симптомы любого из связанных с холестерином расстройств или их подмножество.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется с конкретными терапевтическими средствами для лечения различных связанных с холестерином расстройств, таких как

гиперхолестеринемия. В некоторых вариантах, с учетом состояния и желательного уровня лечения, можно вводить два, три или более средств. В некоторых вариантах такие средства могут быть обеспечены совместно путем введения в одну и ту же композицию. В некоторых вариантах такое средство(а) и антигенсвязывающий белок против PCSK9 могут быть обеспечены совместно путем введения в одну и ту же композицию. В некоторых вариантах такие средства могут быть введены в композиции по отдельности и обеспечены совместно путем включения в схему лечения. В некоторых вариантах такие средства и антигенсвязывающий белок против PCSK9 могут быть введены в композиции по отдельности и обеспечены совместно путем включения в схему лечения. В некоторых вариантах такие средства могут быть обеспечены по отдельности.

В некоторых вариантах композиция, содержащая антигенсвязывающий белок против PCSK9 по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или без него, может быть подготовлена для хранения путем смешивания выбранной композиции, обладающей желательной степенью чистоты, с необязательными агентами композиции (Remington's Pharmaceutical Sciences, выше) в форме лиофилизированной лепешки или водного раствора. Дополнительно, в некоторых вариантах композиция, содержащая антигенсвязывающий белок против PCSK9 по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или без него, может быть получена как лиофилизат, с применением подходящих вспомогательных веществ.

В некоторых вариантах, если предусмотрено парентеральное введение, терапевтическая композиция может находиться в форме апирогенного, пригодного для парентерального введения водного раствора, содержащего желательный антигенсвязывающий белок против PCSK9, с дополнительными терапевтическими средствами или без них, в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах носитель для парентеральной инъекции представляет собой стерильную дистиллированную воду, содержащую антигенсвязывающий белок против PCSK9 по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или без него, полученную в форме стерильного, изотонического раствора, с необходимыми консервантами. В некоторых вариантах композиция может содержать препарат желательной молекулы с агентом, таким как инъекционные микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (например, полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, который может обеспечить контролируемое или беспрерывное высвобождение продукта, который далее может быть введен посредством инъекции депо. В некоторых вариантах также может применяться гиалуроновая кислота, и может способствовать длительному нахождению в кровотоке. В некоторых вариантах имплантируемые устройства для доставки лекарственного средства могут применяться для введения желательной молекулы.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция может принимать форму для ингаляции. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или без него, может быть получен в форме сухого порошка для ингаляции. В некоторых вариантах раствор для ингаляции, содержащий антигенсвязывающий белок против PCSK9 по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или без него, может быть получен с пропеллентом для доставки аэрозоля. В некоторых вариантах растворы могут быть распылены. Легочное введение дополнительно описано в заявке PCT № PCT/US94/001875, в которой описано легочное введение химически модифицированных белков.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция может содержать эффективное количество антигенсвязывающего белка против PCSK9 по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или без него, в смеси с нетоксичными вспомогательными веществами, пригодными для производства таблеток. В некоторых вариантах путем растворения таблеток в стерильной воде или другом подходящем растворителе, могут быть получены растворы в однодозовой форме. В некоторых вариантах пригодные вспомогательные вещества включают, не ограничиваясь ими, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связующие агенты, например, крахмал, желатин или акациевая камедь; или смазывающие агенты, например, стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

Дополнительные фармацевтические композиции будут очевидны специалистам в данной области, в том числе, композиции, содержащие антигенсвязывающие белки против PCSK9 по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством(ами) или без него, в препаратах с замедленной или контролируемой доставкой. В некоторых вариантах способы получения различных других средств замедленной или контролируемой доставки, например, липосомальные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и инъекции депо, также известны специалистам в данной области. См. например, заявку PCT № PCT/US93/00829, в которой описано контролируемое высвобождение из пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических препаратов. В некоторых вариантах композиции с замедленным высвобождением могут содержать полупроницаемые полимерные матрицы в определенной геометрической форме, например, пленки или микрокапсулы. Матрицы с замедленным высвобождением могут содержать полиэфиры, гидрогели, полилактиды (US 3773919 и EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 (1983)), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) и Langer,

Chem. Tech., 12:98-105 (1982)), этиленвинилацетат (Langer с соавт., выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (EP 133988). В некоторых вариантах препараты с замедленным высвобождением могут также содержать липосомы, которые могут быть получены любым из нескольких способов, известных из уровня техники. См., например, Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Фармацевтическая композиция для введения in vivo обычно стерильна. В некоторых вариантах это может быть достигнуто фильтрованием через мембраны для стерилизующей фильтрации. В некоторых вариантах, в которых композицию лиофилизируют, стерилизация с применением данного способа может проводиться до или после лиофилизации и разбавления. В некоторых вариантах композиция для парентерального введения может храниться в лиофилизированной форме или растворе. В некоторых вариантах парентеральные композиции, в общем, помещают в контейнер, оборудованный стерильным портом доступа, например, пакет или флакон для раствора для внутривенного введения, оборудованный пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция сразу после получения может храниться в стерильных флаконах как раствор, суспензия, гель, эмульсия, твердое вещество или как дегидратированный или лиофилизированный порошок. В некоторых вариантах такие композиции могут храниться в готовой к применению форме или в форме (например, лиофилизированной), которую разбавляют перед введением.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция сразу после получения может храниться в предварительно заполненных шприцах в виде раствора или суспензии в готовой к применению форме.

В некоторых вариантах предложены наборы для получения однодозовых форм для введения. В некоторых вариантах набор может содержать как первый контейнер, содержащий сухой белок, так и второй контейнер, содержащий водную композицию. В некоторых вариантах включены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и лиошприцы).

В некоторых вариантах эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий белок против PCSK9 по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или без него, для терапевтического применения будет зависеть, например, от терапевтического контекста и задач. Специалисту в данной области будет понятно, что подходящие уровни дозы для лечения, согласно некоторым вариантам, будут, таким образом, варьировать, в зависимости, отчасти, от вводимой молекулы, показания, при котором применяется антигенсвязывающий белок против PCSK9 по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или без него, способа введения и размеров (масса тела, площадь поверхности тела или размер органа) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья) больного. В некоторых вариантах клиницист может титровать дозы и менять способ введения, чтобы получить оптимальный терапевтический эффект.

В некоторых вариантах композицию можно вводить локально посредством имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, на котором желательная молекула абсорбирована или в котором инкапсулирована. В некоторых вариантах, если применяется имплантируемое устройство, оно может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, и доставка желательной молекулы может осуществляться посредством диффузии, хронометрируемого болюса или беспрерывного введения.

Дозы и схемы лечения

Любой из антигенсвязывающих белков против PCSK9, проиллюстрированных в табл. 2 и на фиг. 2 и/или 3 и/или фиг. 48A и 48B, можно вводить больному в соответствии со способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки против PCSK9 включают 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 или 8A1.

Количество антигенсвязывающего белка против PCSK9 (например, анти-PCSK9 антитело), вводимое больному в соответствии со способами по настоящему изобретению, в общем, является терапевтически эффективным количеством. Количество АСБ может быть выражено в терминах миллиграмм антитела (т.е. мг) или миллиграмм антитела на килограмм массы тела больного (т.е. мг/кг). В некоторых вариантах типичные дозы антигенсвязывающего белка против PCSK9 могут варьировать от около 0,1 мкг/кг до около 100 мг/кг или более антигенсвязывающего белка против PCSK9. В некоторых вариантах доза может варьировать от 0,1 до около 100 мг/кг; или от 1 мкг/кг до около 100 мг/кг; или от 5 мкг/кг до около 100 мг/кг антигенсвязывающего белка против PCSK9; или от 1 мг/кг до около 50 мг/кг антигенсвязывающего белка против PCSK9; или от 2 до около 20 мг/кг антигенсвязывающего белка против PCSK9; или от 2 до около 10 мг/кг антигенсвязывающего белка против PCSK9.

В некоторых вариантах количество (или доза) антигенсвязывающего белка против PCSK9 может варьировать по меньшей мере от около 10 до около 1400 мг; или от около 14 до около 1200 мг; или от около 14 до около 1000 мг; или от около 14 до около 800 мг; или от около 14 до около 700 мг; или от около 14 до около 480 мг; или от около 20 до около 480 мг; или от около 70 до около 480 мг; или от около 80 до около 480 мг; или от около 90 до около 480 мг; или от около 100 до около 480 мг, или от около 105 до около 480 мг; или от около 110 до около 480 мг; или от около 115 до около 480 мг; или от около 120 до около 480 мг; или от около 125 до около 480 мг; или от около 130 до около 480 мг; или от около

135 до около 480 мг; или от около 140 до около 480 мг; или от около 145 до около 480 мг; или от около 150 до около 480 мг; или от около 160 до около 480 мг; или от около 170 до около 480 мг; или от около 180 до около 480 мг; или от около 190 до около 480 мг; или от около 200 до около 480 мг; или от около 210 до около 480 мг; или от около 220 до около 480 мг; или от около 230 до около 480 мг; или от около 240 до около 480 мг; или от около 250 до около 480 мг; или от около 260 до около 480 мг; или от около 270 до около 480 мг; или от около 280 до около 480 мг; или от около 290 до около 480 мг; или от около 300 до около 480 мг; или от около 310 до около 480 мг; или от около 320 до около 480 мг; или от около 330 до около 480 мг; или от около 340 до около 480 мг; или от около 350 до около 480 мг; или от около 360 до около 480 мг; или от около 370 до около 480 мг; или от около 380 до около 480 мг; или от около 390 до около 480 мг; или от около 400 до около 480 мг; или от около 410 до около 480 мг; или от около 420 до около 480 мг; или от около 430 до около 480 мг; или от около 440 до около 480 мг; или от около 450 до около 480 мг; или от около 460 до около 480 мг; или от около 470 до около 480 мг антигенсвязывающего белка против PCSK9.

В некоторых вариантах частота введения учитывает фармакокинетические параметры антигенсвязывающего белка против PCSK9 и/или любых дополнительных терапевтических средств в применяемом препарате. В некоторых вариантах клиницист будет вводить препарат до достижения дозы, которая обеспечивает желательный эффект. Таким образом, в некоторых вариантах препарат можно вводить в виде однократной дозы, или в виде двух, трех, четырех или более доз (которые могут содержать или не содержать одинаковое количество целевой молекулы) через промежутки времени, или в форме беспрерывной инфузии через имплантированное устройство или катетер. Препарат также может быть введен подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, с учетом подкожного введения, устройства для введения в форме ручки, а также устройства для введения в форме аутоинжектора, находят применение для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Дополнительное уточнение подходящих доз шаблонно проводится средними специалистами в данной области и находится в пределах круга задач, шаблонно выполняемых ими. В некоторых вариантах подходящие дозы могут быть определены путем использования подходящих данных доза-реакция. В некоторых вариантах количество и частота введения может учитывать желательный уровень холестерина (в сыворотке и/или общий), которого следует достичь, а также существующий уровень холестерина у субъекта, уровень ЛПНП и/или уровни ЛПНПР, все из которых могут быть достигнуты способами, хорошо известными специалистам в данной области.

В некоторых вариантах дозу по меньшей мере около 10 мг; или до около 14 мг; или до около 20 мг; или до около 35 мг; или до около 40 мг, или до около 45 мг, или до около 50 мг; или до около 70 мг антигенсвязывающего белка против PCSK9 вводят 1 раз в неделю (КН) больному, нуждающемуся в этом.

В некоторых других вариантах, дозу по меньшей мере около 70 мг, или до около 100 мг; или до около 105 мг, или до около 110 мг; или до около 115 мг, или до около 120 мг; или до около 140 мг; или до около 160 мг; или до около 200 мг; или до около 250 мг; или до 280 мг; или до 300 мг; или до 350 мг; или до 400 мг; или до 420 мг антигенсвязывающего белка против PCSK9 вводят 1 раз в 2 недели (или каждые две недели) (К2Н) больному, нуждающемуся в этом.

В некоторых других вариантах дозу по меньшей мере около 250 мг; или до около 280 мг; или до около 300 мг; или до около 350 мг; или до около 400 мг; или до около 420 мг; или до около 450 мг; или до 480 мг антигенсвязывающего белка против PCSK9 вводят 1 раз в 4 недели (или ежемесячно) больному, нуждающемуся в этом.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 15%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 20%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 85%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 90%.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 15%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере

около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 20%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 25%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 30%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 35%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 40%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 45%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 50%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 55%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 60%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 65%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 70%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 75%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 80%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 85%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 90%, по сравнению с уровнем холестерина ЛПНП в сыворотке до введения дозы, и снижение сохраняется в течение периода по меньшей мере около 3 дней, по меньшей мере около 5 дней, по меньшей мере около 7 дней, по меньшей мере около 10 дней, по меньшей мере около 14 дней, по меньшей мере около 21 дней, по меньшей мере около 25 дней, по меньшей мере около 28 дней или по меньшей мере около 31 дня, относительно уровня до введения дозы.

Некоторые виды терапевтического применения

Как будет понятно специалисту в данной области, при расстройствах, которые связаны с, включают или на которые могут повлиять варьирующие уровни холестерина, ЛПНП, ЛПНПР, PCSK9, ЛПОНП-Х, апопротеинаВ ("АроВ"), липопротеина А ("Lp(a)"), триглицеридов, ЛПВП-Х, не-ЛПВП-Х, и уровни общего холестерина, можно применять антигенсвязывающие белки против PCSK9, описанные в настоящем изобретении. В одном из аспектов, антигенсвязывающие белки против PCSK9 могут применяться в способах лечения и/или предупреждения и/или снижения риска расстройств, связанных с повышенными уровнями холестерина в сыворотке или при которых повышенные уровни холестерина в сыворотке имеют значение. В одном из аспектов, антигенсвязывающие белки против PCSK9 могут применяться в способах лечения и/или предупреждения и/или снижения риска расстройств, которые связаны с повышенными значениями PCSK9 или при которых повышенные значения PCSK9 имеют значение. В одном из аспектов, антигенсвязывающие белки против PCSK9 могут применяться в способах лечения и/или предупреждения и/или снижения риска расстройств, связанных с повышенными уровнями общего холестерина или при которых повышенные общие уровни холестерина имеют значение. В одном из аспектов, антигенсвязывающие белки против PCSK9 могут применяться в способах лечения и/или предупреждения и/или снижения риска расстройств, которые связаны с повышенными уровнями не-ЛПВП холестерина или при которых повышенные уровни не-ЛПВП холестерина имеют значение. В одном из аспектов, антигенсвязывающие белки против PCSK9 могут применяться в способах лечения и/или предупреждения и/или снижения риска расстройств, которые связаны с повышенными уровнями АроВ или при которых повышенные уровни АроВ имеют значение. В одном из аспектов, антигенсвязывающие белки против PCSK9 могут применяться в способах лечения и/или предупреждения и/или снижения риска расстройств, которые связаны с повышенными уровнями Lp(a) или при которых повышенные уровни Lp(a) имеют значение. В одном из аспектов, антигенсвязывающие белки против PCSK9 могут применяться в способах лечения и/или предупреждения и/или снижения риска расстройств, которые связаны с повышенными уровнями триглицеридов или при которых повышенные уровни триглицеридов имеют значение. В одном из аспектов, антигенсвязывающие белки против PCSK9 могут применяться в способах лечения и/или предупреждения и/или снижения риска расстройств, которые связаны с повышенными уровнями ЛПОНП-Х или при которых повышенные уровни ЛПОНП-Х имеют значение.

В одном из аспектов, антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для модуляции уровней холестерина ЛПНП в сыворотке больного. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для уменьшения количества холестерина ЛПНП в сыворотке от аномально высокого уровня или даже от нормального уровня. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в

сыворотке снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 85%. В некоторых вариантах уровень холестерина ЛПНП в сыворотке снижается по меньшей мере на около 90%.

В одном из аспектов, антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для модуляции значений PCSK9 в сыворотке больного. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 является нейтрализующим. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для уменьшения значения PCSK9 от аномально высокого уровня или даже от нормального уровня. В некоторых вариантах значение PCSK9 в сыворотке уменьшается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах значение PCSK9 в сыворотке уменьшается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах значение PCSK9 в сыворотке уменьшается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах значение PCSK9 в сыворотке уменьшается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах значение PCSK9 в сыворотке уменьшается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах значение PCSK9 в сыворотке уменьшается по меньшей мере на около 85%. В некоторых вариантах значение PCSK9 в сыворотке уменьшается по меньшей мере на около 90%.

В одном из аспектов, антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для модуляции уровня общего холестерина у больного. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 является нейтрализующим. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для уменьшения количества общего холестерина от аномально высокого уровня или даже от нормального уровня. В некоторых вариантах общий уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 20%. В некоторых вариантах общий уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах общий уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах общий уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах общий уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах общий уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах общий уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах общий уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах общий уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 60%.

В одном из аспектов, антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для модуляции уровня не-ЛПВП холестерина у больного. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 является нейтрализующим. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для снижения уровня не-ЛПВП холестерина от аномально высокого уровня или даже от нормального уровня. В некоторых вариантах не-ЛПВП уровень холестерина снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах уровень не-ЛПВП холестерина снижается по меньшей мере на около 85%.

В одном из аспектов, антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для модуляции уровней АроВ у больного. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 является нейтрализующим. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для уменьшения количества АроВ от аномально высокого уровня или даже от нормального уровня. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень

АроВ снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 65%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах уровень АроВ снижается по меньшей мере на около 75%.

В одном из аспектов, антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для модуляции уровней Lp(a) у больного. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 является нейтрализующим. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для уменьшения количества Lp(a) от аномально высокого уровня или даже от нормального уровня. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 5%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 10%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 15%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 20%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 25%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 30%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 35%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 40%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 45%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах уровень Lp(a) снижается по меньшей мере на около 65%.

Как будет понятно специалисту в данной области, антигенсвязывающие белки против PCSK9 по настоящему изобретению могут быть терапевтически пригодными для лечения и/или предупреждения связанного с холестерином расстройства. В некоторых вариантах "связанное с холестерином расстройство" (что включает "связанные с холестерином сыворотки расстройства") включает любое одно или более из следующего: семейная гиперхолестеринемия, несемейная гиперхолестеринемия, гиперлипидемия, заболевание сердца, метаболический синдром, диабет, заболевание коронарных сосудов сердца, инсульт, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Альцгеймера и дислипидемии в целом, которые могут проявляться, например, повышенным уровнем общего холестерина в сыворотке, повышенным уровнем ЛПНП, повышенным уровнем триглицеридов, повышенным уровнем ЛПОНП и/или низким уровнем ЛПВП. Некоторые не ограничивающие примеры первичных и вторичных дислипидемии, которые можно лечить с применением АСБ, отдельно или в комбинации с одним или более других средств, включают метаболический синдром, сахарный диабет, семейную комбинированную гиперлипидемию, семейную гипертриглицеридемию, семейные гиперхолестеринемии, в том числе, гетерозиготную гиперхолестеринемию, гомозиготную гиперхолестеринемию, семейный дефектный аполипопротеин В-100; полигенную гиперхолестеринемию; заболевание удаления ремнанта, дефицит печеночной липазы; дислипидемию, вторичную к любому из следующего: нерациональное питание, гипотиреоз, лекарственные средства, в том числе, эстрогеновая и прогестиновая терапия, бета-блокаторы и тиазидные диуретики; нефротический синдром, хроническая почечная недостаточность, синдром Кушинга, первичный билиарный цирроз, болезни хранения гликогена, гепатома, холестаз, акромегалия, инсулинома, изолированный дефицит гормона роста и вызванная алкоголем гипертриглицеридемия. АСБ также может быть пригодным для предупреждения или лечения атеросклеротических заболеваний, таких как смерть в результате сердечно-сосудистых катастроф, смерть в результате не сердечно-сосудистых или общих причин, заболевание коронарных сосудов сердца, заболевание коронарных артерий, заболевание периферических артерий, инсульт (ишемический и геморрагический), стенокардия или цереброваскулярное заболевание и острый коронарный синдром, инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия. В некоторых вариантах АСБ пригоден для снижения риска: фатальных и нефатальных сердечных приступов, фатальных и нефатальных инсультов, некоторых видов хирургических вмешательств на сердце, госпитализации по поводу сердечной недостаточности, боли в груди у больных заболеванием сердца, и/или сердечно-сосудистых катастроф в результате диагностированного заболевания сердца, такого как сердечный приступ в анамнезе, хирургическое вмешательство на сердце в анамнезе и/или боль в груди с доказательствами закупоренный артерий и/или связанное с трансплантацией заболевание сосудов. В некоторых вариантах АСБ пригоден для предупреждения или снижения сердечно-сосудистого риска в результате повышенного уровня С-реактивного белка (СРБ) или высокочувствительного С-реактивного белка (вСРБ). В некоторых вариантах АСБ и способы могут применяться для снижения риска рецидивов сердечно-сосудистых катастроф.

Как будет понятно специалисту в данной области, при заболеваниях или расстройствах, на которые, в общем, направлены (или которые поддаются лечению, или поддаются профилактике) путем применения статинов, можно также получить пользу от применения растворимых антигенсвязывающих белков. Кроме того, в некоторых вариантах, расстройства или заболевания, при которых можно получить пользу от предотвращения синтеза холестерина или увеличенной экспрессии ЛПНПР, можно также лечить различных вариантами антигенсвязывающих белков. Кроме того, как будет понятно специалисту в данной области, применение анти-PCSK9 антител может быть особенно пригодным для лечения диабета. Диабет не только сам по себе является фактором риска заболевания коронарных сосудов сердца, но и инсулин увеличивает экспрессию PCSK9. Таким образом, у больных диабетом повышены уровни липидов в

плазме (что может быть связано с высокими уровнями PCSK9), и они могут получить пользу от снижения указанных уровней. Это, в общем, обсуждается более подробно в Costet et al. ("Hepatic PCSK9 Expression is Regulated by Nutritional Status via Insulin and Sterol Regulatory Element-binding Protein 1C", J. Biol. Chem., 281:6211-6218, 2006), которая включена в данное описание путем ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок вводят тем, у кого присутствует сахарный диабет, аневризма брюшной аорты, атеросклероз и/или заболевание периферических сосудов для того, чтобы снизить у них уровни холестерина в сыворотке до более безопасного интервала. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок вводят больным, подверженным риску развития любого из описанных в данном описании расстройств. В некоторых вариантах АСБ вводят субъектам, которые курят или курили (т.е. бывшие курильщики), с гипертензией или семейным анамнезом ранних сердечных приступов.

В некоторых вариантах субъектам вводят АСБ, если они подвержены умеренному риску или выше согласно целям лечения НОПХ 2004. В некоторых вариантах АСБ вводят субъекту, если уровень холестерина ЛПНП у субъекта выше 160 мг/дл. В некоторых вариантах АСБ вводят, если уровень холестерина ЛПНП у субъектов выше 130 (и они подвержены умеренному или умеренно повышенному риску согласно целям лечения НОПХ 2004). В некоторых вариантах АСБ вводят, если уровень холестерина ЛПНП у субъектов выше 100 (и они подвержены высокому или очень высокому риску согласно целям лечения НОПХ 2004). В некоторых вариантах АСБ вводят, если уровень холестерина ЛПНП у субъектов выше 80 мг/дл. В некоторых вариантах АСБ вводят, если уровень холестерина ЛПНП у субъектов выше 70 мг/дл.

Врач сможет выбрать подходящие показания для лечения и целевые уровни липидов в зависимости от индивидуального профиля конкретного больного. Одним из широко признанных стандартов лечения гиперлипидемии является Третий Отчет Национальной образовательной программы по холестерину (НОПХ), Заключительный отчет Экспертной панели по обнаружению, оценке и лечению высокого уровня холестерина в крови взрослых (Панель лечения взрослых III), Национальные Институты Здоровья, NTH Publication No. 02-5215 (2002), печатная версия которой, таким образом, включена путем ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки против PCSK9 применяются для лечения или предупреждения гиперхолестеринемии, гиперлипидемии или дислипидемии и/или для получения предназначенных для этой цели лекарственных средств и/или при других связанных с холестерином расстройствах (таких как отмеченные в данном описании). В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 применяется для лечения или предупреждения таких состояний, как гиперхолестеринемия, при которых активность PCSK9 является нормальной. При таких состояниях, например, снижение активности PCSK9 ниже нормы может обеспечить терапевтический эффект.

Комбинированная терапия

В некоторых вариантах предложены способы лечения связанного с холестерином расстройства, такого как гиперхолестеринемия, гиперлипидемия или дислипидемия, включающие введение терапевтически эффективного количества одного или более антигенсвязывающих белков против PCSK9 и другого терапевтического агента. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 вводят до введения по меньшей мере одного другого терапевтического агента. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 вводят одновременно с введением по меньшей мере одного другого терапевтического агента. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 вводят после введения по меньшей мере одного другого терапевтического агента.

Терапевтические агенты (кроме антигенсвязывающего белка), включают, не ограничиваясь ими по меньшей мере один другой агент для снижения уровня холестерина (в сыворотке и/или общего холестерина в организме). В некоторых вариантах агент увеличивает экспрессию ЛПНПР, согласно наблюдениям повышал уровни ЛПВП в сыворотке, снижал уровни ЛПНП или снижал уровни триглицеридов. Примеры средств включают, не ограничиваясь ими, статины (аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин, симвастатин), никотиновую кислоту (ниацин) (НИАКОР, НИАСПАН (ниацин замедленного высвобождения), СЛО-НИАЦИН (ниацин замедленного высвобождения), КОРДАПТИВ (ларопипрант)), фибриновую кислоту (ЛОПИД (гемфиброзил), ТРИКОР (фенофибрат), секвестранты желчных кислот (КВЕСТРАН (холестирамин), холезевелам (ВЕЛХОЛ), КОЛЕСТИД (колестипол)), ингибиторы абсорбции холестерина (ЗЕТИЯ (экзетимиб)), комбинации никотиновой кислоты и статина (АДВИКОР (ЛОВАСТАТИНи НИАСПАН), комбинации статина с ингибитором абсорбции (ВИТОРИН (ЗОКОР и ЗЕТИА) и/или модифицирующими липиды средствами. В некоторых вариантах АСБ комбинируют с агонистами ППАР гамма, агонистами ППАР альфа/гамма, ингибиторами скваленсинтетазы, ингибиторами ТБХЭ, антигипертензивными средствами, противодиабетическими средствами (такими как сульфонилмочевины, инсулин, аналоги GLP-1, ингибиторы ДДП4, например, метформин), модуляторы АроВ, например, мипомерсан, ингибиторы МБТ и/или средства для лечения облитерирующего артериосклероза. В некоторых вариантах АСБ комбинируют со средством, которое повышает уровень белка ЛПНПР у субъекта, таким как статины, некоторые цитокины, например, онкостатин М, эстроген и/или некоторые растительные ингредиенты, например, берберин. В некоторых вариантах АСБ комбинируют со средством, которое повышает уровни холестерина в сыворотке

субъекта (такими как некоторые антипсихотические средства, некоторые ингибиторы ВИЧ-протеазы, диетические факторы, например, высокое содержание фруктозы, сахарозы, холестерина или некоторых жирных кислот, и агонисты некоторых ядерных рецепторов и антагонисты ретиноидного X рецептора, рецептора ретиноевой кислоты, рецептора X печени, рецептора фарнезолида X). В некоторых вариантах АСБ комбинируют со средством, которое повышает уровень PCSK9 у субъекта, таким как статины и/или инсулин. Комбинация двух средств может позволить смягчить побочное действие других средств под влиянием АСБ.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 может применяться по меньшей мере с одним противовоспалительным терапевтическим средством. В некоторых вариантах антигенсвязывающий белок против PCSK9 может применяться по меньшей мере с одним терапевтическим средством для лечения иммунного расстройства. Примеры терапевтических средств для лечения воспаления и иммунных расстройств включают, не ограничиваясь ими, ингибиторы циклооксигеназы типа 1 (ЦОГ-1) и 2 (ЦОГ-2), низкомолекулярные модуляторы митоген-активируемой протеинкиназы размером 38 кДа (p38-MAPK); низкомолекулярные модуляторы внутриклеточных молекул, участвующих в пути воспаления, причем такие внутриклеточные молекулы включают, не ограничиваясь ими, jnk, IKK, NF-κB, ZAP70 и lck. Некоторые примеры терапевтических средств для лечения воспаления описаны, например, в C.A. Dinarello & L.L. Moldawer Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians Third Edition (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, Калифорния.

Диагностическое применение

В некоторых вариантах АСБ применяется в качестве диагностического инструмента. АСБ может применяться для количественного анализа PCSK9, присутствующего в образце и/или организме субъекта. Как будет понятно специалисту в данной области, такие АСБ не должны быть нейтрализующими АСБ. В некоторых вариантах диагностический АСБ не является нейтрализующим АСБ. В некоторых вариантах диагностический АСБ связывается с другим эпитопом, чем нейтрализующий АСБ. В некоторых вариантах два АСБ не конкурируют друг с другом.

В некоторых вариантах АСБ, раскрытые в данном описании, применяются или предлагаются в наборе для анализа и/или способе обнаружения PCSK9 в тканях или клетках млекопитающих с целью скрининга/диагностики заболевания или расстройства, связанного с изменениями уровней PCSK9. Набор содержит АСБ, который связывается с PCSK9, и средства для обнаружения связывания АСБ с PCSK9, если оно присутствует, и необязательно, определения уровней белка PCSK9. Могут применяться различные средства для обнаружения присутствия АСБ. Например, флюорофоры, другие молекулярные зонды или ферменты могут связываться с АСБ, и присутствие АСБ может быть обнаружено различными способами. Способ скрининга для выявления таких расстройств может включать использование набора, или просто использование одного из раскрытых АСБ и определение того, связывается ли АСБ с PCSK9 в образце. Как будет понятно специалисту в данной области, высокие или повышенные уровни PCSK9 будут приводить к большему количеству АСБ, связанного с PCSK9 в образце. Таким образом, степень связывания АСБ может применяться для определения количества PCSK9 в образце. Субъекты или образцы с количеством PCSK9, которое превышает предварительно определенное количество (например, количество или интервал, который присутствовал бы у лица без связанного с PCSK9 расстройства) могут быть охарактеризованы как имеющие опосредованное PCSK9 расстройство. В некоторых вариантах АСБ вводят субъекту, получающему статин, с целью определения того, увеличивает ли статин количество PCSK9 у субъекта.

В некоторых вариантах АСБ представляет собой не нейтрализующий АСБ и применяется для определения количества PCSK9 у субъекта, получающего лечение АСБ и/или статином.

Примеры

Следующие примеры, в том числе проведенные опыты и полученные результаты, предложены только для иллюстративных целей и не должны быть интерпретированы как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1.

Иммунизация и титрование.

Генерация анти-PCSK9 антител и гибридом.

Антитела к зрелой форме PCSK9 (проиллюстрированной как последовательность на фиг. 1A, с подчеркнутым pro-доменом) были получены у мышей XenoMouse® (Abgenix, Фремонт, Калифорния), которые являются мышами, содержащими гены человеческого иммуноглобулина. Две группы мышей XenoMouse®, группы 1 и 2, использовали для выработки антител против PCSK9. Группа 1 включала породу мышей XenoMouse XMG2-KL, которая вырабатывает полностью человеческие антитела IgG2k и IgG2λ. Группу 1 мышей иммунизировали человеческим PCSK9. PCSK9 получали с применением стандартных рекомбинантным методов, с применением последовательность GenBank в качестве референтной (NM_174936). Группа 2 включала мышей породы XenoMouse® XMG4-KL, которые вырабатывают полностью человеческие антитела IgG4k и IgG4λ. Мышей группы 2 также иммунизировали человеческим PCSK9.

Мышам из обеих групп инъекционно вводили антиген 11 раз, согласно расписанию в табл. 3. При начальной иммунизации, каждой мыши вводили общее количество 10 мкг антигена внутрибрюшинно в брюхо. Последующими бустерными дозами были дозы 5 мкг, и метод инъекции распределялся в шахматном порядке между внутрибрюшными инъекциями в брюхо и подкожными инъекциями в основание хвоста. Для внутрибрюшинных инъекций антиген готовили в виде эмульсии TiterMax® Gold (Sigma, кат. № T2684), и для подкожных инъекций антиген смешивали с алюминиевыми квасцами (алюминия фосфат) и олигонуклеотидами CpG. В ходе инъекций 2-8 и 10 каждой мыши вводили общее количество 5 мг антигена в геле алюминия фосфата адъюванта. Заключительную инъекцию 5 мг антигена на мышь вводили в буферизованном фосфате солевом растворе и проводили в 2 места 50% внутрибрюшинно в брюхо и 50% подкожно в основание хвоста. Программы иммунизации суммированы в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Порода мышей	XMG2/kl	XMG4/kl
Кол-во животных	10	10
Иммуноген	PCSK9-V5/His	PCSK9-V5/His
1-я бустерная инъекция	в/б инъекция по 10 мкг каждая	в/б инъекция по 10 мкг каждая
	Titermax Gold	Titermax Gold
2-я бустерная инъекция	инъекция в хвост по 5 мкг каждая	инъекция в хвост по 5 мкг каждая
	Алюминия фосфат/CpG ODN	Алюминия фосфат/CpG ODN
3-я бустерная инъекция	в/б инъекция по 5 мкг каждая	в/б инъекция по 5 мкг каждая
	Titermax Gold	Titermax Gold
4-я бустерная инъекция	инъекция в хвост по 5 мкг каждая	инъекция в хвост по 5 мкг каждая
	Алюминия фосфат/CpG ODN	Алюминия фосфат/CpG ODN
5-я бустерная инъекция	в/б инъекция по 5 мкг каждая	в/б инъекция по 5 мкг каждая
	Titermax Gold	Titermax Gold
6-я бустерная инъекция	инъекция в хвост по 5 мкг каждая	инъекция в хвост по 5 мкг каждая
	Алюминия фосфат/CpG ODN	Алюминия фосфат/CpG ODN
7-я бустерная инъекция	в/б инъекция по 5 мкг каждая	в/б инъекция по 5 мкг каждая
	Titermax Gold	Titermax Gold
8-я бустерная инъекция	инъекция в хвост по 5 мкг каждая	инъекция в хвост по 5 мкг каждая
	Алюминия фосфат/CpG ODN	Алюминия фосфат/CpG ODN
Отбор образца крови		
9-я бустерная инъекция	в/б инъекция по 5 мкг каждая	в/б инъекция по 5 мкг каждая
	Titermax Gold	Titermax Gold
10-я бустерная инъекция	инъекция в хвост по 5 мкг каждая	инъекция в хвост по 5 мкг каждая
	Алюминия фосфат/CpG ODN	Алюминия фосфат/CpG ODN
11-я бустерная инъекция	БИБ по 5 мкг каждая	БИБ по 5 мкг каждая
	ФБР	ФБР
Сбор тканей		

Протокол, используемый для титрования у животных XenoMouse, был следующим: планшеты Costar 3368 для среды связывания покрывали нейтравидином в концентрации 8 мкг/мл (50 мкл/лунку) и инкубировали при 4°C в 1 × ФБР/0,05% азида на протяжении ночи. Их промывали с применением 3 цик-

лов промывания TiterTek водой, очищенной при помощи обратного осмоса и ионного обмена (ОИ). Планшеты блокировали с применением 250 мкл 1 × ФБР/1% молока и инкубировали по меньшей мере в течение 30 мин при комнатной температуре. Блок вымывали с использование 3 циклов промывания TiterTek водой ОИ. Затем планшет покрывали b-человеческим PCSK9 в концентрации 2 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} (разбавитель анализа) 50 мкл/лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем промывали с применением 3 циклов промывания TiterTek водой ОИ. Для первичного антитела, сыворотки титровали 1:3 в двойном повторении от 1:100. Это проводили в разбавителе анализа 50 мкл/лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем промывали с применением 3 циклов промывания TiterTek водой ОИ. Вторичное антитело представляло собой козий анти-человеческий IgG Fc ПХ в концентрации 400 нг/мл в разбавителе анализа в количестве 50 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее их промывали с применением 3 циклов промывания TiterTek водой ОИ и промокали насухо бумажными полотенцами. Для субстрата использовали раствор ТМБ для одной стадии (Neogen, Лексингтон, Кентукки) (50 мкл/лунку) и давали проявляться в течение 30 мин при комнатной температуре.

Протоколы, которым следовали в анализах методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА), были следующими: для образцов, содержащих b-PCSK9 без метки V5His, использовали следующий протокол: использовали планшеты Costar 3368 для среды связывания (Corning Life Sciences). Планшеты покрывали нейтравидином в концентрации 8 мкг/мл в 1 × ФБР/0,05% азида (50 мкл/лунку). Планшеты инкубировали при 4°C на протяжении ночи. Далее планшеты промывали с применением устройства для промывания планшетов Titertek M384 (Titertek, Хантсвилл, Алабама). Выполняли 3 цикла промывания. Планшеты блокировали 250 мкл 1 × ФБР/1% молока и инкубировали приблизительно 30 мин при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов M384. Выполняли 3 цикла промывания. Для покрытия использовали b-hu PCSK9, без метки V5, и добавляли в концентрации 2 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} (40 мкл/лунку). Далее планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Выполняли 3 цикла промывания. Сыворотки титровали 1:3 в двойном повторении от 1:100, и ряд H был холостым для сывороток. Титрование проводили в разбавителе анализа, в объеме 50 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее выполняли 3 цикла промывания. Козий античеловеческий IgG Fc ПХ в концентрации 100 нг/мл (1:4000) в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} (50 мкл/лунку) добавляли на планшет и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали еще раз, с применением 3 циклов промывания. Далее планшеты промокали досуха бумажным полотенцем. В конце, ТМБ для 1 стадии (Neogen, Лексингтон, Кентукки) (50 мкл/лунку) добавляли на планшет и гасили 1 н хлористоводородной кислотой (50 мкл/лунку) через 30 мин при комнатной температуре. Значения оптической плотности регистрировали немедленно на длине волны 450 нм с применением устройства для считывания планшетов Titertek.

Положительным контролем для обнаружения связанного с планшетом PCSK9 были растворимый рецептор ЛПНП (R&D Systems, кат. № 2148LD/CF) и поликлональное кроличье анти-PCSK9 антитело (Caymen Chemical № 10007185), титрованное 1:3 в двойном повторении от 3 мкг/мл в разбавителе анализа. ЛПНПР обнаруживали с помощью козьего анти-ЛПНПР (R&D Systems, кат. № AF2148) и кроличьего анти-козьего IgGFc ПХ в концентрации 400 нг/мл; поликлональное кроличье антитело обнаруживали с применением козьего анти-кроличьего IgG Fc в концентрации 400 нг/мл в разбавителе анализа. Отрицательным контролем были наивные сыворотки XMG2-KL и XMG4-KL, титрованные 1:3 в двойном повторении от 1:100 в разбавителе анализа.

Для образцов, содержащих b-PCSK9 с меткой V5His, использовали следующий протокол: использовали планшеты Costar 3368 для среды связывания (Corning Life Sciences). Планшеты покрывали нейтравидином в концентрации 8 мкг/мл в 1 × ФБР/0,05% азида (50 мкл/лунку). Планшеты инкубировали при 4°C на протяжении ночи. Далее планшеты промывали с применением устройства для промывания планшетов Titertek M384 (Titertek, Хантсвилл, Алабама). Выполняли 3 цикла промывания. Планшеты блокировали 250 мкл 1 × ФБР/1% молока и инкубировали приблизительно 30 мин при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов M384. Выполняли 3 цикла промывания. Для покрытия использовали b-hu PCSK9, с меткой V5, и добавляли в концентрации 2 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} (40 мкл/лунку). Далее планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Выполняли 3 цикла промывания. Сыворотки титровали 1:3 в двойном повторении от 1:100, и ряд H был холостым для сывороток. Титрование проводили в разбавителе анализа, в объеме 50 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с помощью устройства для промывания планшетов M384, выполняя 3 цикла промывания. Козий анти-человеческий IgG Fc ПХ в концентрации 400 нг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} (50 мкл/лунку) добавляли на планшет и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали снова, выполняя 3 цикла промывания. Далее планшеты промокали досуха бумажным полотенцем. В конце, ТМБ для 1 стадии (Neogen, Лексингтон, Кентукки) (50 мкл/лунку) добавляли на планшет, и планшет гасили 1 н хлористоводородной кислотой (50 мкл/лунку) через 30 мин при ком-

натной температуре. Значения оптической плотности регистрировали немедленно на длине волны 450 нм с применением устройства для считывания планшетов Titertek.

Положительным контролем был ЛПНП, кроличий анти-PCSK9, титрованный 1:3 в двойном повторении от 3 мкг/мл в разбавителе анализа. ЛПНПР обнаруживали с помощью козьего анти-ЛПНПР (R&D Systems, кат. № AF2148) и кроличьего анти-козьего IgG Fc ПХ в концентрации 400 нг/мл; поликлональное кроличье антитело обнаруживали с применением козьего анти-кроличьего IgG Fc в концентрации 400 нг/мл в разбавителе анализа. Человеческие анти-His 1.2.3 и анти-V5 1.7.1, титрованные 1:3 в двойном повторении от 1 мкг/мл в разбавителе анализа; оба обнаруживали с применением козьего античеловеческого IgG Fc ПХ в концентрации 400 нг/мл в разбавителе анализа. Отрицательным контролем были наивные сыворотки XMG2-KL и XMG4-KL, титрованные 1:3 в двойном повторении от 1:100 в разбавителе анализа.

Титры антитела против человеческого PCSK9 измеряли в анализе ТИФА для мышей, иммунизированных растворимым антигеном, как было описано. В табл. 4 суммированы данные ТИФА, и показано, что были некоторые мыши, которые, по-видимому, были специфичными в отношении PCSK9. См., например, табл. 4. Таким образом, в конце программы иммунизации, 10 мышей (выделены полужирным шрифтом в табл. 4) были выбраны для отбора тканей, и спленоциты и лимфоциты был выделены из селезенок и лимфатических узлов, соответственно, как описано в данном описании.

Таблица 4

Резюме результатов ТИФА

		Титр	**Титр**
	Идентификатор животного	b-hu PCSK9 (V5His) @ 2 мкг/мл	b-hu PCSK9 @ 2 мкг/мл
Группа 1 - IgG2k/l	P175807	>72900 @ OD 2,2	68359
	P175808	>72900 @ OD 2,3	>72900 @ OD 2,5
	P175818	>72900 @ OD 3,2	**>72900 @ OD 3,0**
	P175819	>72900 @ OD 3,4	**>72900 @ OD 3,2**
	P175820	>72900 @ OD 2,4	>72900 @ OD 2,5
	P175821	>72900 @ OD 3,4	**>72900 @ OD 3,0**
	P175830	>72900 @ OD 2,6	>72900 @ OD 2,5
	P175831	>72900 @ OD 3,1	**>72900 @ OD 3,1**
	P175832	>72900 @ OD 3,8	**>72900 @ OD 3,6**
	P175833	>72900 @ OD 2,6	>72900 @ OD 2,3
Группа 2 - IgG4k/l	P174501	19369	17109
	P174503	31616	**23548**
	P174508	48472	**30996**
	P174509	23380	21628
	P174510	15120	9673
	P175773	19407	15973
	P175774	54580	**44424**
	P175775	60713	**55667**
	P175776	30871	**22899**
	P175777	16068	12532
	Наивный G2	< 100 @ OD 0,54	< 100 @ OD 0,48
	Наивный G4	< 100 @ OD	< 100 @ OD

		Титр	**Титр**
	Идентификатор животного	b-hu PCSK9 (V5His) @ 2 мкг/мл	b-hu PCSK9 @ 2 мкг/мл
		1,57	1,32

Пример 2.

Получение лимфоцитов, выделение В-клеток, слияние и генерация гибридом.

В данном примере проиллюстрировано, как были получены иммунные клетки и сгенерированы гибридомы. Отобранных иммунизированных мышей умерщвляли смещением шейных позвонков, дренированные лимфатические узлы извлекали и объединяли в пул от каждой когорты. В-Клетки отделяли от лимфоидной ткани путем помола в модифицированной Дюльбекко среде Игла (МДСИ), чтобы освободить клетки от тканей, и клетки суспендировали в МДСИ. Клетки пересчитывали, и 0,9 мкл МДСИ на

100 млн лимфоцитов добавляли к грануле клеток, чтобы осторожно, но полностью ресуспендировать клетки.

Лимфоциты смешивали с клетками несекреторной миеломы P3X63Ag8.653, приобретенными у АКТК, кат. № CRL 1580 (Kearney et al. (1979) J. Immunol. 123, 1548-1550), в соотношении 1:4. Смесь клеток осторожно гранулировали центрифугированием при 400×g в течение 4 мин. После декантации супернатанта, клетки осторожно перемешивали с применением пипетки 1 мкл. Подогретый раствор ПЭГ/ДМСО от Sigma (кат. № P7306) (1 мл на миллион В-клеток) медленно добавляли при тщательном взбалтывании в течение 1 мин, с последующим перемешиванием в течение 1 мин. Далее добавляли подогретую минимальную эссенциальную среду Дюльбекко, модифицированную по способу Исков (МЭСДИ, 2 мл на миллион клеток В) (МДСИ без глутамина, L-глутамин, пенициллин/стрептомицин, заменимые аминокислоты МЭС (все от Invitrogen), в течение 2 мин при тщательном взбалтывании. В конце подогретую МЭСДИ (8 мкл на 10^6 В-клеток) добавляли в течение 3 мин.

Слитые клетки осаждали при 400×g в течение 6 мин и ресуспендировали в 20 мл селекционной среды (МДСИ (Invitrogen), 15% СТЭ (Hyclone), с добавлением L-глутамина, пенициллина/стрептомицина, заменимых аминокислот МЭС, натрия пирувата, 2-меркаптоэтанола (все от Invitrogen), HA-азасерина гипоксантина и ОПИ (оксалоацетат, пируват, телячий инсулин) (оба от Sigma) и IL-6 (Boehringer Mannheim)) на миллион В-клеток. Клетки инкубировали в течение 20-30 мин при 37°C, а затем ресуспендировали в 200 мл селекционной среды и культивировали в течение 3-4 дней в колбе T175 до помещения на 96-луночные планшеты. Таким образом, получали гибридомы, которые вырабатывали антигенсвязывающие белки против PCSK9.

Пример 3.

Селекция антител против PCSK9.

Настоящий пример в общих чертах иллюстрирует, каким образом проводилась характеристика и отбор различных антигенсвязывающих белков против PCSK9. Оценивали связывание выделенных антител (продуцированных гибридомами, полученными в примерах 1 и 2) с PCSK9. Селекция антител была основана на данных связывания и ингибировании связывания PCSK9 с ЛПНПР и сродстве. Связывание с растворимым PCSK9 было проанализировано методом ТИФА, как описано ниже. BIAcore® (резонанс поверхностного плазмона) использовали для количественного определения сродства связывания.

Первичный скрининг

Выполняли первичный скрининг антител, которые связываются с PCSK9 дикого типа. Первичный скрининг выполняли на двух партиях. Первичный скрининг включал анализ методом ТИФА и выполнялся с применением следующего протокола.

Использовали 384-луночные планшеты Costar 3702 (Coining Life Sciences) для среды связывания. Планшеты покрывали нейтравидином в концентрации 4 мкг/мл в 1 × ФБР/0,05% азида а объеме 40 мкл/лунку. Планшеты инкубировали при 4°C на протяжении ночи. Далее планшеты промывали с применением устройства для промывания планшетов Titertek (Titertek, Хантсвилл, Алабама). Выполняли 3 цикла промывания. Планшеты блокировали 90 мкл 1 × ФБР/1% молока и инкубировали приблизительно 30 мин при комнатной температуре. Далее планшеты промывали. Снова выполняли 3 цикла промывания. В качестве образца покрытия использовали биотинилированный-PCSK9, без метки V5, и добавляли в концентрации 0,9 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} в объеме 40 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали с помощью устройства для промывания планшетов Titertek, с использованием 3 циклов промывания. 10 мкл супернатанта переносили в 40 мкл 1 х ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Планшеты снова промывали с помощью устройства для промывания планшетов Titertek, с использованием 3 циклов промывания. 40 мкл/лунку козьего анти-человеческого IgG Fc пероксидазы в концентрации 100 нг/мл (1:4000) в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} добавляли на планшет и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали еще раз, с использованием 3 циклов промывания. В конце, 40 мкл/лунку ТМБ для 1 стадии (Neogen, Лексингтон, Кентукки) добавляли на планшет и гасили с помощью 40 мкл/лунку 1 н хлористоводородной кислоты через 30 мин при комнатной температуре. Значения оптической плотности регистрировали немедленно на длине волны 450 нм с использованием устройства для считывания планшетов Titertek.

Первичный скрининг дал в общем 3104 антигенспецифичных гибридом, идентифицированных для 2 партий. На основании наибольшего значения оптической плотности в анализе ТИФА, 1500 гибридом на партию были переведены в общее количество 3000 положительных.

Подтверждающий скрининг

Далее 3000 положительных были подвергнуты вторичному скринингу на связывание с PCSK9 дикого типа, чтобы подтвердить образование стабильных гибридом. Скрининг проводили следующим образом: использовали 384-луночные планшеты Costar 3702 (Corning Life Sciences) для среды связывания. Планшеты покрывали нейтравидином в концентрации 3 мкг/мл в 1 × ФБР/0,05% азида в объеме 40 мкл/лунку. Планшеты инкубировали при 4°C на протяжении ночи. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek M384 (Titertek, Хантсвилл, Алабама). Выполня-

ли 3 цикла промывания. Планшеты блокировали 90 мкл 1 × ФБР/1% молока и инкубировали приблизительно 30 мин при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов M384. Выполняли 3 цикла промывания. В качестве образца покрытия использовали b-PCSK9, без метки V5, и добавляли в концентрации 0,9 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} в объеме 40 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали, выполняя 3 цикла промывания. 10 мкл супернатанта переносили в 40 мкл 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Планшеты снова промывали с помощью устройства для промывания планшетов Titertek, с использованием 3 циклов промывания. 40 мкл/лунку козьего анти-человеческого IgG Fc пероксидазы в концентрации 100 нг/мл (1:4000) в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} добавляли на планшет и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали еще раз, с использованием 3 циклов промывания. В конце, 40 мкл/лунку ТМБ для 1 стадии (Neogen, Лексингтон, Кентукки) добавляли на планшет и гасили с помощью 40 мкл/лунку 1 н хлористоводородной кислоты через 30 мин при комнатной температуре. Значения оптической плотности регистрировали немедленно на длине волны 450 нм с использованием устройства для считывания планшетов Titertek. Всего 2441 положительных были повторены при вторичном скрининге. Эти антитела далее использовали для последующего скрининга.

Скрининг перекрестной реактивности с мышиными белками

Далее проводили скрининг панели гибридом на предмет перекрестной реактивности с мышиным PCSK9, чтобы убедиться в том, что антитела могут связываться как с человеческим, так и мышиным PCSK9. Следующий протокол использовали для скрининга перекрестной реактивности: использовали 384-луночные планшеты Costar 3702 (Corning Life Sciences) для среды связывания. Планшеты покрывали нейтравидином в концентрации 3 мкг/мл в 1 × ФБР/0,05% азида в объеме 40 мкл/лунку. Планшеты инкубировали при 4°C на протяжении ночи. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek M384 (Titertek, Хантсвилл, Алабама). Выполняли 3 цикла промывания. Планшеты блокировали 90 мкл 1 × ФБР/1% молока и инкубировали приблизительно 30 мин при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek. Выполняли 3 цикла промывания. В качестве образца покрытия использовали биотинилированный мышиный PCSK9, и добавляли в концентрации 1 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} в объеме 40 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали с помощью устройства для промывания планшетов Titertek, с использованием 3 циклов промывания. 50 мкл супернатанта переносили на планшеты и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты снова промывали с использованием 3 циклов промывания. 40 мкл/лунку козьего анти-человеческого IgG Fc пероксидазы в концентрации 100 нг/мл (1:4000) в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} добавляли на планшет, и планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали еще раз, с использованием 3 циклов промывания. В конце, 40 мкл/лунку ТМБ для 1 стадии (Neogen, Лексингтон, Кентукки) добавляли на планшет и гасили с помощью 40 мкл/лунку 1 н хлористоводородной кислоты через 30 мин при комнатной температуре. Значения оптической плотности регистрировали немедленно на длине волны 450 нм с использованием устройства для считывания планшетов Titertek. Для 579 антител наблюдалась перекрестная реактивность с мышиным PCSK9. Далее эти антитела были использованы для последующего скрининга.

Скрининг связывания с мутантным D374Y

Мутация D374Y в PCSK9 документирована в человеческой популяции (например, Timms KM et al., "A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree", Hum. Genet. 114:349-353, 2004). Для того чтобы определить, были ли антитела специфичными для дикого типа или также связывались с формой PCSK9 D374Y, проводили дополнительный скрининг образцов на связывание с мутантной последовательностью PCSK9, содержащей мутацию D374Y. Протокол скрининга был следующим: в ходе скрининга использовали 384-луночные планшеты Costar 3702 (Corning Life Sciences) для среды связывания. Планшеты покрывали нейтравидином в концентрации 4 мкг/мл в 1 × ФБР/0,05% азида в объеме 40 мкл/лунку. Планшеты инкубировали при 4°C на протяжении ночи. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek M384 (Titertek, Хантсвилл, Алабама). Выполняли 3 цикла промывания. Планшеты блокировали 90 мкл 1 × ФБР/1% молока и инкубировали приблизительно 30 мин при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek. Выполняли 3 цикла промывания. Планшеты покрывали биотинилированным человеческим PCSK9 D374Y в концентрации 1 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали с помощью устройства для промывания планшетов Titertek. Выполняли 3 цикла промывания. Поздний супернатант культуры гибридомы разбавляли 1:5 в ФБР/молоко/Ca^{2+} (10 плюс 40 мл) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее, 40 мкл/лунку кроличьего анти-человеческого PCSK9 (Cayman Chemical) и человеческого анти-His 1.2.3 1:2 в концентрации 1 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} титровали на планшеты, которые затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее планшеты промывали еще раз, с использованием устройства для промывания планшетов Titertek.

Выполняли 3 цикла промывания. 40 мкл/лунку козьего анти-человеческого IgG Fc ПХ в концентрации 100 нг/мл (1:4000) в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} добавляли на планшет и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. 40 мкл/лунку козьего анти-кроличьего IgG Fc ПХ в концентрации 100 нг/мл (1:4000) в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} добавляли на планшет, и планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek. Выполняли 3 цикла промывания. В конце, 40 мкл/лунку ТМБ для 1 стадии (Neogen, Лексингтон, Кентукки) добавляли на планшет и гасили с помощью 40 мкл/лунку 1 н хлористоводородной кислоты через 30 мин при комнатной температуре. Значения оптической плотности регистрировали немедленно на длине волны 450 нм с использованием устройства для считывания планшетов Titertek. Свыше 96% положительных антител относительно PCSK9 дикого типа также связывались с мутантным PCSK9.

Скрининг блокирования лиганда рецептора в больших масштабах

Для скрининга на антитела, которые блокируют связывание PCSK9 с ЛПНПР, был разработан анализ с применением мутанта D374Y PCSK9. Мутант использовали для данного анализа, поскольку он обладает более высоким сродством связывания с ЛПНПР, что позволяет разработать более чувствительный анализ блокирования лиганда рецептора. Следующий протокол использовали для скрининга блокирования лиганда рецептора: в ходе скрининга использовали 384-луночные планшеты Costar 3702 (Coining Life Sciences) для среды связывания. Планшеты покрывали козьим анти-ЛПНПР (R&D кат. № AF2148) в концентрации 2 мкг/мл в 1 × ФБР/0,05% азида в объеме 40 мкл/лунку. Планшеты инкубировали при 4°C на протяжении ночи. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek M384 (Titertek, Хантсвилл, Алабама). Выполняли 3 цикла промывания. Планшеты блокировали 90 мкл 1 × ФБР/1% молока и инкубировали приблизительно 30 мин при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek. Выполняли 3 цикла промывания. В качестве образца покрытия использовали ЛПНПР (R&D, кат. № 2148LD/CF), и добавляли в концентрации 0,4 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} в объеме 40 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 1 ч 10 мин при комнатной температуре. Одновременно, 20 нг/мл биотинилированного человеческого D374Y PCSK9 инкубировали с 15 мкл позднего супернатанта гибридомы в полипропиленовых планшетах Nunc, и концентрацию позднего супернатанта разбавляли 1:5. Далее планшеты предварительно инкубировали в течение около 1 часа 30 мин при комнатной температуре. Затем планшеты промывали с помощью устройства для промывания планшетов Titertek, с применением 3 циклов промывания. 50 мкл/лунку предварительно инкубированной смеси переносили на покрытые ЛПНПР планшеты ТИФА и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Чтобы обнаружить ЛПНПР-связанный b-PCSK9, 40 мкл/лунку стрептавидина ПХ в концентрации 500 нг/мл в разбавителе анализа добавляли на планшеты. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее планшеты снова промывали с применением устройства для промывания планшетов Titertek. Выполняли 3 цикла промывания. В конце 40 мкл/лунку ТМБ для 1 стадии (Neogen, Лексингтон, Кентукки) добавляли на планшет, и через 30 мин гасили с помощью 40 мкл/лунку 1 н хлористоводородной кислоты при комнатной температуре. Значения оптической плотности регистрировали немедленно на длине волны 450 нм с применением устройства для считывания планшетов Titertek. Скрининг идентифицировал 384 антитела, которые эффективно блокируют взаимодействие между PCSK9 и ЛПНПР, причем 100 антител блокировали взаимодействие с высокой активностью (OD<0,3). Указанные антитела препятствовали взаимодействию связывания PCSK9 с ЛПНПР более чем на 90% (ингибирование более чем на 90%).

Анализ связывания с лигандом рецептора на подмножестве блокаторов

Далее анализ лиганда рецептора повторяли с применением мутантного фермента на подмножестве из 384 нейтрализующих членов, идентифицированных в первом анализе ингибирования лиганда рецептора в большом масштабе. Такой же протокол использовали для скринингового анализа подмножества из 384 блокирующих членов, как проводили для скрининга блокирования лиганда рецептора в большом масштабе. Данный повторный скрининг подтвердил данные начального скрининга.

Данный скрининг подмножества из 384 членов идентифицировал 85 антител, которые блокируют взаимодействие между мутантным ферментом PCSK9 и ЛПНПР более чем на 90%.

Анализ связывания с лигандом рецептора блокаторов, которые связываются с PCSK9 дикого типа, но не с мутантом D374Y

В начальной панели из 3000 супернатантов присутствовали 86 антител, которые продемонстрировали специфичное связывание с PCSK9 дикого типа, но не с мутантом huPCSK9(D374Y). Данные 86 супернатантов были проверены на предмет способности блокировать связывание PCSK9 дикого типа с рецептором ЛПНПР. Выполняли следующий протокол: в ходе скрининга использовали 384-луночные планшеты Costar 3702 (Coining Life Sciences) для среды связывания. Планшеты покрывали анти-HIS 1.2.3 в концентрации 10 мкг/мл в 1 × ФБР/0,05% азида в объеме 40 мкл/лунку. Планшеты инкубировали при 4°C на протяжении ночи. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek M384 (Titertek, Хантсвилл, Алабама). Выполняли 3 цикла промывания. Планшеты

блокировали 90 мкл 1 × ФБР/1% молока и инкубировали приблизительно 30 мин при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek. Выполняли 3 цикла промывания. ЛПНПР (R&D Systems, кат. № 2148LD/CF или R&D, № 2148LD) добавляли в концентрации 5 мкг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} в объеме 40 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали с помощью устройства для промывания планшетов Titertek, с использованием 3 циклов промывания. Одновременно, биотинилированный человеческий PCSK9 дикого типа предварительно инкубировали с поздним супернатантом гибридомы в полипропиленовых планшетах Nunc. 22 мкл супернатанта гибридомы переносили в 33 мкл b-PCSK9 в концентрации 583 нг/мл в 1 × ФБР/1% молока/10 мМ Ca^{2+} с получением конечной концентрации b-PCSK9=350 нг/мл и позднего супернатанта в конечном разведении 1:2,5. Планшеты предварительно инкубировали приблизительно в течение 1 ч и 30 мин при комнатной температуре. 50 мкл/лунку предварительно инкубированной смеси переносили на покрытые ЛПНПР планшеты ТИФА и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek. Выполняли 3 цикла промывания. На планшеты добавляли 40 мкл/лунку стрептавидина ПХ в концентрации 500 нг/мл в разбавителе анализа. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее планшеты промывали с использованием устройства для промывания планшетов Titertek. Выполняли 3 цикла промывания. В конце, 40 мкл/лунку ТМБ для 1 стадии (Neogen, Лексингтон, Кентукки) добавляли на планшет и через 30 мин гасили с помощью 40 мкл/лунку 1 н хлористоводородной кислоты при комнатной температуре. Значения оптической плотности регистрировали немедленно на длине волны 450 нм с использованием устройства для считывания планшетов Titertek.

Результаты скрининга

На основании результатов описанных анализов, несколько линий гибридомы был идентифицированы как продуцирующие антитела с желательным взаимодействием с PCSK9. Ограниченное разведение применяли для выделения управляемого количества клонов из каждой линии. Клоны были обозначены по номеру линии гибридомы (например, 21B12) и номеру клона (например, 21B12.1). В целом, функциональные анализы, описанные в данном описании, не выявили разницы между различными клонами конкретной линии. В нескольких случаях, были идентифицированы клоны из конкретной линии, которые вели себя иначе в функциональных анализах, например, было обнаружено, что 25A7.1 не блокирует PCSK9/ЛПНПР, тогда как 25A7.3 (здесь и в дальнейшем 25A7) является нейтрализующим. Каждый из выделенных клонов помещали в 50-100 мл среды гибридомы и позволяли расти до истощения (т.е. жизнеспособность клетки менее чем около 10%). Концентрацию и активность антител против PCSK9 в супернатантах таких культур определяли методом ТИФА и функциональными тестами in vitro, как описано в данном описании. В результате скрининга, описанного в данном описании, были идентифицированы гибридомы с самыми высокими титрами антител против PCSK9. Отобранные гибридомы показаны на фиг. 2A-3D и в табл. 2.

Пример 4.1.

Продуцирование гибридомами человеческих антител 31H4 IgG4.

Данный пример, в общем, описывает, каким образом один из антигенсвязывающих белков был получен от линии гибридомы. Для работы по продуцированию применяли генерации 50 мкл позднего супернатанта, с последующей очисткой протеином А. Продуцирование Integra применяли для масштаба и проводили позже. Линия гибридомы 31H4 была выращена в колбах T75 в 20 мл среды (Integra Media, табл. 5). Когда гибридома практически достигала слияния в колбах T75, ее перемещали в колбу Integra (Integra Biosciences, Integra CL1000, кат. № 90005).

Колба Integra представляет собой колбу для культуры клеток, которая разделена мембраной на две камеры, маленькую камеру и большую камеру. Объем клеток гибридомы 20-30 мл с минимальной полностью клеток 1×10^6 клеток на мл от линии гибридомы 31H4 помещали в маленькую камеру колбы Integra в среде Integra (см. табл. 5 относительно компонентов среды Integra). Только среду Integra (1 л) помещали в большие камеры колб Integra. Мембрана, разделяющая две камеры, проницаема для низкомолекулярных питательных веществ, но герметична для клеток гибридомы и антител, выработанных такими клетками. Таким образом, клетки гибридомы и антитела, выработанные такими клетками гибридомы, удерживались в маленькой камере.

Через 1 неделю среды удаляли из обеих камер колбы Integra и заменяли свежими средами Integra. Собранные среды из маленьких камер хранили отдельно. После второй недели роста, среды из маленьких камер собирали снова. Собранные среды недели 1 для линии гибридомы объединяли с собранными средами недели 2 линии гибридомы. Полученный образец собранных сред линии гибридомы центрифугировали для удаления клеток и обломков (15 мин при 3000 об/мин), и полученный супернатант фильтровали (0,22 мкм). Осветленные кондиционированные среды загружали на колонку протеин А Сефарозы. Необязательно, среды сначала можно концентрировать, а затем загружать на колонку протеин А Сефарозы. Неспецифическое связывание исключали интенсивным промыванием ФБР. Связанные белки антитела на колонке протеина А извлекали стандартной кислотной элюацией антител из колонок протеина А

(например, 50 Мм цитрата, pH 3,0). Агрегированные белки антител из пула протеина А Сефарозы удаляли эксклюзионной хроматографией или ионообменной хроматографией связывания на анионообменной смоле, такой как смола Q Сефароза. Конкретные условия ионного обмена для белков 31H4 представляли собой Q-Сефарозу HP при pH 7,8-8,0. Антитело элюировали с градиентом NaCl 10-500 мМ в 25 объемах колонки.

Таблица 5

Состав сред

СРЕДЫ INTEGRA
Бессывороточная среда для выращивания гибридом
10% сыворотки с ультранизким содержанием IgG
2 ммоль/л L-глутамина
1% заменимых аминокислот
4 г/л глюкозы

Пример 4.2.

Продуцирование рекомбинантных человеческих антител 31H4 IgG2 трансфицированными клетками.

В данном примере проиллюстрировано в общих чертах, каким образом антитела 31H4 IgG2 были продуцированы трансфицированными клетками. Клетки 293 для временной экспрессии и клетки CHO для стабильной экспрессии были трансфицированы плазмидами, которые кодируют тяжелые и легкие цепи 31H4. Кондиционированные среды от трансфицированных клеток извлекали, удаляя клетки и осколки клеток. Осветленные кондиционированные среды загружали на колонку протеин А Сефарозы. Необязательно, среды сначала можно концентрировать, а затем загружать на колонку протеин А Сефарозы. Неспецифическое связывание исключали интенсивным промыванием ФБР. Связанные белки антитела на колонке протеина А извлекали стандартной кислотной элюацией антител из колонок протеина А (например, 50 мМ цитрата, pH 3,0). Агрегированные белки антител из пула протеина А Сефарозы удаляли эксклюзионной хроматографией или ионообменной хроматографией связывания на анионообменной смоле, такой как смола Q Сефароза. Конкретные условия ионного обмена для белков 31H4 представляли собой Q-Сефарозу HP при pH 7,8-8,0. Антитело элюировали с градиентом NaCl 10-500 мМ в 25 объемах колонки.

Пример 5.

Продуцирование гибридомами человеческих антител 21B12 IgG4.

В данном примере проиллюстрировано в общих чертах, каким образом антитела 21B12 IgG4 было продуцированным гибридомами. Линию гибридом 21B12 выращивали в колбах T75 в средах (Integra Media, табл. 5). Когда гибридомы практически достигали слияния в колбах T75, их перемещали в колбы Integra (Integra Biosciences, Integra CL1000, кат. № 90005).

Колба Integra представляет собой колбу для культуры клеток, которая разделена мембраной на две камеры, маленькую камеру и большую камеру. Объем клеток гибридомы 20-30 мл с минимальной плотностью клеток 1×10^6 клеток на мл от линии гибридомы 31H4 помещали в маленькую камеру колбы Integra в среде Integra (см. табл. 5 относительно компонентов среды Integra). Только среду Integra (1 л) помещали в большие камеры колб Integra. Мембрана, разделяющая две камеры, проницаема для низкомолекулярных питательных веществ, но герметична для клеток гибридомы и антител, выработанных такими клетками. Таким образом, клетки гибридомы и антитела, выработанные такими клетками гибридомы, удерживались в маленькой камере.

Через 1 неделю среды удаляли из обеих камер колбы Integra и заменяли свежими средами Integra. Собранные среды из маленьких камер хранили отдельно. После второй недели роста, среды из маленьких камер собирали снова. Собранные среды недели 1 для линии гибридомы объединяли с собранными средами недели 2 линии гибридомы. Полученный образец собранных сред линии гибридомы центрифугировали для удаления клеток и обломков (15 мин при 3000 об/мин), и полученный супернатант фильтровали (0,22 мкм). Осветленные кондиционированные среды загружали на колонку протеин А Сефарозы. Необязательно, среды сначала можно концентрировать, а затем загружать на колонку протеин А Сефарозы. Неспецифическое связывание исключали интенсивным промыванием ФБР. Связанные белки антитела на колонке протеина А извлекали стандартной кислотной элюацией антител из колонок протеина А (например, 50 мМ цитрата, pH 3,0). Агрегированные белки антител из пула протеина А Сефарозы удаляли эксклюзионной хроматографией или ионообменной хроматографией связывания на анионообменной смоле, такой как смола Q Сефароза. Конкретные условия ионного обмена для белков 21B12 представляли собой Q-Сефарозу HP при pH 7,8-8,0. Антитело элюировали с градиентом NaCl 10-500 мМ в 25 объемах колонки.

Пример 6.

Продуцирование человеческих антител 21B12 IgG2 трансфицированными клетками.

В данном примере проиллюстрировано в общих чертах, каким образом антитела 21B12 IgG2 были продуцированы трансфицированными клетками. Клетки (клетки 293 для временной экспрессии и клетки

CHO для стабильной экспрессии) были трансфицированы плазмидами, которые кодируют тяжелые и легкие цепи 21B12. Кондиционированные среды от трансфицированных клеток извлекали, удаляя клетки и осколки клеток. Осветленные кондиционированные среды загружали на колонку протеин А Сефарозы. Необязательно, среды сначала можно концентрировать, а затем загружать на колонку протеин А Сефарозы. Неспецифическое связывание исключали интенсивным промыванием ФБР. Связанные белки антитела на колонке протеина А извлекали стандартной кислотной элюацией антител из колонок протеина А (например, 50 мМ цитрата, pH 3,0). Агрегированные белки антител из пула протеина А Сефарозы удаляли эксклюзионной хроматографией или ионообменной хроматографией связывания на анионообменной смоле, такой как смола SP Сефароза. Конкретные условия ионного обмена для белков 21B12 представляли собой SP-Сефарозу HP при pH 5,2. Антитела элюировали в 25 объемах колонки буферного раствора с градиентом NaCl 10-500 мМ в 20 мМ натрий-ацетатном буфере.

Пример 7.

Анализ последовательности тяжелой и легкой цепей антитела.

Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот для легких и тяжелых цепей упомянутых выше антител далее были определены секвенированием нуклеотидов Sanger (дидезокси). Затем последовательности аминокислот были выведены из последовательностей нуклеиновых кислот. Последовательности нуклеиновых кислот для вариабельных доменов проиллюстрированы на фиг. 3E-3JJ.

Последовательности к ДНК для вариабельных участков легкой цепи лямбда 31H4, 21B12 и 16F12 были определены и раскрыты как SEQ ID NO: 153, 95 и 105 соответственно.

Последовательности кДНК для вариабельных участков тяжелой цепи 31H4, 21B12 и 16F12 были определены и раскрыты как SEQ ID NO: 152, 94 и 104 соответственно.

Константный участок легкой цепи лямбда (SEQ ID NO: 156) и константные участки тяжелой цепи IgG2 и IgG4 (SEQ ID NO: 154 и 155) проиллюстрированы на фиг. 3KK.

Были определены последовательности полипептидов, предсказанные для каждой из таких последовательностей кДНК Предсказанные последовательности полипептидов для вариабельных участков легкой цепи лямбда 31H4, 21B12 и 16F12 были предсказаны и раскрыты как SEQ ID NO: 12, 23 и 35, соответственно, константного участка легкой цепи лямбда (SEQ ID NO: 156), для вариабельных участков тяжелой цепи 31H4, 21B12 и 16F12 были предсказаны и раскрыты как (SEQ ID NO: 67, 49 и 79 соответственно. Константные участки тяжелой цепи IgG2 и IgG4 (SEQ ID NO: 154 и 155).

Деление на FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 показано на фиг. 2A-3D.

На основании данных последовательности, были определены гены зародышевой линии, из которых был получен каждый вариабельный участок тяжелой цепи или легкой цепи. Идентичность генов зародышевой линии указана после соответствующей линии гибридомы на фиг. 2A-3D, и каждый представлен уникальным SEQ ID NO. Фиг. 2A-3D также иллюстрируют некоторые последовательности аминокислот для дополнительных антител, которые были охарактеризованы.

Пример 8.

Характеристика связывания антител с PCSK9.

После идентификации ряда антител, которые связываются с PCSK9, несколько подходов использовались для количественного определения и дополнительной характеристики природы связывания. В одном из аспектов исследования выполняли анализ сродства Biacore. В другом аспекте исследования выполняли анализ сродства KinExA®. Образцы и буферы, используемые в данных исследованиях, представлены в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Образец	**[Образец] мг/мл**	**Буфер**	**[Образец] мкМ**
hPCSK9	1,26	ФБР	16,6
mPCSK9-8xHIS	1,44	ФБР	18,9
cPCSK9-V5-6xHIS	0,22	ФБР	2,9
16F12, анти-PCSK9 huIgG4	4,6	20 мМ NaOAC, pH 5,2, 50 мМ NaCl	31,9
21B12, анти-PCSK9 huIgG4	3,84	10 мМ NAOAC, pH 5,2, 9% сахарозы	27,0
31H4, анти-PCSK9 huIgG4	3,3	10 мМ NAOAC, pH 5,2, 9% сахарозы	22,9

Измерение сродства BIACORE®

Анализ сродства BIAcore® (устройство резонанса поверхностного плазмона, Biacore, Inc., Пискатауэй, Нью-Джерси) для антител 21B12 против PCSK9, описанный в данном примере, выполнялся согласно инструкциям производителя.

Если коротко, эксперименты с резонансом поверхностного плазмона выполнялись с применением оптических биодатчиков Biacore 2000 (Biacore, Healthcare GE, Пискатауэй, Нью-Джерси). Каждое индивидуальное анти-PCSK9 антитело иммобилизировали на чипе биодатчика категории "для исследований" CM5 путем аминного сочетания при уровнях, которые давали максимальную реакцию (Rmax) связывания анализируемого вещества не более чем 200 единиц резонанса (RU, EP). Концентрацию белка PCSK9 варьировали с 2-кратными промежутками (анализируемое вещество) и вводили инъекционно над поверхностью с иммобилизированным антителом (со скоростью потока 100 мкл/мин в течение 1,5 мин). Свежий буфер HBS-P (pH 7,4, 0,01 M Hepes, 0,15 M NaCl, 0,005% поверхностно-активных веществ P-20, Biacore) с добавлением 0,01% альбумина телячьей сыворотки (ATC) использовали в качестве буфера связывания. Сродство связывания для каждого анти-PCSK9 антитела измеряли в отдельных экспериментах против каждого из белков PCSK9 человека, мыши и яванской макаки при pH 7,4 (используемые концентрации составляли 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 и 0 нМ).

Кроме того, сродство связывания антитела с PCSK9 человека также измеряли при pH 6,0 с применением буфера HBS-P, pH 6.0 (pH 6,0, 0,01 M Hepes, 0,15 M NaCl, 0,005% поверхностно-активных веществ P-20, Biacore) с добавлением 0,01% ATC. Полученный сигнал связывания был пропорционален содержанию свободного PCSK9 в растворе. Равновесная константа диссоциации (K_D) была получена в результате нелинейного регрессионного анализа кривых конкуренции с применением однородной модели гомогенного связывания на одном сайте с двойной кривой (программное обеспечение KinExA®, Sapidyne Instruments Inc., Boise, Индиана) (n=1 для циклов с pH 6,0). Интересно, что антитела, по-видимому, демонстрируют более высокое сродство связывания при более низких значениях pH (при которых K_d составляла 12,5, 7,3 и 29 пМ для 31H4, 21B12 и 16F12, соответственно).

Кинетические параметры связывания антитела, в том числе k_a (константа скорости ассоциации), K_d (константа скорости диссоциации) и K_D (равновесная константа диссоциации) были определены с применением компьютерной программы оценки BIA 3.1 (BIAcore, Inc. Пискатауэй, Нью-Джерси). Более низкие значения равновесной константы диссоциации указывают на более высокое сродство антитела к PCSK9. Значения K_D, определенные анализом сродства BIAcore®, приведены табл. 7.1 ниже.

Таблица 7.1

Антитело	hPCSK9 (человека)	CynoPCSK9 (яванской макаки)	mPCSK9 (мыши)
31H4	210 пМ	190 пМ	6 нМ
21B12	190 пМ	360 пМ	460 нМ
16F12	470 пМ	870 пМ	6.4 нМ

В табл. 7.2 проиллюстрированы скорости k_{on} и k_{off}.

Таблица 7.2

-	K_{on} (M-1 c-1)	K_{off} (c-1)	K_D
31H4.1, pH 7,4	2,45 e+5	5,348 e-5	210 пМ
31H4.1, pH 6	5,536 e+6	6,936 e-5	12,5 пМ
21B12.1, pH 7,4	3,4918 e+4	6,634 e-6	190 пМ
21B12.1, pH 6	2,291 e+6	1,676 e-5	7,3 пМ
16F12.1, pH 7,4	1,064 e+5	4,983 e-5	470 пМ
16F12.1, pH 6	2,392 e+6	7,007 e-5	29 пМ

Измерение сродства KinExA®

Анализ сродства KinExA® (Sapidyne Instalments, Inc., Boise, Индиана) 16F12 и 31H4 выполняли согласно инструкциям производителя. Если коротко, Reacti-Gel™ (6x) (Pierce) предварительно покрывали одним из белков PCSK9 человека, яванской макаки с меткой V5 или мыши с меткой His и блокировали ATC. 10 или 100 пМ антитела 31H4, и далее инкубировали с различными концентрациями (от 0,1 пМ до 25 нМ) белков PCSK9 при комнатной температуре в течение 8 ч перед пропусканием через покрытые PCSK9 гранулы. Количество связанного с гранулой 31H4 определяли с помощью козьего античеловеческого IgG (H+L) антитела с флуоресцентной меткой (Cy5) (Jackson Immuno Research). Сигнал связывания пропорционален концентрации свободного 31H4 в равновесии связывания. Равновесная константа дис-

социации (K_D) была получена в результате нелинейной регрессии двух наборов кривых конкуренции с использованием модели гомогенного связывания на одном сайте. В анализе использовали программное обеспечение KinExA® Pro. Кривые связывания, генерируемые в данном анализе, проиллюстрированы на фиг. 4A-4F.

Как 16F12, так и 31H4 антитела продемонстрировали подобное сродство к PCSK9 человека и яванской макаки, но приблизительно в 10-250 раз более низкое сродство к PCSK9 мыши. Из двух антител, исследованных с использованием системы KinExA®, антитело 31H4 продемонстрировало более высокое сродство к PCSK9 как человека, так и яванской макаки, со значением K_D 3 и 2 пМ соответственно. 16F12 продемонстрировало несколько более низкое сродство со значением K_D 15 пМ в случае PCSK9 человека, и K_D 16 пМ в случае PCSK9 яванской макаки.

Результаты анализа сродства KinExA® суммированы в табл. 8.1 ниже.

Таблица 8.1

	hPCSK9		cPCSK		mPCSK	
Образец	**K_D (пМ)**	доверительный интервал 95%	**K_D (пМ)**	доверительный интервал 95%	**K_D (пМ)**	доверительный интервал 95%
31H4.1	3	1~5	2	1~3	500	400~620

Дополнительно, проводили анализ SDS-PAGE, чтобы проверить качество и количество образцов; результаты показаны на фиг. 5A. cPCSK9 продемонстрировал результат на около 50% меньше на геле, а также от активной концентрации связывания, вычисленной на основании анализа KinExA®. Таким образом, K_d mAb против cPCSK9 была скорректирована с учетом присутствия 50% активного CPCSK9.

Анализ равновесного связывания в растворе BIAcore использовали для измерения значений K_d для АСБ 21B12. 21B12.1 продемонстрировал низкий сигнал в анализе KinExA, поэтому применяли анализ равновесия в растворе Biacore. Поскольку не наблюдалось значимого связывания при связывании антител с поверхностью с иммобилизированным PCSK9, антитело 21B12 было иммобилизировано на проточной кювете 4 чипа CM5 с применением аминного сочетания с плотностью около 7000 EP.

Проточную кювету 3 использовали в качестве контроля фона. 0,3, 1 и 3 нМ PCSK9 человека или PCSK9 яванской макаки смешивали с серийными разведениями образцов антитела 21B12.1 (которые варьировали от 0,001 до ~25 нМ) в ФБР плюс 0,1 мг/мл АСТ, 0,005% P20. Связывание свободного PCSK9 в смешанных растворах измеряли путем инъекции над поверхностью антитела 21B12.1. 100% сигнал связывания PCSK9 на поверхности 21B12.1 был определен в отсутствие mAb в растворе. Сниженный ответ в форме связывания с PCSK9 с повышением концентраций mAb показывал связывание PCSK9 с mAb в растворе, который блокировал связывание PCSK9 с поверхностью с иммобилизированным пептителом. После нанесения на график сигнала связывания PCSK9 против концентраций mAb, было вычислено значение K_D на основе трех наборов кривых (фиксированная концентрация PCSK9 0,3, 1 и 3 нМ) с применением модели гомогенного связывания на одном сайте в программном обеспечении KinExA Pro™. Хотя cPCSK9 содержит более низкую концентрацию белка по данным анализа KinExA и геля натрия лаурилсульфата, его концентрация не была скорректирована в данном исследовании, поскольку концентрация cPCSK9 не использовалась для вычисления K_d. Результаты показаны в табл. 8.2 ниже и на фиг. 5B-5D. Фиг. 5B иллюстрирует результаты анализа равновесия в растворе для hPCSK9 при трех различных концентрациях hPCSK9. Фиг. 5C иллюстрирует подобный набор результатов для mPCSK9. Фиг. 5D иллюстрирует результаты описанного выше анализа захвата Biacore.

Таблица 8.2

	hPCSK9		cPCSK		mPCSK	
Образец	**K_D (пМ)**	доверительный интервал 95%	**K_D (пМ)**	доверительный интервал 95%	**K_D (пМ)**	доверительный интервал 95%
21B12.1	15	9~23	11	7~16	17 000	–

Пример 9.

Эффективность блокирования связывания D374Y PCSK9/ЛПНПР под действием 31H4 и 21B12.

Данный пример обеспечивает значения IC_{50} для двух из антител, обладающих способностью блокировать связывание PCSK9 D374Y с ЛПНПР. Прозрачные 384-луночные планшеты (Coster) покрывали 2 мкг/мл козьего антитела против рецептора ЛПНП (R&D Systems), разбавленного буферным раствором A(100 мМ натрия какодилата, pH 7,4). Планшеты тщательно промывали буферным раствором A, а затем блокировали в течение 2 ч буферным раствором B (1% молока в буферном растворе A). После промывания планшеты инкубировали в течение 1,5 ч с 0,4 мкг/мл рецептора ЛПНП (R&D Systems), разбавленного буферным раствором C (буферный раствор B с добавлением 10 мМ CaC12). Параллельно с данной инкубацией, 20 нг/мл биотинилированного D374Y PCSK9 инкубировали с различными концентрациями антител 31H4 IgG2, 31H4 IgG4, 21B12 IgG2 или 21B12 IgG4, которые были разбавлены буферным раствором A, или только с буферным раствором A (контроль). Содержащие рецептор ЛПНП планшеты про-

мывали, биотинилированную смесь D374Y PCSK9/антитело переносили в них и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Связывание биотинилированного D374Y с рецептором ЛПНП обнаруживали инкубацией со стрептавидин-ПХ (Biosource) в концентрации 500 нг/мл буферного раствора С, с последующим добавлением субстрата ТМБ (KPL). Сигнал гасили 1 н HCl и считывали поглощение на длине волны 450 нм.

Результаты данного исследования связывания показаны на фиг. 6A-6D. Суммарно, значения ICso были определены для каждого антитела и составляли 199 пМ для 31H4 IgG2 (фиг. 6A), 156 пМ для 31H4 IgG4 (фиг. 6B), 170 пМ для 21B12 IgG2 (фиг. 6C), и 169 пМ для 21B12 IgG4 (фиг. 6D).

В данном анализе антитела также блокировали связывание PCSK9 дикого типа с ЛПНПР.

Пример 10.

Анализ захвата ЛПНП клетками.

Данный пример демонстрирует способность различных антигенсвязывающих белков уменьшать захват ЛПНП клетками. Человеческие клетки HepG2 высевали в 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном (Costar) в концентрации 5×10^5 клеток на лунку в среде МДСИ (Mediatech, Inc) с добавлением 10% сыворотки телячьего эмбриона и инкубировали при 37°C (5% CO_2) на протяжении ночи. Для образования комплекса PCSK9 и антитела, 2 мкг/мл человеческого D374Y PCSK9 инкубировали с различными концентрациями антитела, разбавленного буферным раствором захвата (МДСИ, содержащая 1% сыворотки телячьего эмбриона), или только с буферным раствором захвата (контроль) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания клеток ФБР, смесь D374Y PCSK9/антитело переносили в кюветы, после чего добавляли ЛПНП-BODIPY (Invitrogen), разбавленный буферным раствором захвата до конечной концентрации 6 мкг/мл. После инкубации в течение 3 ч при 37°C (5% CO_2) клетки тщательно промывали ФБР, и сигнал флуоресценции в кювете определяли с помощью Safire™ (TECAN) на длине волны 480-520 нм (возбуждение) и 520-600 нм (эмиссия).

Результаты анализа захвата клетками проиллюстрированы на фиг. 7A-7D. Суммарно, значения IC_{50} были определены для каждого антитела и составляли 16,7 нМ для 31H4 IgG2 (фиг. 7A), 13,3 нМ для 31H4 IgG4 (фиг. 7B), 13,3 нМ для 21B12 IgG2 (фиг. 7C) и 18 нМ для 21B12 IgG4 (фиг. 7D). Полученные результаты демонстрируют, что применение антигенсвязывающих белков может уменьшать блокирующее влияние PCSK9 (D374Y) на захват ЛПНП клетками. Антитела также блокировали влияние PCSK9 дикого типа в данном анализе.

Пример 11.

Снижение уровня холестерина в сыворотке под действием антитела 31H4 в 6-дневном исследовании.

Для того чтобы оценить снижение общего холестерина (ОХ) сыворотки у мышей дикого типа (ДТ) при лечении антителом против белка PCSK9, выполняли следующую методику.

Мышей-самцов ДТ (порода C57BL/6, возраст 9-10 недель, 17-27 г), полученных от Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) кормили обычным кормом (Harland-Teklad, рацион 2918) на протяжении всего эксперимента. Мышам вводили анти-PCSK9 антитело 31H4 (2 мг/мл в ФБР) или IgG (2 мг/мл в ФБР) в количестве 10 мкг/кг в хвостовую вену в T=0. Наивные мыши были также оставлены в качестве группы наивного контроля. Дозы в группах и время умерщвления приведены в табл. 9.

Таблица 9

Группа	Лечение	Временная точка после введения дозы	Кол-во
1	IgG	8 час	7
2	31H4	8 час	7
3	IgG	24 час	7
4	31H4	24 час	7
5	IgG	72 час	7
6	31H4	72 час	7
7	IgG	144 час	7
8	31H4	144 час	7
9	Наивные	н/в	7

Мышей умерщвляли асфиксией CO_2 в предварительно определенных точках времени, приведенных в табл. 9. Кровь собирали через полую вену в пробирку Эппендорфа и позволяли свертываться при комнатной температуре в течение 30 мин. Далее образцы центрифугировали в настольной центрифуге при 12000×g в течение 10 мин для отделения сыворотки. Общий холестерин сыворотки и ЛПВП-Х измеряли с применением клинического анализатора Hitachi 912 и наборов Roche/Hitachi для определения ОХ и ЛПВП-Х.

Результаты эксперимента проиллюстрированы на фиг. 8A-8D. Суммарно, мыши, которым вводили антитело 31H4, продемонстрировали сниженные уровни холестерина сыворотки на протяжении эксперимента (фиг. 8A и 8B). Кроме того, отмечается, что мыши также продемонстрировали сниженные уровни ЛПВП (фиг. 8C и 8D). Для фиг. 8A и 8C процент изменения показан в соотношении к контролю IgG в той же временной точке (* P<0,01, # P<0,05). Для фиг. 8B и 8D, процент изменения показан в соотношении к уровням общего холестерина сыворотки и ЛПВП, измеренным у наивных животных в t=0 ч (*

P<0,01, # P<0,05).

С учетом сниженных уровней ЛПВП, отмечается, что специалисту в данной области будет понятно, что снижение уровня ЛПВП у мышей не является показателем того, что снижение уровня ЛПВП будет происходить у человека, и отображает только то, что уровень холестерина сыворотки в организме снижен. Отмечается, что в организме мышей большая часть холестерина сыворотки переносится в форме частиц липопротеина высокой плотности (ЛПВП), что отличается от человека, у которого большую часть холестерина сыворотки переносят частицы ЛПНП. У мышей измерение общего холестерина сыворотки более всего сходно с уровнем ЛПВП-Х в сыворотке. ЛПВП мыши содержит аполипопротеин Е (apoE), который является лигандом для рецептора ЛПНП (ЛПНПР) и позволяет его клиренс под действием ЛПНПР. Таким образом, исследование ЛПВП представляет собой пригодный показатель для настоящего примера у мышей (с пониманием того, что снижение ЛПВП у человека не ожидается). Например, ЛПВП человека, наоборот, не содержит apoE и не является лигандом для ЛПНПР. По мере того, как антитела PCSK9 увеличивают экспрессию ЛПНПР у мыши, печень может осуществлять клиренс ЛПВП и, таким образом, снижает уровни ЛПВП-Х в сыворотке.

Пример 12.

Влияние антитела 31H4 на уровни ЛПНПР в 6-дневном исследовании.

Настоящий пример демонстрирует, что антигенсвязывающий белок изменяет уровень ЛПНПР у субъекта, как было предсказано, с течением времени. Для того чтобы выяснить влияние антитела 31H4 на уровни ЛПНПР, выполняли анализ методом вестерн-блоттинга. 50-100 мг ткани печени, полученной от умерщвленных мышей, описанных в примере 13, гомогенизировали в 0,3 мл буфера радиоиммунопреципитационного анализа (РИПА, Santa Cruz Biotechnology Inc.), содержащего полный ингибитор протеазы (Roche). Гомогенат инкубировали на льду в течение 30 мин и центрифугировали, чтобы гранулировать обломки клеток, Концентрацию белка в супернатанте измеряли с применением реактивов для анализа белка BioRad (BioRad laboratories). 100 мкг белка денатурировали при 70°C в течение 10 мин и разделяли на градиентном геле 4-12% бис-Трис натрия лаурилсульфата (Invitrogen). Белки переносили на ПВДФ мембрану с размером пор 0,45 мкм (Invitrogen) и блокировали в буфере промывания (50 мМ Трис, pH 7,5, 150 мМ NaCL, 2 мМ $CaCl_2$ и 0,05% Твина 20), содержащем 5% нежирного молока в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее пятно зондировали с козьим антителом против мышиного ЛПНПР (R&D Systems) 1:2000 или анти-β актином (Sigma) 1:2000 в течение 1 ч при комнатной температуре. Пятно коротко промывали и инкубировали с телячьим анти-козьим IgG-ПХ (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1:2000 или козьим антимышиным IgG-ПХ (Upstate) 1:2000. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре, пятно тщательно промывали, и иммунореактивные группы обнаруживали с применением набора ECL plus (Amersham biosciences). Вестерн-блот продемонстрировал повышение уровней белка ЛПНПР в присутствии антитела 31H4, как проиллюстрировано на фиг. 9.

Пример 13.

Снижение уровня холестерина в сыворотке под действием антитела 31H4 в 13-дневном исследовании.

Для того чтобы оценить снижение общего холестерина (ОХ) сыворотки у мышей дикого типа (ДТ) при лечении антителом против белка PCSK9, в 13-дневном исследовании, выполняли следующую методику.

Мышей-самцов ДТ (порода C57BL/6, возраст 9-10 недель, 17-27 г), полученных от Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) кормили обычным кормом (Harland-Teklad, рацион 2918) на протяжении всего эксперимента. Мышам вводили анти-PCSK9 антитело 31H4 (2 мг/мл в ФБР) или IgG (2 мг/мл в ФБР) в количестве 10 мкг/кг в хвостовую вену в T=0. Наивные мыши были также оставлены в качестве группы наивного контроля.

Дозы в группах и время умерщвления приведены в табл. 10. Животных умерщвляли, печень извлекали и обрабатывали, как описано в примере 13.

Таблица 10

Группа	Лечение	Временная точка после введения дозы	Кол-во	Доза
1	IgG	72 час	6	10 мкг/кг
2	31H4	72 час	6	10 мкг/кг
3	31H4	72 час	6	1 мкг/кг
4	IgG	144 час	6	10 мкг/кг
5	31H4	144 час	6	10 мкг/кг
6	31H4	144 час	6	1 мкг/кг
7	IgG	192 час	6	10 мкг/кг
8	31H4	192 час	6	10 мкг/кг
9	31H4	192 час	6	1 мкг/кг
10	IgG	240 час	6	10 мкг/кг
11	31H4	240 час	6	10 мкг/кг
12	31H4	240 час	6	1 мкг/кг
13	IgG	312 час	6	10 мкг/кг
14	31H4	312 час	6	10 мкг/кг
15	31H4	312 час	6	1 мкг/кг
16	Наивные	н/в	6	н/в

При расширении 6-дневного эксперимента до 13-дневного исследования, такое же снижающее влияние на холестерин сыворотки, которое наблюдали в 6-дневном исследовании, также наблюдалось в 13-дневном исследовании. Более конкретно, животные, которым вводили 10 мг/кг, продемонстрировали снижение холестерина сыворотки на 31% на 3-й день, и постепенный возврат к уровню до лечения на 13-й день. Фиг. 10A иллюстрирует результаты данного эксперимента. Фиг. 10C иллюстрирует результаты повторения описанной выше методики с дозой 10 мг/кг 31H4, и с другим антителом, 16F12, также в дозе 10 мкг/кг. Дозы в группах и время умерщвления приведены в табл. 11.

Таблица 11

Группа	Лечение	Временная точка после введения дозы	Кол-во	Доза
1	IgG	24 час	6	10 мкг/кг
2	16F12	24 час	6	10 мкг/кг
3	31H4	24 час	6	10 мкг/кг
4	IgG	72 час	6	10 мкг/кг
5	16F12	72 час	6	10 мкг/кг
6	31H4	72 час	6	10 мкг/кг
7	IgG	144 час	6	10 мкг/кг
8	16F12	144 час	6	10 мкг/кг
9	31H4	144 час	6	10 мкг/кг
10	IgG	192 час	6	10 мкг/кг
11	16F12	192 час	6	10 мкг/кг
12	31H4	192 час	6	10 мкг/кг
13	IgG2	240 час	6	10 мкг/кг
14	16F12	240 час	6	10 мкг/кг
15	31H4	240 час	6	10 мкг/кг
16	IgG2	312 час	6	10 мкг/кг
17	16F12	312 час	6	10 мкг/кг
18	31H4	312 час	6	10 мкг/кг
19	Наивные	н/в	6	10 мкг/кг

Как проиллюстрировано на фиг. 10C, как 16F12, так и 31H4 приводили к значимому и существенному снижению общего холестерина сыворотки уже после однократной дозы и обеспечивали благоприятный эффект в течение недели (10 дней или более). Результаты повторного 13-дневного исследования согласовались с результатами первого 13-дневного исследования, с наблюдаемым снижением уровней холестерина сыворотки на 26% на 3-й день. Для фиг. 10A и 10B процент изменения показан в соотношении к контролю IgG в той же временной точке (* $P<0,01$). Для фиг. 10C процент изменения находится в соотношении к контролю IgG в той же временной точке (* $P<0,05$).

Пример 14.

Влияние Антитела 31H4 на уровни ЛПВП в 13-дневном исследовании.

Уровни ЛПВП для животных в примере 15 также изучались. Уровни ЛПВП у мышей снижались. Более конкретно, животные, получавшие 10 мг/кг, продемонстрировали снижение уровней ЛПВП на 33% на 3-й день, с постепенным возвратом к уровням до введения дозы на 13-й день. Фиг. 10B иллюстрирует результаты эксперимента. Наблюдалось снижение уровней ЛПВП на 34% на 3-й день. Фиг. 10B иллюстрирует результаты повторного 13-дневного эксперимента.

Как будет понятно специалисту в данной области, хотя антитела снижают уровень ЛПВП у мыши, не ожидается, что это будет происходить у человека из-за отличий в ЛПВП у человека и других организмов (например, мышей). Таким образом, снижение ЛПВП у мыши не является показателем снижения

ЛПВП у человека.

Пример 15.

Повторное введение антител обеспечивает длительное благоприятное воздействие антигенсвязывающих пептидов.

Для проверки того, будут ли результаты, полученные в примерах выше, продлеваться для дополнительного благоприятного воздействия при введении дополнительных доз, эксперименты из примеров 15 и 16 повторяли со схемой введения, проиллюстрированной на фиг. 11A. Результаты проиллюстрированы на фиг. 11B. Как можно увидеть из графика на фиг. 11B, хотя обе когорты мышей продемонстрировали существенное снижение общего холестерина сыворотки, поскольку все мыши получали начальную инъекцию антигенсвязывающего белка 31H4, мыши, которые получали дополнительные инъекции АСБ 31H4, продемонстрировали длительное снижение общего холестерина сыворотки, в то время как мыши, которые получили только контрольную инъекцию, в конечном итоге продемонстрировали повышение общего холестерина сыворотки. На фиг. 11, процент изменений проиллюстрирован в соотношении к наивным животным в точке времени t=0 (* P<0,01, ** P<0,001).

Результаты данного примера демонстрируют, что, в отличие от других способов лечения холестерина, в которых повторное введение приводило к снижению эффективности из-за биологической коррекции в организме субъекта, настоящий подход, по-видимому, не страдает от данной проблемы в пределах рассматриваемого периода времени. Более того, это наводит на мысль о том, что возврат уровней общего холестерина сыворотки или холестерина ЛПВП к начальному уровню, наблюдаемый в предыдущих примерах, не является результатом сопротивления лечению, развивающегося у субъекта, но скорее истощение доступного антитела в организме субъекта.

Пример 16.

Применение антител против PCSK9 для лечения связанных с холестерином расстройств.

Больному человеку, демонстрирующему связанное с холестерином расстройство (при котором снижение уровня холестерина (например, холестерина сыворотки) может быть благоприятным), вводят терапевтически эффективное количество антитела против PCSK9, 31H4 (или, например, 21B12). Периодически в ходе лечения состояние больного контролируют, чтобы определить уменьшение симптомов расстройства. Обнаружено, что после лечения у больных, прошедших курс лечения антителом против PCSK9, уровни холестерина сыворотки были снижены, по сравнению с больными, которые не получали лечения.

Пример 17.

Применение антител против PCSK9 для лечения гиперхолестеринемии.

Больному человеку, демонстрирующему симптомы гиперхолестеринемии, вводят терапевтически эффективное количество антитела против PCSK9, 31H4 (или, например, 21B12). Периодически в ходе лечения состояние больного-человека контролируют, чтобы определить, снижается ли уровень холестерина в сыворотке. Обнаружено, что после лечения у больных, прошедших курс лечения антителом против PCSK9, уровни холестерина сыворотки были снижены, по сравнению с больными, которые не получали лечения.

Пример 18.

Применение антител против PCSK9 для предотвращения заболевания коронарных сосудов сердца и/или рецидивов сердечно-сосудистых катастроф.

Идентифицируют больного-человека, подверженного риску развития заболевания коронарных сосудов сердца. Больному вводят терапевтически эффективное количество антитела PCSK9, такого как 31H4 (или, например, 21B12), отдельно, параллельно или последовательно со статином, например, симвастатином. Периодически в ходе лечения состояние больного-человека контролируют, чтобы определить, изменяется ли уровень общего холестерина сыворотки у больного. Обнаружено, что посредством профилактического лечения у больного, получающего лечение антителами против PCSK9, уровень холестерина сыворотки снижен, таким образом, снижая риск заболеваний коронарных сосудов сердца или рецидивов сердечно-сосудистых катастроф, по сравнению с больными, не получающими лечения.

Пример 19.

Применение антигенсвязывающего белка против PCSK9 для предотвращения гиперхолестеринемии.

Больной является человеком, у которого присутствует риск развития гиперхолестеринемии, идентифицированный посредством анализа семейного анамнеза и/или образа жизни, и/или существующих уровней холестерина. Субъекту регулярно вводят (например, 1 раз в неделю) терапевтически эффективное количество антитела против PCSK9, 31H4 (или, например, 21B12). Периодически в ходе лечения состояние больного контролируют, чтобы определить, снижается ли уровень холестерина сыворотки. После лечения обнаружено, что у субъектов, прошедших курс профилактического лечения антителом против PCSK9, уровни холестерина сыворотки снижены, по сравнению с субъектами, которые не получали лечения.

Пример 20.

Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование фазы 1 с повышением дозы для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и фармакодинамики человеческого анти-PCSK9 антитела у здоровых субъектов.

Данное исследование было рандомизированным, двойным слепым, плацебо-контролируемым исследованием с повышением однократной дозы для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики, фармакодинамики (ФД) (ЛПНП-Х), и иммуногенности человеческого анти-PCSK9 антитела (моноклональное антитело 21B12) у здоровых субъектов. Субъекты были рандомизированы в соотношении 3:1 (21B12:плацебо; 8 субъектов на когорту дозы, всего 56 субъектов в 7 когортах) для получения 21B12 в дозах 7, 21, 70, 210 или 420 мг п/к, или соответствующего плацебо; или 21B12 в дозах 21 или 420 мг в/в, или соответствующего плацебо.

56 субъектов были рандомизированы и получали исследуемый продукт (42 - 21B12, 14 - плацебо); 40 субъектов (30 - 21B12, 10 - плацебо) получали исследуемый продукт п/к способом, и 16 субъектов (12 - 21B12, 4 - плацебо) получали исследуемый продукт в/в способом. 53 из 56 субъектов (95%), которые получали исследуемый продукт, завершили исследование. 3 субъекта, которые получали 21B12, отозвали полное согласие и не завершили исследования.

Популяция исследования, в основном, состояла из мужчин (54 [96%]), со средним возрастом 31,2 года (интервал: 20-45). 86% субъектов были белыми, 9% испанцами, 4% темнокожими, и 1% имели другое происхождение. Средние начальные значения ЛПНП-Х были сходны между группами лечения и варьировали от 113 до 143 мг/дл.

В данном исследовании 21B12 снижал уровень ЛПНП-Х в среднем на 55-60% в однократных дозах ≥70 мг п/к, причем длительность эффекта зависела от дозы. Самый низкий уровень ЛПНП-Х наблюдался в пределах 2 недель после введения дозы. Полное подавление PCSK9 наблюдалось при однократных дозах ≥70 мг п/к, что хорошо коррелировало с наблюдаемым влиянием на циркулирующий ЛПНП-Х.

Анализы фармакокинетики продемонстрировали, что 21B12 показывает нелинейную (концентрационно-зависимую) элиминацию. Среднее значение t_{max} варьировало от 4 до 6 дней. Как ожидается, самый высокий медианный максимум наблюдаемой концентрации (C_{max}) и площадь под кривой концентрация-время от точки времени 0 до бесконечности (AUC_{0-inf}) наблюдались в группе 420 мг в/в и составлял 139 мкг/мл и 1550 день·мкг/мл соответственно.

О появляющихся в ходе лечения побочных эффектах сообщали 29 из 42 субъектов (69%), которые получали 21B12 в любой дозе, и 10 из 14 субъектов (71%), которые получали плацебо. Не наблюдалось очевидной корреляции между частотой побочных эффектов у субъектов и дозой 21B12, или между частотой побочных эффектов у субъектов и способом введения 21B12 (п/к против в/в).

Не сообщалось о серьезных побочных эффектах, и ни один из субъектов не прекратил участия в исследовании в результате побочного эффекта. Не было смертельных случаев в ходе исследования.

О связанных с лечением побочных эффектах сообщали 18 из 42 субъектов (43%), которые получали 21B12, и 10 из 14 субъектов (71%), которые получали плацебо. Не наблюдалось очевидной корреляции между частотой побочных эффектов у субъектов и дозой 21B12, или между частотой побочных эффектов у субъектов и способом введения 21B12 (п/к против в/в).

Не наблюдалось тенденций, указывающих на клинически значимое влияние 21B12 на выбранные лабораторные переменные, электрокардиограммы (ЭКГ) или основные показатели жизнедеятельности.

В данном исследовании 21B12, по-видимому, хорошо переносился при однократном п/к и в/в введении доз до 420 мг.

Образцы сыворотки субъектов, зарегистрированных в данном исследовании, были проанализированы на предмет присутствия (в начальной точке) или выработки (после лечения) антител против 21B12. Образцы всех 42 субъектов, которые получали 21B12, были отрицательными относительно антител против 21B12.

Пример 21.

Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование фазы 1 с повышением многократных доз для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и фармакодинамики человеческого анти-PCSK9 антитела у субъектов с гиперлипидемией, получающих стабильные дозы статина.

Данное исследование представляет собой рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование фазы 1b с повышением многократных доз с применением человеческого анти-PCSK9 антитела (моноклональное антитело 21B12) у гиперлипидемических субъектов (например, гиперхолестеринемических), которые в настоящее время получают стабильные дозы статина. Исследование включало семь когорт. Задачи для всех когорт включали характеристику безопасности, переносимости и иммуногенности 21B12, а также характеристику ФК и ФД (ЛПНП-Х и PCSK9). Когорты 1-5 исследования представляли часть с повышением дозы 21B12 у гиперхолестеринемических субъектов на стабильных низких или средних дозах статина. Субъекты в когортах 1-5 (n=8 на когорту) с ЛПНП-Х (70-200 мг/дл), получающие стабильную ежедневную дозу розувастатина <40 мг, аторвастатина <80 мг или симвастатина 20-80 мг в течение ≥1 месяца, были рандомизированы в соотношении 3:1 для получения 1 из 5 доз 21B12 п/к (14 или 35 мг КН 6 раз; или 140 мг или 280 мг К2Н 3 раза; или 420 мг К4Н 2 раза) или соответствующего плацебо соответственно. Когорта 6 проводилась для гиперхолестеринемических субъектов, получающих высокие дозы статина (аторвастатин 80 мг или розувастатин 40 мг). Субъекты в данной когорте (n=12) получали розувастатин 40 мг или аторвастатин 80 мг и были рандомизированы в со-

отношении 3:1 для получения 21B12 (140 мг п/к К2Н 3 раза) или соответствующего плацебо соответственно. Когорта 7 проводилась для субъектов с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (идентифицированных с применением критериев ВОЗ); субъекты в данной когорте (n=6) были рандомизированы в соотношении 2:1 для получения 21B12 (140 мг п/к К2Н 3 раза) или соответствующего плацебо соответственно. Для ясности, Когорта 1 получала п/к дозы 14 мг 21B12 1 раз в неделю, 6 раз. Когорта 2 получала п/к дозы 35 мг 21B12 1 раз в неделю, 6 раз. Когорта 3 получала п/к дозы 140 мг 21B12 1 раз в 2 недели, 3 раза. Когорта 4 получала п/к дозы 280 мг 21B12 1 раз в 2 недели, 3 раза. Когорта 5 получала п/к дозы 420 мг 21B12 1 раз в 4 недели, 2 раза.

Предварительные результаты были получены для 40 субъектов, которые были зарегистрированы и рандомизированы для получения 21B12 или плацебо. Из этих 40 субъектов, 28 субъектов получили ≥1 дозы исследуемого продукта (21B12 или плацебо) и, таким образом, представляют множество для предварительного анализа безопасности (слепое лечение). Существующие предварительные слепые данные безопасности были доступны для этих 28 субъектов, все из кого были из когорт 1-4. Не было зарегистрировано смертельных случаев, серьезных побочных эффектов или преждевременного прекращения участия в исследовании вследствие побочных эффектов. В общем по меньшей мере об 1 случае побочных эффектов сообщали 15 из 28 субъектов (54%), которые получили ≥1 дозы исследуемого продукта. О большинстве побочных эффектов (при слепом лечении) сообщали единичные субъекты, за исключением усталости, артралгии, запора и вирусной инфекции верхних отделов дыхательных путей, каждый из которых был зарегистрирован у 2 из 28 субъектов (7%).

Предварительные фармакодинамические результаты (слепое лечение) были доступны для когорт 1, 2 и 3. Зависимое от дозы 21B12 снижение уровня ЛПНП-Х в кровотоке наблюдалось у субъектов на стабильных средних дозах статинов. Самый низкий уровень ЛПНП-Х наблюдался в пределах 2 недель после введения первой дозы и находился в интервале снижения на 60-80% в когорте 3 (140 мг К2Н п/к 3 раза). Практически полное подавление PCSK9 наблюдалось в когорте 3, что хорошо коррелирует с наблюдаемым влиянием на ЛПНП-Х в кровотоке.

В конечном итоге, субъекты (N=51) в когортах 1-6 были рандомизированы для получения 21B12 (N=39) или плацебо (N=12); пол 26 субъектов (51%) был мужским; средний возраст (СО) составил 58 (7) лет. Не сообщалось о смертельных случаях или серьезных побочных эффектах (ПЭ), и ни один из субъектов не прекратил участия в исследовании из-за ПЭ. Нейтрализующие антитела к 21B12 не были обнаружены.

У субъектов в когортах 1-5, получающие низкие или средние дозы статинов происходило умеренное снижение ЛПНП-Х до 81% против плацебо при максимальном уменьшении и 75% против плацебо в конце временного промежутка введения (т.е. на 6-й неделе) после 3 еженедельных доз п/к 21B12, и 66% в конце временного промежутка введения (т.е. на 8-й неделе) после 2 доз п/к 1 раз в 4 недели. У субъектов в когортах 1-5, получающие низкие и средние дозы статинов, происходило максимальное снижение ЛПНП-Х до 81% против плацебо при максимальном уменьшении и 75% против плацебо в конце временного промежутка введения (фиг. 14). Выраженность и продолжительность эффекта были дозозависимыми. При введении более высоких доз PCSK9 не обнаруживался в плазме. Подобным образом, в конце временного промежутка введения после 3 еженедельных доз, у субъектов, получающих высокие дозы статинов (когорта 6) наблюдалось среднее снижение уровня ЛПНП-Х 63% против плацебо, и максимальное снижение уровня ЛПНП-Х 73% против плацебо (фиг. 15).

Полученные данные показывают, что повторные п/к дозы 21B12 в течение 6 недель снижали уровень ЛПНП-Х в кровотоке до 81% против плацебо, в зависимости от схемы введения, у субъектов, получающих низкие или средние или высокие дозы статинов, без серьезных ПЭ. Эффект снижения уровня ЛПНП-Х под действием 21B12 было сравнимым для групп высокой дозы статина и низкой или средней дозы статина.

У субъектов в когортах 1-5, получающие низкие или средние дозы статинов, происходило умеренное снижение уровней PCSK9 до 94% против плацебо в конце временного промежутка введения, данные не показаны. У субъектов в когортах 1-5, получающих низкие или средние дозы статинов, наблюдалось среднее снижение уровня АроВ до 54% против плацебо в конце временного промежутка введения, и максимальное снижение варьировало от 48% (35 мг КН) до 59% (140 мг и 280 мг К2Н и 420 мг К4Н) в ходе исследования ($p<0,001$) (фиг. 16). Кроме того, у субъектов в когортах 1-6, получающих низкие или средние и высокие дозы статинов, наблюдалось среднее снижение уровня Lp(a) до 43% против плацебо в конце временного промежутка введения (фиг. 17).

У субъектов в когорте 7 с ГеСГ наблюдалось среднее снижение уровня ЛПНП-Х 65% против плацебо в конце временного промежутка введения (т.е. 6-я неделя, через 2 недели после введения 3-ей п/к дозы 21B12 1 раз в 2 недели), и максимальное снижения ЛПНП-Х 70% против плацебо (фиг. 18). Снижение ЛПНП-Х в ходе временного промежутка введения были сравнимым с наблюдаемым у субъектов без ГеСГ. После лечения 21B12 PCSK9 не был обнаружен в кровотоке субъектов с ГеСГ.

У субъектов с ГеСГ в когорте 7 наблюдалось среднее снижение уровня PCSK9 в сыворотке 78% против плацебо в конце временного промежутка введения (т.е. 6-я неделя, через 2 недели после введения

3-ей п/к дозы 21B12 1 раз в 2 недели) (фиг. 19). У субъектов с ГеСГ в когорте 7 наблюдалось среднее снижение общего холестерина до 42% против плацебо в конце временного промежутка введения (т.е. 6-я неделя, через 2 недели после введения 3-ей п/к дозы 21B12 1 раз в 2 недели), и максимальное снижение общего холестерина 47% против плацебо (фиг. 20). У субъектов с ГеСГ в когорте 7 наблюдалось среднее снижение уровня холестерина не-ЛПВП 61% против плацебо в конце временного промежутка введения (т.е. 6-я неделя, через 2 недели после введения 3-ей п/к дозы 21B12 1 раз в 2 недели), и максимальное снижение уровня не-ЛПВП холестерина 67% против плацебо (фиг. 21). У субъектов с ГеСГ в когорте 7 наблюдалось среднее снижение уровней АроВ до 47% против плацебо в конце временного промежутка введения (т.е. 6-я неделя, через 2 недели после введения 3-ей п/к дозы 21B12 1 раз в 2 недели), и максимальное снижение АроВ 57% против плацебо (фиг. 22). У субъектов с ГеСГ в когорте 7 наблюдалось среднее снижение уровня липопротеина (Lp(a)) 50% против плацебо в конце временного промежутка введения (т.е. 6-я неделя, через 2 недели после введений 3-ей п/к дозы 21B12 1 раз в 2 недели) (фиг. 23).

В когорте 7, 21B12 снижал уровни свободного PCSK9 и в существенной мере снижал уровни ЛПНП-Х в кровотоке субъектов с ГеСГ и гиперлипидемией, которые получали терапию стандартного ухода. Исследуемая доза 1 раз в 2 недели обеспечивала снижение уровня ЛПНП-Х у субъектов с ГеСГ, сравнимое с наблюдаемым у субъектов без ГеСГ. Не сообщалось о серьезных ПЭ.

Пример 22.

Двойное слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование для оценки переносимости и эффективности человеческого анти-PCSK9 антитела у больных гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией.

Задача данного исследования - оценить влияние 12 недель подкожного (п/к) введения человеческого анти-PCSK9 антитела (моноклональное антитело 21B12), в сравнении с плацебо, на процент изменения от начального значения холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-Х) у субъектов с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (ГеСГ).

Данное исследование представляет собой двойное слепое, рандомизированное, стратифицированное, плацебо-контролируемое клиническое испытание для оценки безопасности, переносимости и эффективности моноклонального антитела 21B12 у субъектов с диагнозом ГеСГ. Планируется включение общего количества 150 субъектов. Субъекты, которые соответствуют всем критериям включения/исключения, будут рандомизированы в равном соотношении в 3 группы лечения: моноклональное антитело, 21B12 в дозе 350 мг или 420 мг К4Н п/к (1 раз в 4 недели подкожно) или плацебо К4Н п/к. Рандомизация будет стратифицирована на основе скрининга уровня ЛПНП-Х (<130 мг/дл [3,4 ммоль/л] против ≥130 мг/дл) и применения эзетимиба в начальной точке (да против нет). Рандомизация должна происходить в пределах 5-10 дней после скрининговой оценки ЛПНП-Х, используемой для определения пригодности. Моноклональное антитело, 21B12, и плацебо будут вводить вслепую. Визиты исследования приходятся на недели 2, 4, 8 и 12. Введение последней дозы моноклонального антитела, 21B12, или плацебо будет произведено на 8-й неделе. Конечный визит исследования (КВИ) и последняя оценка уровня липидов будут производиться на 12-й неделе.

Мужчины и женщины, в возрасте от ≥18 до ≤75 лет, с диагнозом гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии согласно диагностическим критериям группы регистров Саймон Брум (ГРСМ), пригодны для данного исследования. Для включения, субъекты должны получать зарегистрированный статин, со стабильной дозой(ами) для всех разрешенных (например, эзетимиб, смола-секвестрант желчных кислот, станолы или одобренная регуляторными властями и присутствующая на рынке форма ниацина (например, Ниаспан или Ниакор)) лекарственных средств, регулирующих уровни липидов по меньшей мере в течение 4 недель до скрининга на ЛПНП-Х, и, по мнению исследователя, не требовать титрования вверх. Уровень ЛПНП-Х натощак должен составлять ≥100 мг/дл (2,6 ммоль/л), и уровень триглицеридов натощак ≤400 мг/дл (4,5 ммоль/л) по данным центральной лаборатории на момент скрининга.

Предварительные данные (данные не показаны) продемонстрировали, что субъекты, леченые 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения по методу наименьших квадратов (НК) от начального значения ЛПНП-Х 38,46% в конце временного промежутка введения, и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 45,68%. Субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 21,69% в конце временного промежутка введения, и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 28,23%. Субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 15,39% в конце временного промежутка введения, и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 6,77%. Субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 17,16% в конце временного промежутка введения, и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 18,49%. Субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 17,24% в конце временного промежутка введения, и субъекты, леченные 420 мг 21B12,

продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 4,56%. Субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП холестерина 36,16% в конце временного промежутка введения, и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП холестерина 41,81%. В конце, субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 24,82% в конце временного промежутка введения, и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 29,45%. (данные не показаны)

Фиг. 24 представляет собой график, иллюстрирующий данные снижения уровня ЛПНП-Х для следующих доз 21B12: 70 мг, 105 мг и 140 мг (введение К2Н или 1 раз в 2 недели) и 280 мг, 350 мг и 420 (введение К4Н или 1 раз в месяц). Указанные данные представляют собой обобщенные данные исследований, описанных в примерах 22-25). Если коротко, обобщенные данные показывают, что 140 мг К2Н приводят к снижению приблизительно на 60% от начального значения ЛПНП-Х на 12-й неделе и плавному поддержанию снижения ЛПНП-Х. Кроме того, указанные данные демонстрируют, что 420 мг К4Н приводят к снижению приблизительно на 56% от начального значения ЛПНП-Х на 12-й неделе и менее выраженному эффекту отдачи для ЛПНП-Х в конце временного промежутка введения.

Фиг. 25A-25D представляют собой гистограммы, иллюстрирующие благоприятное влияние доз 21B12 на Lp(a), ЛПВП-Х, триглицериды и ЛПОНП-Х, соответственно, построенные на основе обобщенных данных исследований, описанных в примерах 22-25. Кроме того, дозозависимое снижение от начального значения наблюдалось для общего холестерина (25-37%, значения $p<0,001$), не-ЛПВП-Х (36-53%, значения $p<0,001$) и АроВ (36-53%, значения $p<0,001$) (данные не показаны).

Пример 23.

Рандомизированное исследование для оценки переносимости и эффективности человеческого анти-PCSK9 антитела на ЛПНП-Х в сравнении с эзетимибом у гиперхолестеринемических больных, которые не в состоянии переносить эффективную дозу ингибитора ГМГ-Ко-А редуктазы.

Задача данного исследования - оценить влияние 12 недель подкожного (п/к) введения человеческого анти-PCSK9 антитела (моноклональное антитело 21B12), в сравнении с эзетимибом, на процент изменения от начального значения холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-Х) у гиперхолестеринемических субъектов, которые не в состоянии переносить эффективную дозу ингибитора ГМГ-КоА редуктазы.

Данное исследование представляет собой рандомизированное, стратифицированное, клиническое испытание с параллельными группами человеческого анти-PCSK9 антитела, моноклонального антитела 21B12. Планируется включение 150 субъектов. Субъекты, которые соответствуют всем критериям включения/исключения, будут рандомизированы в равном соотношении в 5 групп лечения: моноклональное антитело, 21B12 в дозе 280 мг, 350 мг или 420 мг К4Н п/к (1 раз в 4 недели подкожно); эзетимиб в дозе 10 мг ежедневно (КД) перорально (п/о) с моноклональным антителом, 21B12 в дозе 420 мг К4Н п/к; или эзетимиб 10 мг КД п/о с плацебо К4Н п/к. Рандомизация будет стратифицирована на основе скрининга уровня ЛПНП-Х (<130 мг/дл [3,4 ммоль/л] против ≥130 мг/дл) и применения статина в начальной точке (да против нет). Рандомизация должна происходить в пределах 5-10 дней после скрининговой оценки ЛПНП-Х, используемой для определения пригодности. Моноклональное антитело, 21B12, и плацебо будут вводить вслепую. Визиты исследования приходятся на недели 2, 4, 8 и 12. Введение последней дозы моноклонального антитела, 21B12, или плацебо будет произведено на 8-й неделе. Конечный визит исследования (КВИ) и последняя оценка уровня липидов будут производиться на 12-й неделе.

Мужчины и женщины, в возрасте от ≥18 до ≤75 лет пригодны для данного исследования. Субъект должен попробовать по меньшей мере 1 статин и быть не в состоянии переносить любую дозу или увеличение дозы статина выше следующих общих еженедельных максимальных доз из-за миалгии или миопатии: аторвастатин ≤70 мг, симвастатин ≤140 мг, правастатин ≤140 мг, розувастатин ≤35 мг, ловастатин ≤140 мг, флувастатин ≤280 мг. Для не перечисленных статинов, максимальная общая еженедельная доза не должна превышать в 7 раз наименьшую доступную дозировку таблеток. Симптомы должны исчезать после прекращения приема статина или снижения дозы. Если вводят дозу(ы) (не превышающую максимальной дозы, определенной выше) статина, смолы-секвестранта желчных кислот и/или терапии станолом, доза(ы) должна быть стабильной по меньшей мере в течение 4 недель до скрининга ЛПНП-Х. Если субъект получает эзетимиб на момент скрининга, введения эзетимиба должно быть прекращено на ≥4 недели перед скринингом ЛПНП-Х. В зависимости от категории риска (на основании целей лечения НОПХ ПЛВ III), субъекты должны соответствовать следующим критериям ЛПНП-Х натощак (центральная лаборатория) на момент скрининга: ≥100 мг/дл (2,6 ммоль/л) для субъектов с диагностированным заболеванием коронарных сосудов сердца (ЗКС) или эквивалентом риска ЗКС; ≥130 мг/дл (3,4 ммоль/л) для субъектов без диагностированного ЗКС или эквивалента риска и 2 или более факторов риска; ≥160 мг/дл (4,1 ммоль/л) для субъектов без диагностированного ЗКС или эквивалента риска, с одним или отсутствующими факторами риска. Уровень триглицеридов натощак должен составлять ≤400 мг/дл (4,5 ммоль/л) по данным анализа центральной лаборатории на момент скрининга.

Предварительные данные (данные не показаны) продемонстрировали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 38,79% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 40,01% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 50,63%. Предварительные данные продемонстрировали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 27,38% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 16,04% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 23,84%. Предварительные данные продемонстрировали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12, продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 8,62% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 4,62% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 7,55%. Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 31,02% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 38,14% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 37,27%. Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 15,35% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 19,22% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 19,55%. Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 31,03% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 34,46% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 42,23%. Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП-Х 39,92% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП-Х 42,86% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП-Х 53,49%.

Пример 24.

Рандомизированное, плацебо- и эзетимиб-контролируемое исследование с определением оптимальной дозы для оценки переносимости и эффективности влияния человеческого анти-PCSK9 антитела на ЛПНП-Ху гиперхолестеринемических пациентов с баллами риска по 10-летней Фрамингемской шкале 10% или менее.

Задача данного исследования - оценить влияние 12 недель подкожного (п/к) введения человеческого анти-PCSK9 антитела (моноклональное антитело 21B12) 1 раз в 2 недели (К2Н) или 1 раз в 4 недели (К4Н), в сравнении с плацебо, на процент изменения от начального значения холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-Х), при применении в качестве монотерапии у гиперхолестеринемических субъектов с баллами риска по 10-летней Фрамингемской шкале 10% или менее.

Данное исследование было рандомизированным, стратифицированным, плацебо- и эзетимиб-контролируемым клиническим испытанием с определением оптимальной дозы и параллельными группами человеческого анти-PCSK9 антитела, моноклонального антитела, 21B12, включающим 411 субъектов. Субъекты, которые соответствовали всем критериям включения/исключения, были рандомизированы в равном соотношении в 9 групп лечения: 1 из 6 схем лечения моноклональным антителом, 21B12 (70 мг, 105 мг или 140 мг п/к К2Н, или 280 мг, 350 мг или 420 мг п/к К4Н (подкожно 1 раз в 4 недели), плацебо с п/к введением К2Н или К4Н, или эзетимиб с ежедневным (КД) пероральным (п/о) введением. Рандомизацию стратифицировали на основе скрининга уровня ЛПНП-Х (<130 мг/дл [3,4 ммоль/л] против ≥130 мг/дл). Рандомизацию проводили в пределах 5-10 дней после скрининговой оценки ЛПНП-Х, используемой для определения пригодности. Визиты исследования происходили 1 раз в 2 недели, независимо от того, получал ли субъект лечение К2Н п/к или К4Н или эзетимиб. Три группы дозы К2Н моноклонального антитела, 21B12, и одну группу плацебо К2Н лечили вслепую друг против друга, и три группы дозы К4Н и одну группу плацебо К4Н лечили вслепую друг против друга. Эзетимиб вводили открытым способом. Конечный визит исследования и последняя оценка уровня липидов производились на 12-й неделе для субъектов из перечня К4Н в/б или получающих эзетимиб, и на 14-й неделе для субъ-

ектов из перечня К2Н в/б.

Мужчины и женщины в возрасте от ≥18 до ≤75 лет были пригодными для данного исследования. Уровень ЛПНП-Х натощак составлял ≥100 мг/дл (2,6 ммоль/л) и <190 мг/дл (4,9 ммоль/л), и уровень триглицеридов натощак составлял ≤400 мг/дл (4,5 ммоль/л) по данным центральной лаборатории на момент скрининга. Субъектам был присвоен балл риска по Фрамингемской шкале 10% или менее согласно Панели лечения взрослых III Национальной образовательной программы по холестерину (НОПХ ПЛВ III).

Первичной конечной точкой был процент изменения от начального значения ЛПНП-Х на 12-й неделе. Вторичные конечные точки включали процент изменения уровня аполипопротеина B (АроВ), липопротеина (а) (Lp(a)) и соотношение общего холестерина липопротеину высокой плотности (ЛПВП)-Х. Дополнительно оценивали переносимость и безопасность.

Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 70 мг 21В12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения от начального значения ЛПНП-Х 41,21% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 105 мг 21В12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения от начального значения ЛПНП-Х 45,44% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 140 мг 21В12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения от начального значения ЛПНП-Х 51,56% (данные не показаны).

Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21В12 (К4Н), продемонстрировали средний процент снижения от начального значения ЛПНП-Х 37,53% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21В12, продемонстрировали средний процент снижения от начального значения ЛПНП-Х 42,16% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21В12, продемонстрировали средний процент снижения от начального значения ЛПНП-Х 47,52% (данные не показаны).

Заключительные данные показали, что на 12-й неделе субъекты, получающие 21В12, продемонстрировали средний процент снижения по методу наименьших квадратов (НК) от начального значения ЛПНП-Х до 51% (табл. 12); процент изменения от начального значения для эзетимиба составил 14%. Изменение от начального значения до 12-й недели было до 72 мг/дл больше для 21В12, чем для плацебо. Субъекты, получавшие 21В12, продемонстрировали снижение ЛПНП-Х от начального значения на 37-53% больше, чем плацебо, и на 37% больше, чем эзетимиб. Средние значения снижения от начального уровня для АроВ (до 44%), Lp(a) (до 29%), и значения соотношения холестерин/ЛПВП (до 38%) были большими для 21В12, чем для плацебо.

Таблица 12

Процент изменения ЛПНП-Х от начального значения на 12-й неделе: 21В12 п/к против эзетимиба или плацебо

	К2Н				**К4Н**				
	Плацебо (N=45)	**70 мг (N=45)**	**105 мг (N=46)**	**140 мг (N=45)**	**Плацебо (N=45)**	**280 мг (N=45)**	**350 мг (N=45)**	**420 мг (N=45)**	**Эзетимиб КД (N=45)**
Средний процент изменения от начального значения по методу наименьших квадратов (%)	-3,71	-40,98	-43,87	-50,93	4,54	-39,02	-43,20	-47,98	-14,26
Разница лечение против плацебо (%)	-	-37,27*	-40,17*	-47,23*	-	-43,57*	-47,74*	-52,53*	-
Разница лечение против эзетимиба (%)	-	-26,73*	-29,62*	-36,68*	-	-25,17*	-29,34*	-34,14*	-

п/к: подкожно;
К2Н: 1 раз в 2 недели;
К4Н: 1 раз в 4 недели или ежемесячно;
КД: ежедневно;
* P<0,001.

Пример 25.

Двойное слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование с определением оптимальной дозы для оценки переносимости и эффективности влияния человеческого анти-PCSK9 антитела на ЛПНП-Х в комбинации с ингибиторами ГМГ-Ко-А редуктазы у гиперхолестеринемических больных.

Задача данного исследования - оценить влияние 12 недель подкожного (п/к) введения человеческого анти-PCSK9 антитела (моноклональное антитело 21B12) 1 раз в 2 недели (К2Н) или 1 раз в 4 недели (К4Н), в сравнении с плацебо, на процент изменения от начального значения холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-Х), в случае применения в дополнение к ингибитору ГМГ-Ко-А редуктазы (например, статину) у субъектов с гиперхолестеринемией.

Данное исследование представляет собой двойное слепое, рандомизированное, стратифицированное, плацебо-контролируемое клиническое испытание с определением оптимальной дозы и параллельными группами человеческого анти-PCSK9 антитела, моноклонального антитела 21B12, с участием 631 субъекта. Субъекты, которые получают стабильную дозу(ы) в течение по меньшей мере 4 недель лечения статином, с эзетимибом или без него, и которые соответствуют всем критериям включения/исключения, будут рандомизированы в равном соотношении в 8 групп лечения: моноклональное антитело, 21B12 подкожно (п/к) (70 мг К2Н, 105 мг К2Н, 140 мг К2Н, 280 мг К4Н, 350 мг К4Н и 420 мг К4Н, плацебо К2Н п/к или плацебо К4Н п/к). Рандомизация будет стратифицирована на основе скрининга уровня ЛПНП-Х (<130 мг/дл [3,4 ммоль/л] против ≥130 мг/дл) и применения эзетимиба в начальной точке (да против нет). Рандомизация должна происходить в пределах 5-10 дней после скрининговой оценки ЛПНП-Х, используемой для определения пригодности. Визиты исследования проводятся каждые 2 недели, независимо от того, получает ли субъект лечение К2Н п/к или К4Н. Три группы дозы К2Н моноклонального антитела, 21B12, и одна группа плацебо К2Н будут получать лечение вслепую друг против друга, а также три группы дозы К4Н и одна группа плацебо К4Н будут получать лечение вслепую друг против друга. Конечный визит исследования (КВИ) и последняя оценка уровня липидов будут производиться на 12-й неделе для субъектов из перечня К4Н в/б и на 14-й неделе для субъектов из перечня К2Н в/б.

Мужчины и женщины, в возрасте от ≥18 до ≤80 лет пригодны для данного исследования. Для включения субъекты должны получать статин, с эзетимибом или без него, в стабильной дозе(ах), по меньшей мере в течение 4 недель перед скринингом ЛПНП-Х и не требовать титрования вверх. Уровень ЛПНП-Х натощак на момент скрининга должен составлять ≥85 мг/дл (2,2 ммоль/л). Включение субъектов со скрининговыми значениями ЛПНП-Х натощак от ≥85 мг/дл (2,2 ммоль/л) до <100 мг/дл (2,6 ммоль/л) будет ограничено не более чем приблизительно 20% от общего количества включенных субъектов. Уровень триглицеридов натощак должен составлять ≤400 мг/дл (4,5 ммоль/л) по данным центральной лаборатории на момент скрининга.

Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 70 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 39,22% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 105 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 56,38% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 140 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 68,76% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 70 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 21,17% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 105 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 33,41% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 140 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 33,87% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 70 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 21,17% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 105 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 6,80% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 140 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 8,43% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 70 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 14,84% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 105 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 12,75% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 140 мг21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 45,14% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 70 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 7,20% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 105 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 5,65% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 140 мг 21B12 (К2Н), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 17,60% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 70 мг 21B12 (К2Н), продемонст-

рировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП-Х 36,20% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 105 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП-Х 51,20% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 140 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП-Х 64,61% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 70 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 26,33% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 105 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 36,91% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 140 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 46,17% (данные не показаны).

Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12 (K4H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 42,62% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 56,84% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12, продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПНП-Х 52,19% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 22,54% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 29,43% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения Lp(a) 23,29% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 2,17% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 6,92% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент повышения НК от начального значения ЛПВП-Х 7,42% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 18,12% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 20,89% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения ЛПОНП-Х 28,66% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 6,75% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 9,17% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения триглицеридов 11,13% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП-Х 38,89% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП-Х 50,83% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения не-ЛПВП-Х 48,54% (данные не показаны). Предварительные данные показали, что субъекты, леченые 280 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 28,08% в конце временного промежутка введения; субъекты, леченные 350 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 36,04% в конце временного промежутка введения; и субъекты, леченные 420 мг 21B12 (K2H), продемонстрировали средний процент снижения НК от начального значения общего холестерина 42,76% (данные не показаны).

Пример 26.

АСБ PCSK9 дополнительно регулируют вверх ЛПНПР в присутствии статинов.

Данный пример демонстрирует, что АСБ против PCSK9 вызывают дополнительное увеличение доступности ЛПНПР, в случае применения в присутствии статинов, демонстрируя, что дополнительный благоприятный эффект может быть достигнут сочетанным применением обоих.

Клетки HepG2 высевали в МДСИ с 10% сыворотки телячьего эмбриона (СТЭ) и позволяли расти до ~90% слияния. Клетки обрабатывали указанными количествами мевинолина (статин, Sigma) и АСБ против PCSK9 (фиг. 12A-12C) в МДСИ, содержащей 3% СТЭ, в течение 48 ч. Получали общие лизаты клеток. 50 мг общего белка разделяли гель-электрофорезом и переносили на ПВДФ мембрану. Иммуноблоттинг выполняли с применением кроличьего антитела против рецептора ЛПНП человека (Fitzgerald) или кроличьего антитела против человеческого b-актина. Усиленные результаты хемилюминесценции показаны на верхних панелях фиг. 12A-12C. Интенсивность полос количественно определяли с помощью

программного обеспечения ImageJ и нормализовали по b-актину. Относительные уровни ЛПНПР показаны на нижних панелях фиг. 12A-12C. АСБ 21B12 и 31H4 представляют собой нейтрализующие антитела против PCSK9, тогда как 25A7.1 представляет собой не нейтрализующее антитело.

Дополнительно были созданы клетки HepG2-PCSK9. Они представляли собой стабильную линию клеток HepG2, трансфицированных человеческим PCSK9. Клетки высевали в МДСИ, содержащую 10% сыворотки телячьего эмбриона (СТЭ) и позволяли расти до ~90% слияния. Клетки обрабатывали указанными количествами мевинолина (статин, Sigma) и АСБ против PCSK9 (фиг. 12D-12F) в МДСИ, содержащей 3% СТЭ, в течение 48 ч. Получали общие лизаты клеток. 50 мг общего белка разделяли гель-электрофорезом и переносили на ПВДФ мембрану. Иммуноблоттинг выполняли с применением кроличьего антитела против рецептора ЛПНП человека (Fitzgerald) или кроличьего антитела против человеческого b-актина. Усиленные результаты хемилюминесценции показаны на верхних панелях. Интенсивность полос количественно определяли с помощью программного обеспечения ImageJ и нормализовали по b-актину.

Как можно увидеть из результатов, проиллюстрированных на фиг. 12A-12F, увеличение количества нейтрализующего антитела и увеличение количества статина, в общем, приводило к повышению уровня ЛПНПР. Такое увеличение эффективности для повышенных уровней антигенсвязывающего белка особенно очевидно на фиг. 12D-12F, на которых клетки также были трансфицированы PCSK9, что позволило АСБ продемонстрировать свою эффективность в большей степени.

Интересно, что влияние концентраций АСБ на уровни ЛПНПР резко увеличивается, если PCSK9 вырабатывается клетками, как продемонстрировано результатами сравнения фиг. 12D-12F и 12A-12C. Кроме того, очевидно, что нейтрализующие АСБ (21B12 и 31H4) приводят к более выраженному повышению уровней ЛПНПР, даже в присутствии статинов, чем АСБ 25A7.1 (не нейтрализующий), демонстрируя, что дополнительные преимущества могут быть получены с применением как статинов, так и АСБ против PCSK9.

Пример 27.

Консенсусные последовательности.

Консенсусные последовательности были определены с применением стандартных филогенных анализов CDR, соответствующих V_H и V_L АСБ анти-PCSK9. Консенсусные последовательности были определены путем удерживания CDR непрерывными в пределах одной и той же последовательности, соответствующей V_H или V_L. Если коротко, последовательности аминокислот, соответствующие полным вариабельным доменам V_H или V_L, были переведены в форматирование FASTA для легкости обработки сравнительных выравниваний и филогенетического выведения. Далее, каркасные участки этих последовательностей были заменены искусственной последовательностью линкера (заменители "bbbbbbbbbb", неспецифичный конструкт нуклеиновой кислоты), таким образом, чтобы можно было выполнить исследование только CDR без введения нагрузки в какое-либо положение аминокислоты за счет сопутствующих событий (например, не родственные антитела, которые, по счастливому стечению обстоятельств, разделяют общий унаследованный каркас зародышевой линии), при этом удерживая CDR непрерывными в пределах одной и той же последовательности, соответствующей V_H или V_L. Для последовательностей V_H или V_L данного формата затем обрабатывали запрос выравнивания на предмет сходства последовательностей, с применением программы, которая использует стандартный ClutalW-подобный алгоритм (см. Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). Штраф на внесение делеции в выравнивание 8.0 использовались наряду со штрафом на продление делеции 2.0. Данная программа также генерировала филограммы (иллюстрации филогенетического дерева) на основании выравниваний для определения сходства последовательностей, с применением метода попарного внутригруппового невзвешенного среднего (МПВНС, метод не взвешенных парных групп, в котором используются арифметические средние величины) или методов присоединения соседа (см. Saitou and Nei, 1987, Molecular Biology and Evolution 4:406-425) для конструирования и иллюстрации сходства и различия групп последовательностей посредством сравнения длины и группировки ответвлений. Оба метода давали подобные результаты, но, в конечном счете, использовали полученные методом МПВНС деревья, поскольку в способе используется более простой и более консервативный набор допущений. Были сгенерированы деревья по методу МПВНС, в которых подобные группы последовательностей были определены как содержащие менее 15 замен на 100 остатков (см. легенду в иллюстрациях дерева относительно масштаба) между индивидуальными последовательностями в пределах группы, и использовались для определения коллекций консенсусных последовательностей. Результаты сравнения проиллюстрированы на фиг. 13A-13J и 48-49. На фиг. 13E группы были выбраны таким образом, что последовательности в легкой цепи, которые являются монофилетической веткой, также являются монофилетической веткой в тяжелой цепи и содержат менее 15 замен.

Пример 28.

Получение препаратов АСБ против PCSK9 УФ/ДФ - методология ультрафильтрации/диафильтрации.

Субстанцию лекарственного средства, например, антитело 21B12 и антитело 11F1, обменивали с буфером в буфере препарата, содержащем стабилизатор, с помощью лабораторной системы Millipore

TFF УФ/ДФ, с применением фильтра Millipore Pellicon XL, с мембраной размером 50 $см^2$ (регенерированная целлюлоза, порог молекулярной массы 30000). Стадию диафильтрации выполняли до обмена по меньшей мере 10 объемов буфера. Как только стадия диафильтрации была завершена, систему УФ/ДФ переключали в режим ультрафильтрации, и каждый препарат концентрировали до целевых уровней концентрации.

После того как стадия УФ/ДФ была завершена, подходящее количество полисорбата 20 или 80 добавляли к каждому препарату в виде 1,0 мас.% свежеприготовленного запасного раствора полисорбата ("ПС") до желательной концентрации полисорбата.

Перед заполнением первичных контейнеров каждый препарат фильтровали в асептических условиях под ламинарной вытяжкой и использовали фильтры с размером пор 0,2 мкм. Заполнение также выполняли в асептических условиях и проводили вручную или автоматически с применением подходящего инструмента для заполнения.

Пример 29.

Препараты с высокой концентрацией АСБ против PCSK9 и сниженной вязкостью.

Для оценки влияния различных вспомогательных веществ на вязкость высоких концентраций белка, использовали скрининговые анализы вязкости, стабильности и растворимости, чтобы исследовать вспомогательные вещества как модуляторы вязкости для препаратов с высокой концентрацией белка. Конкретно, всю подготовку образца, например, образца 21B12 антитела, проводили в асептических условиях под ламинарной вытяжкой. Лиофилизация исследуемых образцов позволяла осуществить простой способ достижения высоких концентраций белка. 1,5 мл белка (например, 21B12) с концентрацией 70 мг/мл с помощью пипетки переносили в стеклянные флаконы объемом 3 $см^3$ для лиофилизации. Лиофилизацию выполняли с применением общего цикла лиофилизации на лабораторном лиофилизаторе VirTis. Буфер лиофилизации представлял собой 10 мМ L-глутамата, содержащий 1,0% сахарозы, pH 4,8. Лиофилизированные образцы (например, лиофилизированный образец 21B12) разбавляли индивидуально с помощью приблизительно 0,65 мл буферов вспомогательного вещества, показанных в табл. 13 ниже, до конечной концентрации белка 150-200 мг/мл. Разбавленные образцы отстаивали на протяжении ночи, чтобы позволить полное растворение. Далее измеряли вязкость, как описано ниже.

Таблица 13

Вид вспомогательного вещества	Содержание вспомогательного вещества	pH после коррекции
Аминокислоты	150 мМ L-Аланина	pH 4,5
	150 мМ L-Глицина	pH 4,2
	75 мМ L-Лизина	pH 4,2
	150 мМ L-Метионина	pH 4,5
	150 мМ L-Пролина	pH 4,2
	150 мМ L-Серина	pH 4,2
	70 мМ L-Аргинина	pH 4,5
	150 мМ L-Серина	pH 4,4
Соли	30 мМ Магния хлорида	pH 4,2
	70 мМ Натрия хлорида	pH 4,2
	30 мМ Кальция хлорида	pH 4,4
	50 мМ Натрия сульфата	pH 4,1
	30 мМ Цинка хлорида	pH 4,7
Полиолы	150 мМ Глицерина	pH 4,5
	150 мМ Сахарозы	pH 4,2
Другие	150 мМ Карнитина	pH 4,8
	150 мМ Креатинина	pH 5,0
	150 мМ Таурина	pH 4,4

Результаты скрининга вязкости, стабильности, растворимости показали изменения вязкости 21B12 после добавления различных вспомогательных веществ (фиг. 26). Не все вспомогательные вещества, используемые для целей скрининга, приводили к снижению вязкости раствора; добавление L-аланина, глицерина, натрия сульфата, сахарозы и цинка хлорида приводило к значительному повышению вязкости по сравнению с контрольной выборкой. По-видимому, несколько вспомогательных веществ, использованных для скрининга, являются подходящими кандидатами для модулирования вязкости, например, L-аргинин, карнитин, креатинин, L-метионин и таурин.

Для оценки воздействия различных рецептур на вязкость АСБ, специфичного в отношении PCSK9, композиции 21B12 были введены в 6 различных препаратов, показанных в табл. 29.2 ниже. Концентрация 21B12 во всех препаратах составила 134 мг/мл. Препаратами были заполнены флаконы до конечного объема 1,0 мл. Препараты инкубировали при комнатной температуре (т.е. 25°C).

Диализ и концентрация 21B12

Удаление сахарозы из 21B12, сначала в 10 мМ натрия ацетата, 9,0% мас./об. сахарозы осуществляли посредством диализа, добавляя приблизительно 10 мл 21B12 на кассеты для диализа Pierce Slide-A-Lyzer (Rockford, Иллинойс) и проводя диализ против 2 л буфера при 4°C в течение 3 циклов (2 ч ×2 и 16 ч ×1) для полного обмена буфера. Буфер для диализа содержал 10 мМ натрия ацетата (полученного из уксусной кислоты), pH 5,0. Далее все образцы концентрировали с использованием устройств Millipore Amicon UltraPrep (Billerica, Массачусетс) в центрифуге Beckman Coulter Allegra 6R (Fullerton, Калифорния), при скорости 3000 об/мин, пока объем образца не становился несколько меньше объема, необходимого для желательной концентрации.

Далее проводили определение концентрации путем измерения поглощения при A280 с использованием спектрофотометра Agilent 8453 (Санта Клара, Калифорния). Концентрацию белка вычисляли с использованием подходящего коэффициента экстинции. Затем подходящее количество буфера добавляли к образцу для его повторного разбавления до желательной концентрации, и снова выполняли измерение A280, чтобы получить конечную концентрацию для эксперимента.

Добавление стабилизаторов, которые также могут снижать вязкость

Вспомогательные вещества, такие как пролин, бензиловый спирт, креатинин, метионин, таурин, и т. д., были проверены на предмет снижения вязкости. Указанные вспомогательные вещества добавляли индивидуально к образцам композиции 21B12 из запасных растворов с высокой концентрацией.

Измерение вязкости

Вязкость измеряли с применением конуса Brookfield LV-DVII и вискозиметра с пластиной (Middleboro, Массачусетс) со шпинделем CPE-40 и подбором температуры чашки с образцом, регулируемой циркулирующей водяной баней на постоянном уровне 25C. 500 мкл образца помещали в чашку для образца с помощью пипеточного дозатора с нагнетателем объемного типа. После установки чашки с образцом, скорость вращения шпинделя постепенно увеличивали, до достижения около 80% вращения. В этот момент вращения останавливали, и проводили считывание вязкости с помощью программного обеспечения Rheocalc.

Таблица 14

Буфер	Стабилизатор	Стабилизатор/вспомогательные вещества, добавленные для снижения вязкости	Вязкость (сП)
10 мМ Na ацетата			42,4
10 мМ Na ацетата	9,0 % сахарозы	2% L-пролина (174 мМ)	20,3
10 мМ Na ацетата	9,0 % сахарозы	3% L-пролина (261 мМ)	17,9
10 мМ Na ацетата	9,0 % сахарозы	3% бензилового спирта	17,8
10 мМ Na ацетата	9,0 % сахарозы	150 мМ креатинина	11,97
10 мМ Na ацетата	9,0 % сахарозы	150 мМ L-метионина	16,0
10 мМ Na ацетата	9,0 % сахарозы	150 мМ L-таурина	16,8

Результаты показывают, что L-пролин, бензиловый спирт, креатинин, метионин и таурин все значительно снижали вязкость при высоких концентрациях АСБ против PCSK9, 21B12 (см. табл. 14).

Для дополнительной оценки влияния различных рецептур на АСБ, специфичный в отношении PCSK9, композиции 21B12 были введены в различные препараты, показанные в табл. 15 ниже. Препараты разделены на три группы: (1) набор различных концентраций 21B12 в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,2, (2) набор различных концентраций 21B12 в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,2, содержащем 3% L-пролина (приблизительно 261 мМ) в каждом образце, и (3) набор образцов 21B12, концентрированных около до 117-134 мг/мл в 10 мМ натрий-ацетатном буфере при различных уровнях pH (4,0-5.5) плюс два образца в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,2 с добавлением NaCl или комбинации L-метионин/бензиловый спирт.

Таблица 15

Конц. 21B12 (мг/мл)	Препарат	Дополнительные вспомогательные вещества	Вязкость (сП) при 25° С	Вязкость (сП) при 40° С	Осмоляльность (мОсм/кг)
76	10 мМ Na ацетата, pH 5,2	н/д	2,84		53
104	10 мМ Na ацетата, pH 5,2	н/д	7,1		57
126	10 мМ Na ацетата, pH 5,2	н/д	16	8,9	58
154	10 мМ Na ацетата, pH 5,2	н/д	101	49	Не замерзал
73	10 мМ Na ацетата, pH 5,2	+ 3% пролина	2,6		253
104	10 мМ Na ацетата, pH 5,2	+ 3% пролина	5		252
122	10 мМ Na ацетата, pH 5,2	+ 3% пролина	8,8		274
148	10 мМ Na ацетата, pH 5,2	+ 3% пролина	24,4	9,5	301
125	10 мМ Na ацетата, pH 5,2	+ 150 мМ NaCl	11	6,6	346
134	10 мМ Na ацетата, pH 4	н/д	13,3	8,87	59
117	10 мМ Na ацетата, pH 4,5	н/д	10,8	6	59
130	10 мМ Na ацетата, pH 5	н/д	16,2	7,1	59
133	10 мМ Na ацетата, pH 5,5	н/д	23	12,6	64
134	10 мМ Na ацетата, pH 5,5	+ 150 мМ метионина и 3% бензилового спирта	6,5		520

Результаты показали, что L-пролин значительно снижал вязкость при высоких концентрациях АСБ против PCSK9, 21B12 (см. фиг. 27).

Для дополнительной оценки влияния различных препаратов на АСБ, специфичный в отношении PCSK9, композиции 21B12 были введены в различные препараты, показанные в табл. 16 ниже.

Таблица 16

Конц. 21B12 (мг/мл)	Препарат	Вспомогательные вещества	Вязкость (сП) при 25° С	Осмоляльность (мОсм/кг)
116	10 мМ натрия ацетата, pH 4,8	н/д	10,4	72
116	10 мМ натрия ацетата, pH 4,8	50 мМ метионина + 2% бензилового спирта	7	329
116	10 мМ натрия ацетата, pH 4,8	150 мМ аргинина	3,7	241
116	10 мМ натрия ацетата, pH 4,8	2% пролина + 1% бензилового спирта	7	313
116	10 мМ натрия ацетата, pH 4,8	1,5% пролина + 1% бензилового спирта	7,3	277

Результаты показывают, что в препаратах 21B12, содержащих 1,5% или 2,0% пролина (приблизительно от 131 нМ до 174 мМ пролина) и 1% бензилового спирта, вязкость при высоких концентрациях АСБ против PCSK9, 21B12, была значительно снижена.

Для дополнительной оценки влияния различных препаратов на АСБ, специфичный в отношении PCSK9, композиции 21B12 были введены в различные препараты, показанные в табл. 17 ниже.

Таблица 17

Конечный буфер вспомогательных веществ	Конечный сред. A280 21B12 конц. (мг/мл)	Вязкость (сП) при 25° С	Стресс сдвига (Па) при 25° С	Скорость сдвига (1/с) при 25° С
#1 10 мМ натрия ацетата, 9% сахарозы, pH 5,2	79	3,43	18,50	540
	96	4,97	18,60	375
	110	7,68	18,44	240
	166	223,19	18,40	8,25
#2 10 мМ натрия ацетата, 125 мМ аргинина, 3% сахарозы, pH 5,0	89	4,80	18,00	375
	105	5,97	18,30	307,5
	122	9,10	18,40	202,5
	150	19,31	18,80	97,5
	167	40,10	18,10	45
	195	193,80	18,90	9,75
#3 10 мМ натрия ацетата, 100 мМ метионина, 4% сахарозы, pH 5,0	85	3,20	18,00	562,5
	106	4,89	18,30	375
	122	7,85	18,90	240
	139	13,55	18,30	135
	168	121,22	18,20	15
	193	309,56	18,60	6
#4 10 мМ натрия ацетата, 250 мМ пролина, pH 5,0	85	3,20	18,00	562,5
	108	4,57	18,85	412,5
	125	7,61	18,27	240
	139	13,54	18,30	135
	180	133,73	19,00	14,3
	203	323,35	19,40	6

Результаты показывают возможность достижения высоких концентраций белка 21B12 со сниженной вязкостью в случае препаратов, содержащих конкретные стабилизаторы/вспомогательные вещества (см. фиг. 28A-28D). Конкретно, фиг. 28A представляет собой график, иллюстрирующий вязкость различных концентраций анти-PCSK9 антитела, 21B12, в препарате, содержащем 10 мМ натрия ацетата и 9% сахарозы, pH 5,2, при 25 и 40°C.

Фиг. 28B представляет собой график, иллюстрирующий вязкость различных концентраций анти-PCSK9 антитела, 21B12, в препарате, содержащем 10 мМ натрия ацетата, и 9% сахарозы, pH 5,2, при 25 и 40°C, по сравнению с препаратом, содержащим 10 мМ натрия ацетата, 125 мМ аргинина и 3% сахарозы, pH 5,0, при 25 и 40°C.

Фиг. 28C представляет собой график, иллюстрирующий вязкость различных концентраций анти-PCSK9 антитела, 21B12, в препарате, содержащем 10 мМ натрия ацетата и 9% сахарозы, pH 5,2, при 25 и 40°C, по сравнению с препаратом, содержащим 10 мМ натрия ацетата, 100 мМ метионина и 4% сахарозы, pH 5,0, при 25 и 40°C.

Фиг. 28D представляет собой график, иллюстрирующий вязкость различных концентраций анти-PCSK9 антитела, 21B12, в препарате, содержащем 10 мМ натрия ацетата и 9% сахарозы, pH 5,2, при 25 и 40°C, по сравнению с препаратом, содержащим 10 мМ натрия ацетата и 250 мМ пролина, pH 5,0, при 25 и 40°C.

Пример 30.

Исследование вязкости высоких концентраций 11F1.

Табл. 18 иллюстрирует вязкость антитела 11F1 при 25° по шкале Цельсия при различных концентрациях антитела и в различных препаратах.

Запасной раствор 11F1 с высокой концентрацией готовили так же, как описано для 21B12 в примере 29 выше. Далее проводили определение концентрации путем измерения поглощения при A280 с применением спектрофотометра Agilent 8453 (Санта Клара, Калифорния). Концентрацию белка вычисляли с применением подходящего коэффициента экстинции. Затем подходящее количество буфера добавляли к образцу для его повторного разбавления до желательной концентрации, и снова выполняли измерение A280, чтобы получить конечную концентрацию для эксперимента. Вспомогательные вещества добавляли индивидуально к образцам препаратов 11F1, полученных из запасных растворов с высокой концентрацией.

Вязкость измеряли с применением конуса Brookfield LV-DVII и вискозиметра с пластиной (Middleboro, Массачусетс) со шпинделем CPE-40 и подбором температуры чашки с образцом, регулируемой циркулирующей водяной баней на постоянном уровне 25°C. 500 мкл образца помещали в чашку для образца с помощью пипеточного дозатора с нагнетателем объемного типа. После установки чашки с образцом, скорость вращения шпинделя постепенно увеличивали, до достижения около 80% вращения. В этот момент вращение прекращали, и проводили считывание вязкости с помощью программного обеспечения Rheocalc.

Иногда измерения для препаратов с высокой концентрацией белка проводили с применением вискозиметра другого типа, Anton Paar Physica модель MCR300 со шпинделем CP50-1. 600 мкл образца используются в данном инструменте, и применяли программное обеспечение Rheoplus версия 3.4 для вычисления вязкости раствора. При использовании каждого из вискозиметров не наблюдалось значительной разницы в результатах измерений.

Таблица 18

Конечный буфер вспомогательных веществ	**Конечный сред. A280 11F1 конц. (мг/мл)**	**Вязкость (сП) при 25° C**
10 мМ натрия ацетата, 9% сахарозы 0,01% полисорбата (“ПС”) 20, pH 5,2	133	8
	145	14
	172	23
	186	45
	191	53
	224	133
10 мМ натрия ацетата, 150 мМ метионина, 3% сахарозы, 0,01% ПС 20, pH 5,2	147	13
	162	18
	192	31
	212	54
10 мМ натрия ацетата, 250 мМ пролина, 0,01% ПС 20, pH 5,0	139	10
	170	18
	196	36
	212	47
10 мМ натрия ацетата, 9% сахарозы, 100 мМ аргинина, pH 5,2	211	26
10 мМ натрия ацетата, 9% сахарозы, 150 мМ натрия хлорида, pH 5,2	211	62
10 мМ натрия ацетата, 9% сахарозы, 150 мМ глицина, pH 5,2	211	45
10 мМ натрия ацетата, 9% сахарозы, 150 мМ серіна, pH 5,2	211	48
10 мМ натрия ацетата, 9% сахарозы, 150 мМ аланіна, pH 5,2	211	43
10 мМ натрия ацетата, 9% сахарозы, pH 5,2	211	73
10 мМ натрия ацетата, pH 5,2	211	58

Результаты, показанные в табл. 18, демонстрируют способность достичь высоких концентраций 11F1 антитела с относительно низкой вязкостью в препаратах, содержащих конкретные стабилизаторы/вспомогательные вещества. Препараты, содержащие стабилизаторы метионин, пролин, аргинин, глицин, серин и аланин, продемонстрировал особенно низкую вязкость.

Пример 31.

Исследование стабильности препаратов АСБ против PCSK9 с высокой концентрацией.

Для оценки влияния на стабильность препаратов с высоким содержанием белка АСБ против PCSK9, композиции 21B12 были введены в различные препараты, показанные в табл. 19.1 ниже. Препараты инкубировали в указанных контейнерах при температуре -30 или 4°C в течение 0 недель, 1 месяца, 2, 3, 6 месяцев и 1 года. Для каждой композиции в каждой точке времени, образец отбирали из каждой упаковки для мониторинга мономера антитела путем нативной эксклюзионной ВЭЖХ (ЭК-ВЭЖХ) и обнаружения микроскопических частиц по рассеиванию света (HIAC).

Таблица 19.1

Препараты	Конц. 21B12 (мг/мл)	Объем заполнения (мл)	Упаковка	Буфер	Вспомога-тельные вещества	Полисорбат 80	Целевое значение pH
1	110	3,0	Флакон 5 $см^3$	10 мМ Na ацетата	9,0% сахарозы	0,010%	5,2
2	120	3,0	Флакон 5 $см^3$	10 мМ Na ацетата	100 мМ метионина, 4% сахарозы	0,010%	5,0
3	120	3,0	Флакон 5 $см^3$	10 мМ Na ацетата	250 мМ пролина	0,010%	5,0
4	110	1,0	BD стеклянный шприц	10 мМ Na ацетата	9,0% сахарозы	0,010%	5,2
5	120	1,0	BD стеклянный шприц	10 мМ Na ацетата	100 мМ метионина, 4% сахарозы	0,010%	5,0
6	120	1,0	BD стеклянный шприц	10 мМ Na ацетата	250 мМ пролина	0,010%	5,0
7	110	1,2	CZ пластиковый шприц	10 мМ Na ацетата	9,0% сахарозы	0,010%	5,2
8	120	1,2	CZ пластиковый шприц	10 мМ Na ацетата	100 мМ метионина, 4% сахарозы	0,010%	5,0
9	120	1,2	CZ пластиковый шприц	10 мМ Na ацетата	250 мМ пролина	0,010%	5,0

ЭК-ВЭЖХ.

ЭК-ВЭЖХ разделяет белки на основании отличий в их гидродинамических объемах. Молекулы белков с большими гидродинамическими объемами элюируются раньше, чем молекулы с меньшими объемами. Нативную ЭК-ВЭЖХ проводили с применением колонки TSK-GEL G3000SWXL 7,8×300 мм (Tosoh Bioscience), с размером частиц 5 мкм, на приборе ВЭЖХ Agilent с детектором для различных длин волн. Подвижная фаза представляла собой 100 мМ натрия фосфата, 250 мМ натрия хлорида, pH 6,8 ± 0,1. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Элюат колонки контролировали на длине волны 280 нм. Интегрированные площади пиков на хроматограммах использовали для количественного определения мономера и высокомолекулярных форм.

Таблица 19.2

	% ВМФ при -30° С				% ВМФ при 4° С					
Препараты	T=0	T=1 М	T=6 М	T=1Г	T=0	T=1 М	T=2 М	T=3М	T=6М	T=1Г
1	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,04	0,01	0,03	0,06	0,07
2	0,06	0,15	0,12	0,15	0,06	0,06	0,03	0,05	0,06	0,06
3	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,01	0,02	0,02	0,07
4	0,04	0,05	0,09	0,05	0,04	0,05	0,01	0,04	0,06	0,09
5	0,06	0,20	0,24	0,21	0,06	0,06	0,03	0,05	0,01	0,07
6	0,04	0,04	0,1	0,05	0,04	0,03	0,01	0,03	0,1	0,07
7	0,04	0,04	0,09	0,06	0,04	0,05	0,01	0,03	0,07	0,09
8	0,06	0,18	0,19	0,17	0,06	0,06	0,03	0,05	0,1	0,06
9	0,04	0,04	0,02	0,05	0,04	0,04	0,01	0,03	0,06	0,08

В табл. 19.2 приведены результаты анализа нативной ЭК-ВЭЖХ препаратов 21B12, приведенных в табл. 19.1, инкубированных при X°C в течение 0 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев и 6 месяцев. "% ВМФ" отображает содержание высокомолекулярного мономера 21B12 в образце. Полученные результаты указывают на то, что не наблюдалось проблем с рецептурой через 6 месяцев; однако, содержание некоторых высокомолекулярных форм увеличилось в метионин-содержащем препарате (т.е. препараты 2, 5 и 8).

Обнаружение микроскопических частиц по рассеиванию света (HIAC)

Электронная система подсчета частиц в жидкости (HIAC/Royco 9703 или эквивалентная), оборудованная датчиком рассеивания света (HIAC/Royco HRLD-150 или эквивалентным) с устройством для отбора образцов жидкости, определяет количество частиц и интервал их размера в предоставленном исследуемом образце. Когда частицы в жидкости проходят между источником света и детектором, они снижают интенсивность или "затемняют" пучок света, который падает на детектор. Если концентрация частиц находится в пределах нормального интервала датчика, эти частицы обнаруживаются по одной. Прохождение каждой частицы через зону обнаружения уменьшает освещенность фотодетектора, и напряжение на выходе фотодетектора моментально снижается. Изменения напряжения регистрируются как электрические импульсы, которые прибор переводит в количество присутствующих частиц. Способ неспецифичный, и размер частиц определяется независимо от их происхождения. Размеры частиц, которые контролировали, составили 10 мкм и 25 мкм.

В данном примере анализ HIAC выполняли с применением образцов, которые хранили при 4°C. Конкретно, образцы препаратов 21B12 из табл. 19.1 обрабатывали вакуумом (процедура под названием "дегазация") для удаления пузырьков воздуха, которые могли бы быть распознаны как частицы в системе подсчета частиц. Для образцов 21B12 методика состояла в обработке образцов вакуумом при 75 торр в течение 1-2 ч. Подсчет частиц выполняли в пределах 2 ч после завершения процесса дегазации.

Фиг. 29A и 29B иллюстрируют результаты анализов HIAC для идентифицированных выше препаратов, которые инкубировали в контейнерах в течение 0 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев и 6 месяцев. Подсчитывали частицы размером 10 мкм и 25 мкм. Фиг. 29A и 29B демонстрируют, что все препараты 21B12 по данным HIAC были стабильными. Хотя препараты в стеклянных шприцах, т.е. препараты 4-6, продемонстрировали более высокое содержание частиц относительно концентрации белка и препарата, результаты подсчета частиц находились ниже пределов Фарм. США для каждого размера частиц (10 мкм и 25 мкм). Пределы Фарм. США для частиц размером 10 мкм составляют 6000 на контейнер, и для частиц размером 25 мкм составляют 600 на контейнер.

Пример 32.

Исследование стабильности 11F1.

Для исследования препаратов 11F1 с высокой концентрацией (150 мг/мл), несколько препаратов были получены с применением вспомогательных веществ-кандидатов, как показано в табл. 20A ниже. Препараты хранили в указанных контейнерах при -30 или 4°C по меньшей мере в течение 6 месяцев.

Таблица 20A

Исследуемые препараты

Название препарата	**Целевая конц. (мг/мл)**	**Контейнер**	**Буфер[a]**	**Целевые вспомогательные вещества**	**Полисорбат 20**	**Конечное значение pH[c]**
1	150	Стеклянный флакон 5см^3	10 мМ Na ацетата	9,0% сахарозы	0,010%	5,2
2	150	BD стеклянный шприц	10 мМ Na ацетата	9,0% сахарозы	0,010%	5,2
3	150	BD стеклянный шприц	10 мМ Na ацетата	150 мМ метионина, 3% сахарозы	0,010%	5,2
4	150	BD стеклянный шприц	10 мМ Na ацетата	250 мМ пролина	0,010%	5,2
5	150	CZ пластиковый шприц	10 мМ Na ацетата	9,0% сахарозы	0,010%	5,2
6	150	CZ пластиковый	10 мМ Na	150 мМ метионина,	0,010%	5,2
		шприц	ацетата	3% сахарозы		
7	150	CZ пластиковый шприц	10 мМ Na ацетата	250 мМ пролина	0,010%	5,2

% ВМФ оценивали эксклюзионной ВЭЖХ, после хранения при -30°C и 4°C, во временных точках, показанных в табл. 20B ниже. Если коротко, ЭК-ВЭЖХ разделяет белки на основании отличий в их гидродинамических объемах. Молекулы белков с большими гидродинамическими объемами элюируются раньше, чем молекулы с меньшими объемами. Нативную ЭК-ВЭЖХ проводили с применением колонки TSK-GEL G3000SWXL 7,8×300 мм (Tosoh Bioscience), с размером частиц 5 мкм, на приборе ВЭЖХ Agilent с детектором для различных длин волн. Подвижная фаза представляла собой 100 мМ натрия фосфата, 250 мМ натрия хлорида, pH 6,8 ± 0,1. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Элюат колонки контролировали на длине волны 280 нм. Интегрированные площади пиков на хроматограммах использовали

для количественного определения количеств мономера и высокомолекулярных форм.

Таблица 20B

% ВМФ при -30° С			% ВМФ при 4° С			
Препараты	T=0	T=4M	T=0	T=2M	T=4M	T=6M
1_	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
2_	0,05	0,05	0,05	0,06	0,04	0,02
3_	0,07	0,26	0,07	0,07	0,07	0,06
4_	0,06	0,07	0,06	0,07	0,06	0,08
5_	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,06
6_	0,06	0,32	0,06	0,06	0,06	0,06
7_	0,08	0,07	0,08	0,06	0,07	0,08

В табл. 20B приведены результаты анализа нативной ЭК-ВЭЖХ препаратов 11F1, приведенных в табл. 20A, инкубированных при 4 или -30°C в течение 0 недель, 2 месяцев, 4 месяцев или 6 месяцев. "% ВМФ" отображает содержание высокомолекулярного 11F1 в образце. Полученные результаты указывают на то, что не наблюдалось проблем с рецептурой через 6 месяцев; однако, содержание некоторых высокомолекулярных форм увеличилось в метионин-содержащих препаратах, которые хранили при температуре -30°C (т.е. препараты 3 и 6).

Стабильность дополнительных препаратов с высокой концентрацией 11F1 оценивали путем приготовления препаратов в первичных контейнерах, как показано в табл. 20C ниже.

Таблица 20C

Препарат	**Конц. 11F1 (мг/мл)**	**Первичный контейнер**	**Вспомогательные вещества**	**0,010% полисорбата**	**Буфер**	**Конечное значение pH**
10	150	Стеклянные флаконы	9,0% сахарозы	PS 20	10 мМ Na ацетата	5,2
20	150	Стеклянные флаконы	9,0% сахарозы	PS 80	10 мМ Na ацетата	5,2
30	180	BD стеклянный шприц	150 мМ метионина, 3% сахарозы	PS 20	10 мМ Na ацетата	5,2
40	180	BD стеклянный шприц	150 мМ метионина, 3% сахарозы	PS 80	10 мМ Na ацетата	5,2
50	180	BD стеклянный шприц	250 мМ пролина	PS 20	10 мМ Na ацетата	5,2
60	180	BD стеклянный шприц	250 мМ пролина	PS 80	10 мМ Na ацетата	5,2
70	180	CZ пластиковый шприц	150 мМ метионина, 3% сахарозы	PS 20	10 мМ Na ацетата	5,2
80	180	CZ пластиковый шприц	150 мМ метионина, 3% сахарозы	PS 80	10 мМ Na ацстата	5,2
90	180	CZ пластиковый шприц	250 мМ пролина	PS 20	10 мМ Na ацетата	5,2
100	180	CZ пластиковый шприц	250 мМ пролина	PS 80	10 мМ Na ацетата	5,2

Препараты инкубировали при 4°C в течение 1 года. В точках времени, указанных в табл. 20D ниже, отбирали образец из каждого контейнера и анализировали методом ЭК-ВЭЖХ, как описано для табл. 20B выше.

Таблица 20D

% ВМФ по данным эксклюзионной ВЭЖХ через 1 год хранения при 4°C

4° C % ВМФ								
Препараты	T=0	T=2H	T=4H	T=6H	T=6 M	T=6,5 M	T=1Год	% изменения
10	0,04	0,07	0,08	0,06	0,07	н/о	0,07	0,03
20	0,05	0,07	0,07	0,07	0,06	н/о	0,06	0,01
30	0,08	0,14	н/о	н/о	н/о	н/о	0,05	-0,03
40	0,09	0,15	0	н/о	н/о	н/о	0,06	-0,03
50	0,08	0,15	0	0	н/о	н/о	0,07	-0,01
60	0,07	0,16	0	0	н/о	н/о	0,08	0,01
70	0,08	0,14	0	0	н/о	0,09	0,06	-0,02
80	0,07	0,14	0	0	н/о	н/о	0,07	0,00
90	0,09	0,15	0	0	н/о	0,09	0,05	-0,04
100	0,08	0,15	0	0	н/о	н/о	0,08	0,00

В точках времени, указанных в табл. 20E ниже, отбирали образец из каждого контейнера, анализировали методом катионообменной ВЭЖХ (КО-ВЭЖХ). Катионообменная ВЭЖХ разделяет белки на основании различий в их поверхностном заряде. При заданном значении pH, заряженные изоформы 11F1 разделяли на катионообменной колонке и элюировали с использованием градиента соли. Элюент контролировали по УФ-поглощению. Распределение заряженной изоформы оценивали путем определения площади пика каждой изоформы как процент от общей площади пика. Нативную КО-ВЭЖХ проводили с использованием колонки Dionex G3000SWXL 4,0 мм ВД ×250 мм (Tosoh Bioscience), с размером частиц 10 мкм, на приборе ВЭЖХ Agilent с детектором для разных длин волн. Подвижная фаза представляла собой линейный градиент 20 мМ морфолиноэтансульфоновой кислоты, pH 6,0±0,1, и такого же буфера, содержащего 500 мМ натрия хлорида. Скорость потока составляла 0,6 мл/мин. Элюат колонки контролировали на длине волны 280 нм. Интегрированные площади пиков на хроматограммах использовали для количественного определения количеств изоформ с различным зарядом.

Таблица 20E

% пика основной изоформы через 1 год хранения при 4°C по данным катионнообменной ВЭЖХ

4° C % пика основной изоформы						
Препарат	T=0	2H	4H	6H	1Г	% изменения
10	76,0	75,9	75,7	75,6	76,2	0,3
20	76,0	76,4	75,7	75,6	76,4	0,5
30	76,0	н/о	н/о	н/о	76,3	0,4
40	75,8	н/о	н/о	н/о	76,0	0,2
50	76,0	н/о	н/о	н/о	76,3	0,4
60	75,8	н/о	н/о	н/о	75,8	0,1
70	75,9	н/о	н/о	н/о	76,2	0,5
80	76,1	н/о	н/о	н/о	76,3	0,3
90	76,0	н/о	н/о	н/о	76,0	0,0
100	75,8	н/о	н/о	н/о	75,9	0,0

Табл. 20D и 20E демонстрируют, что описанные препараты 11F1 продемонстрировали менее чем 5% увеличение % ВМФ (ЭК-ВЭЖХ) или отклонение менее 3-5% пика основной изоформы (КО-ВЭЖХ) в условиях хранения до 1 года при 4°C. Фактически, изменения обоих параметров были на очень низком уровне, что указывает на высоко стабильные препараты.

Обнаружение микроскопических частиц по рассеиванию света (HIAC)

Электронная система подсчета частиц в жидкости (HIAC/Royco 9703 или эквивалентная), оборудованная датчиком рассеивания света (HIAC/Royco HRLD-150 или эквивалентным) с устройством для отбора образцов жидкости определяет количество частиц и интервал их размера в данном исследуемом образце. Когда частицы в жидкости проходят между источником света и детектором, они уменьшают или "затемняют" пучок света, который падает на детектор. Если концентрация частиц находится в пределах нормального интервала датчика, такие частицы обнаруживают по одной. Прохождение каждой частицы через зону обнаружения уменьшает случайный свет на фотодетекторе, и напряжение на выходе фотодетектора немедленно снижается. Изменения напряжения регистрируют как электрические импульсы, которые прибор переводит в количество присутствующих частиц. Метод является неспецифическим, и измеряет частицы независимо от их происхождения. Контролируемые размеры частицы составляют, в общем, 10 и 25 мкм.

В данном примере анализ HIAC выполняли с применением образцов, которые хранили при 4°C. Конкретно, образцы препаратов 11F1 из табл. 20A обрабатывали вакуумом (процедура под названием

"дегазация") для удаления пузырьков воздуха, которые могли бы быть распознаны как частицы в системе подсчета частиц. Для образцов 11F1 методика состояла в обработке образцов вакуумом при 75 торр в течение 1-2 ч. Подсчет частиц выполняли в пределах 2 ч после завершения процесса дегазации.

Фиг. 30A и 30B иллюстрируют результаты анализов HIAC для идентифицированных выше препаратов, которые инкубировали в контейнерах в течение 0 недель и 4 месяцев. Подсчитывали частицы размером 10 и 25 мкм. Фиг. 30A и 30B демонстрируют, что все препараты 11F1 по данным HIAC были стабильными. Результаты подсчета частиц находились ниже пределов Фарм. США для каждого размера частиц (10 и 25 мкм). Пределы Фарм. США для частиц размером 10 мкм составляют 6000 на контейнер, и для частиц размером 25 мкм составляют 600 на контейнер.

Пример 33.

Специфичность связывания 11F1.

Результаты данного анализа демонстрируют, что 11F1 связывается с PCSK9 и не связывается с PCSK1, PCSK2, PCSK7 или фурином, демонстрируя специфичность 11F1 в отношении PCSK9.

Обеспечивали связывание биотинилированного PCSK9, разбавленного буфером A (25 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 0,1% альбумина телячьей сыворотки, 0,05% твина, pH 7,5) с покрытыми нейтравидином 96-луночными планшетами в концентрации 0,2 мкг/мл, для инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре. Отдельно, 0,4 мкг/мл 11F1 инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с различными концентрациями (варьирующими от 0 до 20 мкг/мл) PCSK1, PCSK2, PCSK7, PCSK9 или фурина (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) (разбавленный в буфере A твин вода-в-масле). Ингибитор фурина, в концентрации 4,5 мкг/мл вводили во все содержащие фурин реакционные смеси. Покрытый PCSK9 стрептавидиновый планшет промывали буфером A, смесь антитело/пропротеин конвертаза добавляли на планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывания связанное антитело обнаруживали путем инкубации с козьим-α-человеческим Fc-пероксидаза хрена (160 нг/мл, разбавленный буфером A) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), после чего добавляли субстрат ТМБ. Реакцию останавливали с помощью 1н. HCl, и поглощение считывали на длине волны 450 нм на спектрофотометре Spectramax Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, Калифорния).

Данный анализ основан на способности пропротеин конвертазы в растворе конкурировать с 11F1 за связывание с PCSK9, которым покрыт планшет. Предварительная инкубация 11F1 и PCSK9 в растворе дозозависимым и устойчивым образом снижает количество 11F1, связанного с PCSK9, которым покрыт планшет, что обнаруживают по уменьшению OD_{450} (фиг. 31). Все результаты выражают, как среднее значение OD_{450} ± стандартное отклонение против концентрации пропротеин конвертазы. Предварительная инкубация 11F1 с PCSK1, PCSK2, PCSK7 или фурином в растворе не влияет значительно на связывание 11F1 с PCSK9, которым покрыт планшет. Таким образом, в исследуемых концентрациях белка 11F1 связывается только с PCSK9, но не с другими членами семьи пропротеин конвертазы из числа изученных.

Пример 33.

Эффективность ингибирования 11F1 связывания ЛПНПР:PCSK9.

Пример демонстрирует, что наномолярные концентрации 11F1 могут препятствовать связыванию как D374Y, так и PCSK9 дикого типа с ЛПНПР в условиях данного анализа.

Если коротко, прозрачные 384-луночные планшеты покрывают козьим антителом против рецептора ЛПНП в концентрации 2 мкг/мл (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота), разбавленным ФБР, путем инкубации при 4°C на протяжении ночи. Планшеты тщательно промывают буфером A (100 мМ натрия какодилата, pH 7,5), и далее блокируют буфером B (1% нежирного сухого молока [Bio-Rad Laboratories, Hercules, Калифорния] в буфере A) в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывания, планшеты инкубируют с 0,4 мкг/мл рецептора ЛПНП (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота), разбавленного буфером C (буфер B, содержащий 10 мМ $CaCl_2$) в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Параллельно с данной инкубацией, 20 нг/мл биотинилированного D374Y PCSK9 или 100 нг/мл биотинилированного PCSK9 ДТ инкубировали с различными концентрациями анти-PCSK9 антитела 11F1, разбавленного буфером A (конечные концентрации варьируют от 6,0 нг/мл до 200 мкг/мл для анализа D374Y PCSK9, или от 3,1 нг/мл до 25 мкг/мл для анализа PCSK9 ДТ). Покрытые ЛПНПР планшеты промывали, и добавляли смесь биотинилированный PCSK9/антитело. Планшет ЛПНПР инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Связывание биотинилированного PCSK9 с ЛПНПР обнаруживали инкубацией со стрептавидин-ПХ (500 нг/мл в буфере C), с последующим добавлением субстрата ТМБ. Реакцию останавливали с помощью 1 н HCl, и поглощение считывали на длине волны 450 нм с применением спектрофотометра SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, Калифорния). Программное обеспечение GraphPad Prism (версия 4.01) использовали для нанесения на график логарифма концентрации антитела против OD_{450}, для определения значений IC_{50} нелинейной регрессией.

11F1 ингибирует связывание ЛПНПР:PCSK9. Значения IC_{50} для 11F1 в анализе D374Y PCSK9 варьировали от 7,3 до 10,1 нМ со средним значением (± стандартное отклонение) 9,1±1,5 нМ (n=3). Значения IC_{50} для 11F1 в анализе PCSK9 дикого типа варьировали от 4,4 до 8,1 нМ со средним значением (±стандартное отклонение) 5,9±1,9 нМ (n=3). Следует отметить, что эти значения IC50 зависят от количества рекомбинантного D374Y PCSK9 или PCSK9 ДТ, используемых в анализе связывания. Характер-

ная кривая доза-реакция для анализов как D374Y, так и дикого типа представлена на фиг. 32 и 33 соответственно.

Пример 34.

Эффективность 11F1 с точки зрения блокирования захвата ЛПНП клеткой.

11F1 блокирует взаимодействие между PCSK9 и ЛПНПР in vitro и может уменьшать опосредованное PCSK9 снижение захвата ЛПНП клетками HepG2.

Если коротко, клетки HepG2 человека высевали в черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном (Fisher Scientific CO LLC, Санта Клара, Калифорния) с плотностью 5×104 клеток на лунку в МДСИ (Mediatech Inc., Herndon, Вирджиния) с добавлением с 10% СТЭ и 1% раствора антибиотика-противогрибкового средства (Mediatech Inc., Herndon, Вирджиния). Клетки инкубировали при 37°C (5% CO_2) на протяжении ночи. Для образования комплекса между D374Y PCSK9 и антителом или PCSK9 ДТ и антителом, готовили серийные разведения 11F1 (1:2), от 666,7 нМ до 0,7 нМ (для блокирования D374Y PCSK9) или от 3,3 мкм до 3,3 нМ (для блокирования PCSK9 ДТ) в буфере композиции (25 мМ HEPES, pH 7,5, 0,15 М NaCl). D374Y PCSK9 (2 мкг/мл) или PCSK9 ДТ (25 мкг/мл) разбавляли буфером захвата (МДСИ, содержащая 1% СТЭ) и инкубировали с различными концентрациями 11F1 или только буфера захвата (отрицательный контроль) в течение 1 ч при комнатной температуре со встряхиванием. BODIPY-ЛПНП (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) разбавляли буфером захвата до концентрации 12 мкг/мл. После инкубации на протяжении ночи, клетки HepG2 дважды споласкивали фосфатно-солевым буфером Дюльбекко (ФСБД, Mediatech Inc., Herndon, Вирджиния). 25 мкл комплекса D374Y PCSK9 или PCSK9 ДТ с 11F1 и 25 мкл разбавленного BODIPY-ЛПНП (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) добавляли к клеткам и инкубировали при 37°C (5% CO_2) в течение 3 ч. Клетки промывали 5 раз ФСБД и повторно суспендировали в 100 мкл ФСБД. Флуоресцентные сигналы обнаруживали с применением устройства для считывания планшетов Safire (Tecan Systems Inc., Сан-Хосе, Калифорния) на длине волны 480~520 нм (возбуждение) и 520~600 нм (эмиссия) и выражали, как относительные единицы флуоресценции (ОЕФ).

Программное обеспечение GraphPad Prism (версия 4.02, GraphPad Software Inc., Сан Диего, Калифорния) использовали для нанесения на график логарифма концентрации антитела против ОЕФ и определения значения EC_{50} нелинейной регрессией, с применением программы аппроксимации сигмовидной кривой доза-реакция (вариабельный наклон).

Данный пример показывает, что 11F1 блокировал опосредованное D374Y PCSK9 или PCSK9 ДТ уменьшение захвата ЛПНП клетками HepG2 дозозависимым образом. Добавление рекомбинантного очищенного D374Y PCSK9 (2 мкг/мл) или PCSK9 ДТ (25 мкг/мл) к клеткам HepG2 уменьшало захват BODIPY-ЛПНП до ~50-60% и ~40% от уровня, измеренного для необработанных клеток соответственно. Антитела дозозависимым образом восстанавливали захват ЛПНП до уровня, наблюдаемого в необработанных клетках. Среднее значение (± стандартное отклонение) EC_{50} для способности 11F1 блокировать опосредованное D374Y PCSK9 уменьшение захвата ЛПНП составило 35,3±9,1 нМ (n=6, фиг. 34). Значение EC_{50} для способности 11F1 блокировать опосредованное PCSK9 ДТ уменьшение захвата ЛПНП составило 124,2±28,5 нМ (n=3, фиг. 35). Следует отметить, что полученные значения EC_{50} являются функцией количества рекомбинантного D374Y PCSK9 или PCSK9 ДТ, используемого в клеточном анализе. Значение EC_{50} ниже против D374Y PCSK9, чем PCSK9 ДТ, поскольку меньшее количество D374Y PCSK9 использовали в анализе в связи с тем, что его сродство связывания с ЛПНПР в 5-30 раз выше, чем сродство связывания PCSK9 ДТ (Cunningham с соавт., 2007; Fisher с соавт., 2007; Kwon с соавт., 2008).

Значения EC_{50}, приведенные в данном описании, характерны для средних значений, полученных в результате 3-6 отдельных измерений для 11F1.

Пример 35.

Эффективность 11F1 и 8A3 с точки зрения блокирования человеческого PCSK9, экспрессируемого посредством адено-связанного вируса на мышиной модели.

Однократное внутривенное введение болюса анти-PCSK9 антител 11F1 или 8A3 приводит к значительному снижению не-ЛПВП-Х и ОХ в сыворотке мышей, экспрессирующих человеческий PCSK9 под действием адено-связанного вируса (АСВ). Данный пример демонстрирует эффективность обоих анти-PCSK9 антител с точки зрения блокирования функции человеческого PCSK9 in vivo.

Если коротко, 120 мышей C57BL/6, экспрессирующих человеческий PCSK9, генерировали путем инфицирования сконструированным адено-связанным вирусом (АСВ), кодирующим человеческий PCSK9, что приводило к повышению уровней холестерина липопротеина низкой плотности (ЛПНП-Х) в кровотоке. Анализ холестерина сыворотки проводили с применением химического анализатора Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, Индианаполис, Индиана). Животные были рандомизированы в группы лечения со сходными уровнями не-ЛПВП-Х (ЛПНП-Х и ЛПОНП-Х), ЛПВП-Х и ОХ. В 0-й день лечения (Т=0) подмножество мышей было умерщвлено эвтаназией, и сыворотку собирали с целью определения начальных уровней в указанный день. Далее остальным мышам вводили 11F1, 8A3 или контрольное антитело IgG2 против гемоцианина фиссуреловых (ГЦФ) в дозе 30 мг/кг инъекцией в хвостовую вену. На 1-5-й дни после инъекций, подмножества мышей умерщвляли эвтаназией, цельную кровь отбирали из полой вены и позволяли свертывание в течение 30 мин при комнатной температуре. После центри-

фугирования со скоростью 12000 об/мин с помощью настольной центрифуги в течение 10 мин, сыворотку собирали. Анализ холестерина сыворотки проводили с применением химического анализатора Cobas Integra 400 plus.

Концентрации PCSK9 в сыворотке определяли с применением сэндвичевого анализа ТИФА. Прозрачные 96-луночные планшеты покрывали на протяжении ночи 2 мкг/мл моноклонального анти-PCSK9 антитела (31H4), разбавленного 1× ФБР. Планшеты тщательно промывали 1× ФБР/0,05% твина, и затем блокировали в течение 2 ч с применением 3% АТС/1× ФБР. После промывания планшеты инкубировали в течение 2 ч с сывороткой, разведенной общими разбавителями для анализа (Immunochemistry Technologies, Блумингтон, Миннесота). Рекомбинантный человеческий PCSK9 (от 1 нг/мл до 500 нг/мл) анализировали параллельно и использовали для генерации стандартной кривой на каждом планшете ТИФА. Кроличье поликлональное биотинилированное анти-PCSK9 антитело (D8773, Amgen Inc, Калифорния) добавляли в концентрации 1 мкг/мл (в 1% АТС/ФБР), с последующим добавлением нейтравидина-ПХ в концентрации 200 нг/мл (в 1% АТС/ФБР). Связанный PCSK9 обнаруживали инкубацией с субстратом ТМБ. Реакцию останавливали добавлением 1 н HCl, и поглощение измеряли на длине волны 450 нм на спектрофотометре Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices Inc, Sunnyvale, Калифорния). Стандартную кривую (4-параметрическая логистическая аппроксимация), генерируемую с применением рекомбинантного человеческого PCSK9, использовали для определения соответствующей концентрации PCSK9 в образцах сыворотки.

Концентрации антитела в сыворотке определяли с применением сэндвичевого анализа ТИФА. Реактивы: поликлональный козий анти-человеческий Fc IgG и ПХ-меченный козий поликлональный анти-человеческий IgG Fcγ (оба от Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA) использовались в качестве антитела для захвата и обнаружения соответственно. Раствор субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), реагирующий пероксидом, и в присутствии пероксидазы хрена (ПХ) генерирующий сигнал для колориметрического обнаружения, который пропорционален количеству соответствующего анти-PCSK9 антитела, связанного с реактивом для захвата. Интенсивность цвета (оптическая плотность, OD) измеряли на длине волны 450 нм минус 650 нм с применением устройства для считывания микропланшетов (Spectra Max Plus 384). Данные были проанализированы с применением пакета упаковки данных Watson версия 7.0.0.01 (Thermo Scientific, Waltham, Массачусетс) с логистической регрессией (аутооценка) отдельно полученных стандартных кривых. Нижний предел количественного определения (НПКО) для анализа составлял 34,4 нг/мл.

Вычисление фармакокинетических параметров у мышей АСВ

Не-компартментальный анализ (НКА) проводили на концентрациях в сыворотке с применением предварительно определенных номинальные точек времени для каждого субъекта, с применением WinNonlin Enterprise, версия 5.1.1 (Pharsight, Сан-Луис, Миссури). Точки данных для оценки констант терминальной скорости элиминации и периодов полувыведения были выбраны путем визуальной инспекции профилей концентрация-время. Зарегистрированные параметры НКА включают: очевидный период полувыведения ($t_{1/2}$), площадь под кривой концентрация в сыворотке-время от нулевой точки времени до последней измеренной концентрации (AUC_{0-t}) и очевидный клиренс из сыворотки (CL_{0-t}). AUC_{0-t} определяли с применением линейного логарифмического-линейного трапецоидального метода, и CL_{0-t} вычисляли по дозе/AUC_{0-t} для антител 11F1, 8A3 и 31H4. Анализ раствора дозы после исследования показал, что фактические дозы находятся в пределах 20% от целевой дозы 30 мг/кг. Однако, для контроля IgG2 анализ показал, что фактическая доза составляет только 40% от предусмотренной целевой дозы. Таким образом, откорректированная доза 12 мг/кг использовалась для вычисления CL_{0-t} с целью контроля IgG2. Параметры были проиллюстрированы на трех значимых фигурах, за исключением периода полувыведения, который был проиллюстрирован на двух значимых фигурах.

Статистический анализ

Все результаты для холестерина выражали, как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Все фармакокинетические данные выражали, как среднее значение ± стандартное отклонение. Значение p 0,05, определенное 1-сторонним дисперсионным анализом, использовали в качестве порога для определения статистической значимости соотношения между животными, которым было инъекционно введено контрольное анти-ГЦФ IgG2 антитело и анти-PCSK9 антитело, в одной и той же временной точке.

Влияние анти-PCSK9 антител на не-ЛПВП-Х, ЛПВП-Х и ОХ сыворотки

Для определения начального уровня, подмножество мышей, экспрессирующих человеческий PCSK9, умерщвляли эвтаназией до инъекции антител, и кровь собирали. Уровни не-ЛПВП-Х, ЛПВП-Х и ОХ у этих животных составили 33±4, 117±4 и 183±9 мг/дл, соответственно (среднее значение ± стандартная ошибка среднего). Уровни PCSK9 у наивных животных были определены как составляющие 4921±2044 нг/мл.

По сравнению с мышами, которым было инъекционно введено контрольное анти-ГЦФ IgG2 антитело (контрольные животные), инъекция 11F1 приводила к значимому снижению не-ЛПВП-Х на 1-й, 2-й и 4-й день после инъекции (с максимумом 59%), в то время как уровень ОХ существенно снижался только на 4-й день (на 22%) (фиг. 36, 37). Не наблюдалось значительного снижения ЛПВП-Х ни в одной из

временных точек (фиг. 38).

По сравнению с контрольными животными, инъекция 8A3 приводила к значительному снижению уровня не-ЛПВП-Х на 1-й, 2-й и 4-й день после инъекции (с максимумом 65%), в то время как уровень ОХ значительно снижался на 2-й день после инъекции (с максимумом 24%) (фиг. 36, 37). Не наблюдалось значительного снижения ЛПВП-Х ни в одной из временных точек (фиг. 38).

Фармакокинетика

При внутривенном введении дозы 30 мг/кг, 11F1 и 8A3 демонстрировали в высокой степени сходное фармакокинетическое поведение (фиг. 39). Для этих двух молекул, системный контакт AUC_{0-t}, оцененное значение CL_{0-t} и очевидные периоды полувыведения были эквивалентными (таблица на фиг. 40). Контрольное анти-ГЦФ IgG2 антитело неожиданно продемонстрировало более низкий системный контакт AUC_{0-t}, чем 11F1 и 8A3, но вероятно, это является результатом введения антитела в дозе ниже предусмотренной (12 мг/кг в противоположность 30 мг/кг; анализ раствора дозы показал концентрацию антитела 40% от целевого значения. Значение CL_{0-t} контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела было сходным со значениями 11F1 и 8A3, при вычислении с применением откорректированной дозы, и очевидный период полувыведения контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела был оценен как >120 ч. Полученные данные свидетельствовали, что влияние лиганда PCSK9 на распределение антитела было менее выраженным для 11F1 и 8A3 по сравнению с другими антителами, введенными в модели ACB, поскольку значения CL_{0-t} для 11F1 и 8A3 были в большей степени сходны с контрольным анти-ГЦФ IgG2 антителом.

Краткое описание

Экспрессия человеческого PCSK9 у мышей ACB (приблизительно 5 мкг/мл) приводила к уровню не-ЛПВП-Х сыворотки приблизительно 33 мг/дл. После инъекции 30 мг/кг 11F1, значительное снижение уровня не-ЛПВП-Х сыворотки наблюдалось на 1-й, 2-й и 4-й день после инъекции (с максимумом 59%, по сравнению с контрольными животными). Значительное снижение уровня ОХ наблюдалось только на 4-й день. Инъекция 8A3 приводила к подобному образцу снижения уровня не-ЛПВП-Х с максимумом 65%, по сравнению с контрольными животными. Однако, введение 8A3 приводило к существенному снижению уровня ОХ только на 2-й день после инъекции, с максимумом 24%. Не наблюдалось значительного снижения уровня ЛПВП-Х у животных, которым вводили 11F1 или 8A3. Анализ уровней антитела 11F1 и 8A3 в сыворотке продемонстрировал сходный профиль с контрольным анти-ГЦФ IgG2 антителом.

Пример 36.

Влияние однократной подкожной дозы 11F1, 21B12 и 8A3 на липиды сыворотки у яванских макак.

Однократное п/к введение 11F1, 8A3 или 21B12 яванским макакам приводило к существенному снижению уровня ЛПНП-Х и ОХ в сыворотке. Данное исследования продемонстрировало способность анти-PCSK9 антител снижать уровень холестерина сыворотки у негуманоидных приматов.

Если коротко, наивных самцов яванских макак акклиматизировали к среде по меньшей мере в течение 2 недель до эксперимента. Животные были рандомизированы в группы лечения на основании предварительного скрининга уровней ОХ, ЛПВП-Х, ЛПНП-Х и триглицеридов сыворотки, а также их массы тела. Через 1 неделю, животные голодали на протяжении ночи, и отбирали образцы крови из периферических сосудов (головная или сафенная вена) для измерения начальных уровней липидов сыворотки в точке времени, обозначенной T=0. Далее животным инъекционно вводили п/к контрольное анти-ГЦФ IgG2 антитело, 11F1, 21B12 или 8A3 (все в 10 мМ NaOAc, pH 5,2, 9% сахарозы) в концентрации 0,5 мг/кг (все в концентрации 0,4 мл/кг массы тела). Далее образцы крови натощак были отобраны у животных в обозначенных точках времени на протяжении 45 дней.

Дизайн эксперимента.

Группа №	Кол-во самцов	Способ	Лечение	Уровень дозы (мг/кг)	Конц. (мг/мл)	Объем (мл/кг)
1	5	п/к	Анти-ГЦФ	0,5	1,09	0,4
2	5	п/к	21B12	0,5	1,19	0,4
3	5	п/к	11F1	0,5	1,11	0,4
4	5	п/к	8A3	0,5	1,25	0,4

В указанных точках времени, образцы крови отбирали у животных в условиях голодания в течение ночи из периферических сосудов (головная или сафенная вена). Цельной крови позволяли свертываться в течение 30 мин при комнатной температуре. После центрифугирования со скоростью 3000 об/мин в течение 20 мин сыворотку собирали. Прямой анализ холестерина сыворотки проводили с использованием анализатора Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics Inc, Индианаполис, Индиана). Уровни Аполипопротеина B в сыворотке определяли в указанных точках времени (дни 0, 3, 6, 15, 24 и 33) с помощью Anilytics, MD, и следующей методологии. Аликвоту 17 мкл образца (без подготовки) использовали для анализа на анализаторе Hitachi 717 с использованием стандартной 6-точечной кривой. Если начальное значение образца было выше, чем линейность стандартной кривой, то образец разбавляли и анализировали повторно, умножая результат на подходящий фактор разведения. Реактивы для анализа (набор реактивов APO-B № 86071, набор антител № 86060, контрольный набор № 86103) были получены от DiaSorin (Stillwater,

Миннесота).

Концентрации антитела в сыворотке определяли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с интервалом анализа от 34,4 до 3000 нг/мл (причем 34,4 нг/мл представляет нижний предел количественного определения [НПКО]).

Не-компартментальный анализ (НКА) выполняли для концентраций в сыворотке с использованием предварительно определенных номинальных точек времени для каждого субъекта, с использованием Watson® LIMS, версия 7.0.0.01 (Thermo Scientific, Waltham, Массачусетс). Точки данных для оценки констант терминальной скорости элиминации и периодов полувыведения были выбраны путем визуальной инспекции профилей концентрация-время и линейного метода наилучшей аппроксимации (обычно от 360 час, до тех пор, пока концентрации антитела не снижались ниже нижнего предела количественного определения). Зарегистрированные параметры НКА включают: терминальный период полувыведения ($t_{1/2}$, z), максимальную концентрацию в сыворотке (C_{max}), площадь под кривой концентрация в сыворотке-время от нулевой точки времени до бесконечности (AUC_{0-inf}) и очевидный клиренс из сыворотки (CL/F). AUC_{0-inf} вычисляли с использованием линейного логарифмическо-линейного трапецодального метода. Все параметры были проиллюстрированы на трех значимых фигурах, за исключением периода полувыведения, который был проиллюстрирован на двух значимых фигурах.

Статистический анализ

Статистическая модель, в которой начальный уровень рассматривается как ковариант, и группа лечения как фиксированное влияние, была аппроксимирована к логарифмически преобразованному ответу в каждой точке времени для ЛПНП-Х, ЛПВП-Х, ОХ и триглицеридов. Коррекция множественного сравнения Тьюки была применена, чтобы отрегулировать попарные сравнения в каждой точке времени. Статистическая значимость была оценена при альфа=0,05 с использованием скорректированных значений p.

Влияние 11F1, 21B12 и 8A3 на уровень холестерина ЛПНП сыворотки

Максимальное снижение ЛПНП-Х для 11F1 наблюдалось через 9 дней после инъекции, со снижением ЛПНП-Х на 57%, по сравнению с макаками, которых лечили контрольным анти-ГЦФ IgG2 антителом (контрольные животные). Уровень ЛПНП-Х возвращался к значениям, сходным с наблюдаемыми у контрольных животных, на 27-й день. Максимальное снижение ЛПНП-Х для 21B12 наблюдалось через 3 дня после инъекции, со снижением ЛПНП-Х на 64%, по сравнению с контрольными животными. Уровень ЛПНП-Х возвращался к значениям, сходным с наблюдаемыми у контрольных животных, на 6-й день. Максимальное снижение ЛПНП-Х для 8A3 наблюдалось на 4-й день после инъекции, со снижением ЛПНП-Х на 54%, по сравнению с контрольными животными. Уровень ЛПНП-Х возвращался к значениям, сходным с наблюдаемыми у контрольных животных, на 27-й день (фиг. 41).

Влияние 11F1, 21B12 и 8A3 на уровень общего холестерина сыворотки

Максимальное снижение ОХ для 11F1 наблюдалось через 9 дней после инъекции, со снижением ОХ на 27%, по сравнению с макаками, которых лечили контрольным анти-ГЦФ IgG2 антителом (контрольные животные). Уровень ОХ возвращался к значениям, сходным с наблюдаемыми у контрольных животных, на 27-й день. Максимальное снижение ОХ для 21B12 наблюдалось на 3-й день после инъекции, со снижением ОХ на 20%, по сравнению с контрольными животными. Уровень ОХ временно возвращался к уровням, сходным с наблюдаемыми у леченных растворителем макак на 4-й день, но был существенно ниже между 14 и 18 днями, включительно. Максимальное снижение ОХ для 8A3 наблюдалось на 9-й день после инъекции, со снижением ОХ на 22%, по сравнению с контрольными животными. Уровень ОХ временно возвращался к уровням, сходным с наблюдаемыми у леченных растворителем макак на 30-й день (фиг. 42).

Влияние 11F1, 21B12 и 8A3 на уровень холестерина ЛПВП сыворотки и триглицеридов

В среднем и в каждой точке времени, уровни ЛПВП-Х или триглицеридов у животных, леченых 11F1 или 8A3, не отличались существенно (на основании уровня значимости альфа=0,05) от наблюдаемых у леченных контрольных анти-ГЦФ IgG2 антителом макак. Однако, 21B12 индуцировал статистически значимое изменение уровня ЛПВП-Х в одной точке времени (18-й день после инъекции) (фиг. 43 и 45).

Влияние 11F1, 21B12 и 8A3 на уровень аполипопротеина B (APOB)

Уровни ApoB в сыворотке измеряли на 3-й, 6-й, 15-й, 24-й и 33-й день после инъекции. 11F1 и 8A3 ассоциировались со снижением уровня ApoB на 3-24-й дни, по сравнению с леченными контрольным анти-ГЦФ IgG2 антителом макаками (фиг. 46). 21B12 ассоциировалось со статистически значимым снижением уровней ApoB только на 3-й день.

Фармакокинетические профили 11F1, 21B12 и 8A3

Суммарный график средних профилей концентрация-время в ходе лечения показан в 748. Оцененные средние фармакокинетические параметры для животных, получавших 11F1, 21B12, 8A3 и контрольное анти-ГЦФ IgG2 антитело проиллюстрированы в табл. фиг. 47.

Абсорбция антитела во всех группах была систематической и характерной для подкожного введения антитела. Фармакокинетическое поведение 21B12 относительно CL/F, C_{max} и AUC_{0-inf} согласовалось с наблюдаемым в предыдущих исследованиях, в которых 21B12 вводили в такой же дозе. Фармакокинетика 11F1 и 8A3 существенно отличалась от 21B12, при этом наблюдалось снижение CL/F (приблизи-

тельно 15% от CL/F 21B12) и периоды полувыведения были оценены как более длительные (приблизительно 200 ч по сравнению с 40 ч для 21B12). Следует отметить, что с точки зрения фармакокинетики 11F1 и 8A3 была неотличимы как друг от друга, так и от контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела. Полученные данные наводят на мысль о том, что ассоциация с мишенью PCSK9 оказывает намного меньшее влияние на диспозицию 11F1 и 8A3, чем 21B12, притом, что профиль системного контакта для 11F1 и 8A3 такой же, как и для контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела без сродства к PCSK9.

Краткое описание результатов

В ходе 45-дневного исследования, статистически значимое снижение уровня ОХ и ЛПНП-Х наблюдалось у животных, которым вводили 11F1, 21B12 или 8A3, по сравнению с контрольным анти-ГЦФ IgG2 антителом. 11F1 ассоциировалось со статистически значимым снижением уровня ЛПНП-Х (против контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела) со 2-го дня до 24-й день, включительно. 21B12 продемонстрировало статистически значимое снижение уровня ЛПНП-Х (против контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела) с 1-го дня до 4-го дня, включительно. 8A3 продемонстрировало статистически значимое снижение уровня ЛПНП-Х (против контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела) с 1-го дня до 24-го дня, включительно. Изменения уровня ОХ и зеркальные изменения уровня АроВ наблюдались для ЛПНП-Х во всех группах. 11F1 обеспечивало максимальное снижение уровня ЛПНП-Х (против контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела в той же временной точке) через 9 дней после инъекции (-57%). 21B12 обеспечивал максимальное снижение уровня ЛПНП-Х (против контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела в той же временной точке) через 3 дня после инъекции (-64%). 8A3 обеспечивало максимальное снижение уровня ЛПНП-Х (против контрольного анти-ГЦФ IgG2 антитела в той же временной точке) через 4 дня после инъекции (-54%). 21B12 снижало ЛПВП-Х в единственной временной точке, через 18 дней после инъекции. Не наблюдалось статистически значимых изменений уровня ЛПВП-Х после введения 11F1 или 8A3. Не наблюдалось статистически значимых изменений уровня триглицеридов после введения 11F1, 21B12 или 8A3.

Пример 37.

Исследование в 2-х частях для оценки безопасности, переносимости и эффективности влияния человеческого анти-PCSK9 антитела на уровень ЛПНП-Х у субъектов с гомозиготной семейной гиперхолестеринемией.

Дизайн исследования: данное исследование проводилось в 2-х частях. Часть А представляет собой открытое, рандомизированное, плацебо-контролируемое, многоцентровое пилотное исследование с одной веткой. Часть Б представляет собой двойное слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое, многоцентровое исследование человеческого антитела, 21B12, с расширенным включением, но в остальном с идентичным части А дизайном. Критерии включения/исключения и расписание обследований будут одинаковыми для частей А и Б.

Критерии включения:

мужчины и женщины в возрасте от ≥12 до ≤65 лет;

диагноз гомозиготной семейной гиперхолестеринемии;

стабильная гиполипидемическая терапия по меньшей мере в течение 4 недель:

холестерин ЛПНП >130 мг/дл (3,4 ммоль/л);

триглицериды <400 мг/дл (4,5 ммоль/л);

масса тела >40 кг или более на момент скрининга.

Критерии исключения:

аферез ЛПНП или плазмы в пределах 8 недель до рандомизации;

класс III или IV согласно Нью-Йоркской ассоциации сердечной недостаточности (NACH) или последние показатели фракции выброса левого желудочка <30%,

инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, чрезкожное вмешательство на коронарных сосудах (ЧККС), аортокоронарное шунтирование (АКШ) или инсульт в пределах 3 месяцев до рандомизации;

плановое кардиохирургическое вмешательство или реваскуляризация;

неконтролируемая сердечная аритмия;

неконтролируемая гипертензия.

Расписание обследований включает, не ограничиваясь ими, сбор информации о побочных эффектах (ПЭ) и серьезных побочных эффектах (СПЭ), основные показатели жизнедеятельности, сопутствующее лечение, лабораторные анализы, и т.п.

Субъекты, которые соответствуют критериям включения/исключения, будут проинструктированы придерживаться диеты Панели лечения взрослым НОПХ ПЛВ (или сравнимой), и от них будут требовать принимать текущую гиполипидемическую терапию на протяжении исследования.

Препараты 21B12 будут предоставлены в форме стерильной, прозрачной, бесцветной, замороженной жидкости. Каждый стерильный флакон заполнен объемом для введения 1 мл раствора 70 мг/мл 21B12, содержащего 10 мМ натрия ацетата, 9% мас./об. сахарозы, 0,004% мас./об. полисорбатов 20, pH 5,2. Каждый флакон предназначен только для одноразового использования. Плацебо будет предоставлено в идентичных контейнерах в виде прозрачной, бесцветной, стерильной, не содержащей белка замороженной жидкости, содержащей 10 мМ натрия ацетата, 9% мас./об. сахарозы, 0,004% мас./об. полисорбата 20, pH 5,2.

В часть А будут включены 4-16 субъектов, и будут получать немаскированные препараты 21B12 (420 мг К4Н). Визиты исследования будут происходить 1 раз в 4 недели. Эти визиты будут включать сбор информации о побочных эффектах (ПЭ) и серьезных побочных эффектах (СПЭ), основных показателях жизнедеятельности, сопутствующем лечении, лабораторные анализы, и т.п. Панель липидов натощак будет получена на 6-й неделе для оценки надира ЛПНП-Х в ответ на лечение препаратом 21B12. Препарат 21B12 будут вводить в 1-й день, на 4-й неделе и 8-й неделе. Конечный визит исследования (КВИ) и последнюю оценку уровня липидов будут проводить на 12-й неделе.

Приблизительно 51 новых субъектов будут включены в части Б. Включенные субъекты будут рандомизированы для распределения 2:1 в 2 группы лечения: 420 мг 21B12 К4Н п/к или плацебо К4Н п/к. Рандомизация будет стратифицирована начальными уровнями ЛПНП-Х. Визиты исследования будут проводиться 1 раз в 4 недели, с двумя необязательными визитами на 2-й неделе и 10-й неделе. Визиты будут включать сбор данных о ПЭ и СПЭ, основных показателях жизнедеятельности, сопутствующем лечении, лабораторные анализы, и т.п. Панель липидов натощак будет получена на 6-й неделе, чтобы оценить надир ЛПНП-Х в ответ на лечение 21B12. Препарат 21B12 будут вводить в 1-й день, на 4-й неделе и на 8-й неделе. Конечный визит исследования (КВИ) и последнюю оценку уровня липидов будут проводить на 12-й неделе для всех субъектов.

Включение путем ссылки

Все ссылки, цитируемые в данном описании, в том числе патенты, патентные заявки, трактаты, руководства, и т.п., а также ссылки, цитируемые в данном описании, до той степени, до которой они не были включены ранее, таким образом, включены в данное описание путем ссылки в полном объеме. До той степени, до которой любое из определений или терминов, предложенных в ссылках, включеных путем ссылки, отличается от терминов и обсуждения, предложенных в данном описании, преобладают настоящие термины и определения.

Эквиваленты

Вышеизложенное письменное описание рассматривается как достаточное, чтобы позволить специалисту в данной области практиковать изобретение. Вышеизложенное описание и примеры детализируют некоторые предпочтительные варианты изобретения и описывают наилучший метод, предусмотренный изобретателями. Следует понимать, однако, что независимо от того, насколько подробно вышеизложенное описано в тексте, изобретение может практиковаться многими способами, и изобретение следует трактовать как ограниченное в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение от 70 до 450 мг антитела против PCSK9 для снижения сывороточного холестерина ЛПНП у пациента, причем антитело против PCSK9 содержит:

a) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи, имеющий последовательность CDRL1 в SEQ ID NO: 23, CDRL2, имеющий последовательность CDRL2 в SEQ ID NO: 23, и CDRL3, имеющий последовательность CDRL3 в SEQ ID NO: 23, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи, имеющий последовательность CDRH1 в SEQ ID NO: 49, CDRH2, имеющий последовательность CDRH2 в SEQ ID NO: 49, и CDRH3, имеющий последовательность CDRH3 в SEQ ID NO: 49, причем CDR определены по Chothia или AbM;

b) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162, CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 395, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 368, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180;

c) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, или

d) вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

2. Применение от 70 до 450 мг антитела против PCSK9 для лечения или предотвращения связанного с холестерином расстройства у пациента с уровнем сывороточного холестерина ЛПНП, причем антитело против PCSK9 содержит:

a) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи, имеющий последовательность CDRL1 в SEQ ID NO: 23, CDRL2, имеющий последовательность CDRL2 в SEQ ID NO: 23, и CDRL3, имеющий последова-

тельность CDRL3 в SEQ ID NO: 23, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи, имеющий последовательность CDRH1 в SEQ ID NO: 49, CDRH2, имеющий последовательность CDRH2 в SEQ ID NO: 49, и CDRH3, имеющий последовательность CDRH3 в SEQ ID NO: 49, причем CDR определены по Chothia или AbM;

b) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162, CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 395, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 368, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180;

c) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, или

d) вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

3. Применение по п.2, в котором связанное с холестерином расстройство выбрано из группы, состоящей из семейной гиперхолестеринемии, включая гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию и гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, несемейной гиперхолестеринемии, повышенного уровня липопротеина (a), заболевания сердца, метаболического синдрома, диабета, заболевания коронарных сосудов сердца, инсульта, сердечно-сосудистого заболевания, болезни Альцгеймера, заболевания периферических артерий, гиперлипидемии и дислипидемии.

4. Применение по п.3, в котором семейная гиперхолестеринемия включает гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию и гомозиготную семейную гиперхолестеринемию.

5. Применение по п.1 или 2, в котором уровень сывороточного холестерина ЛПНП у указанного пациента снижается на количество, выбранное из группы, состоящей из a) по меньшей мере около 15%, b) по меньшей мере около 30%, c) по меньшей мере около 40%, d) по меньшей мере около 50% и e) по меньшей мере около 60%.

6. Применение по п.1 или 2, в котором антитело против PCSK9 содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

7. Применение по п.1 или 2, в котором антитело против PCSK9 содержит гипервариабельный участок (CDR1) легкой цепи, имеющий последовательность CDRL1 в SEQ ID NO: 23, CDRL2, имеющий последовательность CDRL2 в SEQ ID NO: 23, и CDRL3, имеющий последовательность CDRL3 в SEQ ID NO: 23, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи, имеющий последовательность CDRH1 в SEQ ID NO: 49, CDRH2, имеющий последовательность CDRH2 в SEQ ID NO: 49, и CDRH3, имеющий последовательность CDRH3 в SEQ ID NO: 49, причем CDR определены по Chothia или AbM.

8. Применение по п.1 или 2, в котором тяжелая цепь содержит CDR1, содержащий SEQ ID NO: 308, CDR2, содержащий SEQ ID NO: 320, и CDR3, содержащий SEQ ID NO: 310, и легкая цепь содержит CDR1, содержащий SEQ ID NO: 305, CDR2, содержащий SEQ ID NO: 312, и CDR3, содержащий SEQ ID NO: 319.

9. Применение по п.1 или 2, в котором тяжелая цепь содержит CDR1, содержащий SEQ ID NO: 368, CDR2, содержащий SEQ ID NO: 175, и CDR3, содержащий SEQ ID NO: 180, и легкая цепь содержит CDR1, содержащий SEQ ID NO: 158, CDR2, содержащий SEQ ID NO: 162, и CDR3, содержащий SEQ ID NO: 395.

10. Применение по п.1 или 2, в котором антитело против PCSK9 применяется в дозе, выбранной из группы, состоящей из a) от около 105 до 420 мг, b) от около 120 до около 200 мг, c) от около 140 до около 180 мг, d) от около 140 до около 170 мг, e) от около 250 до 420 мг, f) от около 250 до 420 мг, g) от около 250 до 420 мг; h) от около 350 до 420 мг, i) 70 мг, j) около 105 мг, k) около 120 мг, l) около 140 мг, m) около 150 мг, n) около 210 мг, o) около 280 мг, p) около 300 мг, q) около 350 мг или r) 420 мг.

11. Применение по п.10, в котором антитело против PCSK9 применяют по схеме, выбранной из группы, состоящей из (1) 1 раз в неделю, (2) 1 раз в 2 недели, (3) 1 раз в месяц, (4) 1 раз в 2 месяца, (5) 1 раз в 3 месяца, (6) 1 раз в 6 месяцев и (7) 1 раз в 12 месяцев.

12. Применение по п.10, в котором антитело против PCSK9 составлено для парентерального введения.

13. Применение по п.10, в котором антитело против PCSK9 составлено для внутривенного введения.

14. Применение по п.10, в котором антитело против PCSK9 составлено для подкожного введения.

15. Применение по п.14, в котором антитело против PCSK9 содержит:

i) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162, CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 395, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 368, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180; или

ii) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310.

16. Применение по п.14, в котором антитело против PCSK9 содержит гипервариабельный участок (CDR1) легкой цепи, имеющий последовательность CDRL1 в SEQ ID NO: 23, CDRL2, имеющий последовательность CDRL2 в SEQ ID NO: 23, и CDRL3, имеющий последовательность CDRL3 в SEQ ID NO: 23, и гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи, имеющий последовательность CDRH1 в SEQ ID NO: 49, CDRH2, имеющий последовательность CDRH2 в SEQ ID NO: 49, и CDRH3, имеющий последовательность CDRH3 в SEQ ID NO: 49, причем CDR определены по Chothia или AbM.

17. Применение по п.14, в котором антитело против PCSK9 содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

18. Применение по п.15 или 16, в котором антитело против PCSK9 находится в дозе 70 мг и составлено для подкожного введения, причем применение включает снижение уровня холестерина ЛПНП в сыворотке пациента по меньшей мере на около 15-50%.

19. Применение по п.15 или 16, в котором антитело против PCSK9 находится в дозе от 70 до 280 мг и составлено для подкожного введения, причем применение включает снижение уровня сывороточного холестерина ЛПНП пациента по меньшей мере на около 15-50%.

20. Применение по п.15 или 16, в котором антитело против PCSK9 находится в дозе от 280 до 420 мг и составлено для подкожного введения, причем применение включает снижение уровня сывороточного холестерина ЛПНП пациента по меньшей мере на около 15-50%.

21. Применение по п.19, в котором антитело против PCSK9 применяют в дозе 120 мг.

22. Применение по п.19, в котором антитело против PCSK9 применяют в дозе 140 мг.

23. Применение по п.20, в котором антитело против PCSK9 применяют в дозе 420 мг.

24. Применение по п.2, дополнительно включающее применение по меньшей мере одного другого средства для снижения уровня холестерина перед, после или одновременно с антителом против PCSK9.

25. Применение по п.24, в котором по меньшей мере одно другое средство для снижения уровня холестерина выбрано из группы, состоящей из статинов, включая аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин, симвастатин, никотиновой кислоты, фибриновой кислоты, секвестрантов желчных кислот, ингибитора абсорбции холестерина, модифицирующих липиды средств, агонистов ППАР гамма, агонистов ППАР альфа/гамма, ингибиторов скваленсинтетазы, ингибиторов ТБХЭ, антигипертензивных средств, противодиабетических средств, включая сульфонилмочевины, инсулин, аналоги GLP-1, ингибиторы ДДП4, модуляторов АроВ, ингибиторов МБТ и/или средств для лечения облитерирующего артериосклероза, онкостатина М, эстрогена, бербина и терапевтического средства для связанного с иммунитетом расстройства.

26. Применение по п.17, дополнительно включающее применение по меньшей мере одного другого средства для снижения уровня холестерина перед, после или одновременно с антителом против PCSK9.

27. Применение по п.26, в котором по меньшей мере одно другое средство для снижения уровня холестерина выбрано из группы, состоящей из статинов, включая аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин, симвастатин, никотиновой кислоты, фибриновой кислоты, секвестрантов желчных кислот, ингибитора абсорбции холестерина, модифицирующих липиды средств, агонистов ППАР гамма, агонистов ППАР альфа/гамма, ингибиторов скваленсинтетазы, ингибиторов ТБХЭ, антигипертензивных средств, противодиабетических средств, включая производные сульфонилмочевины, инсулин, аналоги GLP-1, ингибиторы ДДП4, модуляторов АроВ, ингибиторов МБТ и/или средств для лечения облитерирующего артериосклероза, онкостатина М, эстрогена, бербина и терапевтического средства для связанного с иммунитетом расстройства.

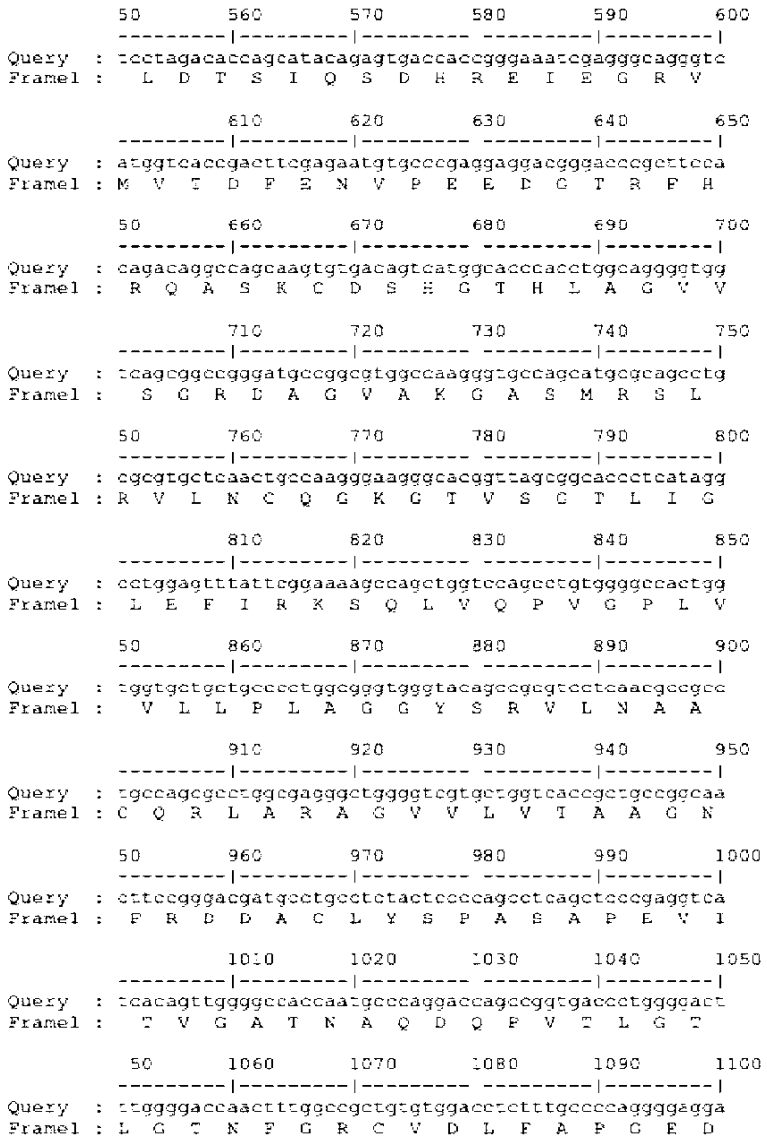
SEQ ID NO:1

QEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKEE
THLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELALKLPHV
DYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHRE
IEGRVMVTDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSL
RVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLA
RAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVD
LFAPGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRL
IHFSAKDVINEAWFPEDQRVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRM
ATAIARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIAR
CCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSSHWEVEDLGTHKPPVLR
PRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQGQVTVACEEGWTLTGC
SALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEEAVTAVAICCRSRHLAQASQE
LQ

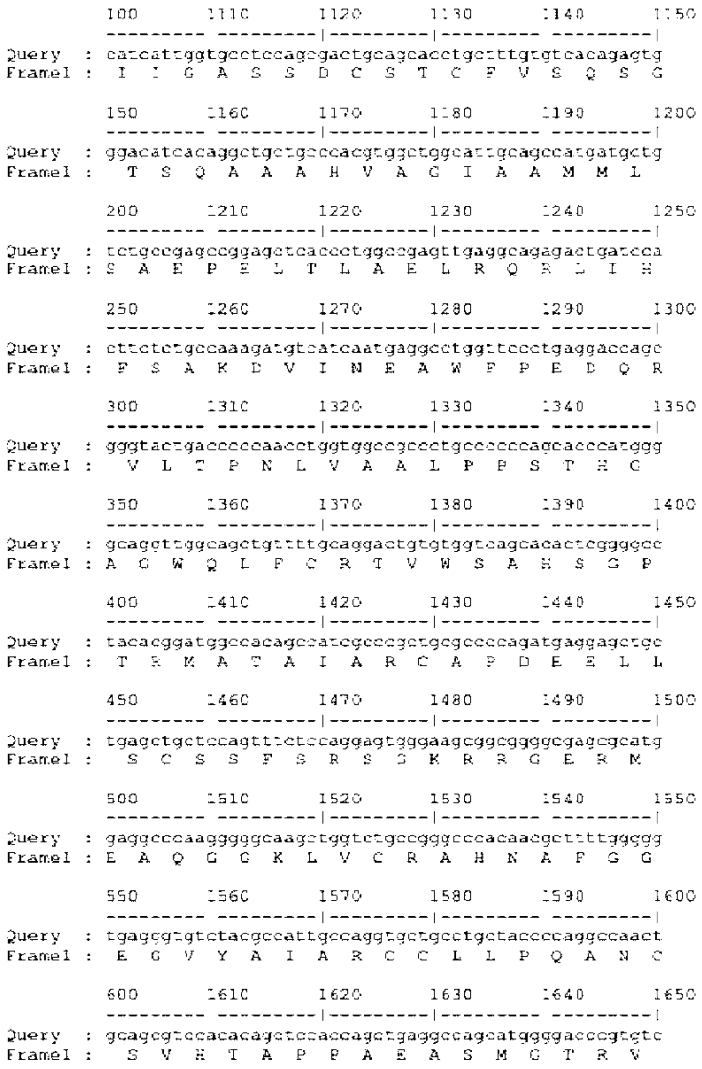
Фиг. 1A

```
                  10        20        30        40        50
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : atgggcaccgtcagctccaggcggtcctggtggccgctgccactgctgct  SEQ ID NO:2
Frame1  : M  G  T  V  S  S  R  R  S  W  W  P  L  P  L  L  L   SEQ ID NO:3

                  60        70        80        90        100
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : gctgctgctgctgctcctgggtcccgcgggcgcccgtgcgcaggaggacg
Frame1  :  L  L  L  L  L  L  G  P  A  G  A  R  A  Q  E  D  E

                  110       120       130       140       150
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : aggacggcgactacgaggagctggtgctagccttgcgctccgaggaggac
Frame1  :   D  G  D  Y  E  E  L  V  L  A  L  R  S  E  E  D

          50        160       170       180       190       200
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : ggcctggccgaagcacccgagcacggaaccacagccaccttccaccgctg
Frame1  : G  L  A  E  A  P  E  H  G  T  T  A  T  F  H  R  C

                  210       220       230       240       250
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : cgccaaggatccgtggaggttgcctggcacctacgtggtggtgctgaagg
Frame1  :  A  K  D  P  W  R  L  P  G  T  Y  V  V  V  L  K  E

          50        260       270       280       290       300
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : aggagacccacctctcgcagtcagagcgcactgcccgccgcctgcaggcc
Frame1  :   E  T  H  L  S  Q  S  E  R  T  A  R  R  L  Q  A

                  310       320       330       340       350
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : caggctgcccgccggggatacctcaccaagatcctgcatgtcttccatgg
Frame1  : Q  A  A  R  R  G  Y  L  T  K  I  L  H  V  F  H  G

          50        360       370       380       390       400
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : ccttcttcctggcttcctggtgaagatgagtggcgacctgctggagctgg
Frame1  :  L  L  P  G  F  L  V  K  M  S  G  D  L  L  E  L  A

                  410       420       430       440       450
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : ccttgaagttgccccatgtcgactacatcgaggaggactcctctgtcttt
Frame1  :   L  K  L  P  H  V  D  Y  I  E  E  D  S  S  V  F

          50        460       470       480       490       500
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : gcccagagcatcccgtggaacctggagcggattacccctccgcggtaccg
Frame1  : A  Q  S  I  P  W  N  L  E  R  I  T  P  P  R  Y  R

                  510       520       530       540       550
          ---------|--------- --------- ---------|---------|
Query   : ggcggatgaataccagccccccgacggaggcagcctggtggaggtgtatc
Frame1  :  A  D  E  Y  Q  P  P  D  G  G  S  L  V  E  V  Y  L
```

Фиг. 1B-1


50 560 570 580 590 600
Query : tcctagacaccagcatacagagtgaccaccgggaaatcgagggcagggtc
Frame1 : L D T S I Q S D H R E I E G R V
610 620 630 640 650
Query : atggtcaccgacttcgagaatgtgcccgaggaggacgggaccccgcttcca
Frame1 : M V T D F E N V P E E D G T R P H
50 660 670 680 690 700
Query : cagacaggccagcaagtgtgacagtcatggcacccacctggcaggggtgg
Frame1 : R Q A S K C D S H G T H L A G V V
710 720 730 740 750
Query : tcagcggccgggatgccggcgtggccaagggtgccagcatgcgcagcctg
Frame1 : S G R D A G V A K G A S M R S L
50 760 770 780 790 800
Query : cgcgtgctcaactgccaagggaagggcacggttagcggcaccctcatagg
Frame1 : R V L N C Q G K G T V S C T L I G
810 820 830 840 850
Query : cctggagtttattcggaaaagccagctggtccagcctgtggggccactgg
Frame1 : L E F I R K S Q L V Q P V G P L V
50 860 870 880 890 900
Query : tggtgctgctgccccctggcgggtgggtacagccgcgtcctcaacgccgcc
Frame1 : V L L P L A G G Y S R V L N A A
910 920 930 940 950
Query : tgccagcgcctggcgagggctggggtcgtgctggtcaccgctgccggcaa
Frame1 : C Q R L A R A G V V L V T A A G N
50 960 970 980 990 1000
Query : cttccgggacgatgcctgcctctactccccagcctcagctccccgaggtca
Frame1 : P R D D A C L Y S P A S A P E V I
1010 1020 1030 1040 1050
Query : tcacagttggggccaccaatgcccaggaccagccggtgaccctgggcact
Frame1 : T V G A T N A Q D Q P V T L G T
50 1060 1070 1080 1090 1100
Query : ttggggaccaactttggccgctgtgtggacctctttgccccagggggagga
Frame1 : L G T N F G R C V D L F A P G E D

Фиг. 1B-2


100 1110 1120 1130 1140 1150
Query : catcattggtgcctccagcgactgcagcacctgctttgtgtcacagagtg
Frame1 : I I G A S S D C S T C F V S Q S G
150 1160 1170 1180 1190 1200
Query : ggacatcacaggctgctgcccacgtggctggcattgcagccatgatgctg
Frame1 : T S Q A A A H V A G I A A M M L
200 1210 1220 1230 1240 1250
Query : tctgccgagccggagctcaccctggccgagttgaggcagagactgatcca
Frame1 : S A E P E L T L A E L R Q R L I H
250 1260 1270 1280 1290 1300
Query : cttctctgccaaagatgtcatcaatgaggcctggttccctgaggaccagc
Frame1 : F S A K D V I N E A W F P E D Q R
300 1310 1320 1330 1340 1350
Query : gggtactgaccccaacctggtggccgccctgccccccagcacccatggg
Frame1 : V L T P N L V A A L P P S T H G
350 1360 1370 1380 1390 1400
Query : gcaggttggcagctgttttgcaggactgtgtggtcagcacactcgggccc
Frame1 : A G W Q L F C R T V W S A H S G P
400 1410 1420 1430 1440 1450
Query : tacacggatggccacagccatcgcccgctgcgcccccagatgaggagctgc
Frame1 : T R M A T A I A R G A P D E E L L
450 1460 1470 1480 1490 1500
Query : tgagctgctccagtttctccaggagtgggaagcggcgggggcgagcgccatg
Frame1 : S C S S F S R S S K R R G E R M
500 1510 1520 1530 1540 1550
Query : gaggcccaaggggcaagctggtctgccgggcccacaacgcttttgggggg
Frame1 : E A Q G G K L V C R A H N A F G G
550 1560 1570 1580 1590 1600
Query : tgagcgtgtctacgccattgccaggtgctgcctgctacccaggccaact
Frame1 : E G V Y A I A R G C L L P Q A N C
600 1610 1620 1630 1640 1650
Query : gcagcgtccacacagctccaccagctgaggccagcatgggacccgtgtc
Frame1 : S V H T A P P A E A S M G T R V

Фиг. 1B-3

```
          1650      1660      1670      1680      1690      1700
          ---------|--------- ---------|---------|---------
Query   : cactgccaccaacagggccacgtcctcacaggctgcagctcccactggga
Frame1  : H  C  H  Q  Q  G  H  V  L  T  G  C  S  S  H  W  E

          1700      1710      1720      1730      1740      1750
          ---------|--------- ---------|---------|---------
Query   : ggtggaggaccttggcacccacaagccgcctgtgctgaggccacgaggtc
Frame1  :  V  E  D  L  G  T  H  K  P  P  V  L  R  P  R  G  Q

          1750      1760      1770      1780      1790      1800
          ---------|--------- ---------|---------|---------
Query   : agcccaaccagtgcgtgggccacagggaggccagcatccacgcttcctgc
Frame1  :   P  N  Q  C  V  G  H  R  E  A  S  I  H  A  S  C

          1800      1810      1820      1830      1840      1850
          ---------|--------- ---------|---------|---------
Query   : tgccatgccccaggtctggaatgcaaagtcaaggagcatggaatcccggc
Frame1  : C  H  A  P  G  L  E  C  K  V  K  E  H  G  I  P  A

          1850      1860      1870      1880      1890      1900
          ---------|--------- ---------|---------|---------
Query   : ccctcaggggcaggtgaccgtggcctgcgaggagggctggaccctgactg
Frame1  :  P  Q  G  Q  V  T  V  A  C  E  E  G  W  T  L  T  G

          1900      1910      1920      1930      1940      1950
          ---------|--------- ---------|---------|---------
Query   : gctgcagcgccctccctgggacctcccacgtcctgggggcctacgccgta
Frame1  :   C  S  A  L  P  G  T  S  H  V  L  G  A  Y  A  V

          1950      1960      1970      1980      1990      2000
          ---------|--------- ---------|---------|---------
Query   : gacaacacgtgtgtagtcaggagccgggacgtcagcactacaggcagcac
Frame1  : D  N  T  C  V  V  R  S  R  D  V  S  T  T  G  S  T

                    2010      2020      2030      2040      2050
          ---------|--------- ---------|---------|---------
Query   : cagcgaagaggccgtgacagccgttgccatctgctgccggagccggcacc
Frame1  :  S  E  E  A  V  T  A  V  A  I  C  C  R  S  R  H  L

           50      2060      2070      2080      2090      2100
          ---------|--------- ---------|---------|---------
Query   : tggcgcaggcctcccaggagctccag
Frame1  :   A  Q  A  S  Q  E  L  Q
```

Фиг. 1B-4

Seq ID No.	Строка	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
4		Зародышевая линия			DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC	RSSQSLLESNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY
5	30A4	A3		JK3	----------S------P-----	----------F-N	----------
6		Зародышевая линия			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
7	3C4	O2		JK4	----------	----R--N--S	--L-----I-------
8		Зародышевая линия			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
9	23B5	O2		JK5	--L----------	----------	----------V---
10	25G4	O2		JK5	----------	-------I---	----------Y-----
11		Зародышевая линия			QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC	TGSSSNIGAGYDVH	WYQQLPGTAPKLLIY
12	31H4	V1-13		JL2	----------	----------	----------S
13	27B2	V1-13		JL2	----------	---------E-----	----V----------
14		Зародышевая линия			QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGGYNYVS	WYQQHPGKAPKLMIY
15	25A7	V1-4		JL2	----------	--------R--S--	---E-------V---
16	27H5	V1-4		JL2	----------	----------S--	--------P-------
17	26H5	V1-4		JL2	----------	----------S--	--------P-------
18	31D1	V1-4		JL2	----------	----------S--	--------P-------
19	20D10	V1-4		JL2	----------	----------S--	----Y---P---K--
20	27E7	V1-4		JL2	----------	----------S--	---------P-------
21	30B9	V1-4		JL2	----------	----------S--	---------P-------
22	19H9	V1-4		JL2	----------	---N-------S--	--------P-------
23	26E10	V1-4		JL2	----------	----------S--	----------
23	21B12	V1-4		JL2	----------	----------S--	----------
24	17C2	V1-4		JL2	----------	--------A--S--	----------R---

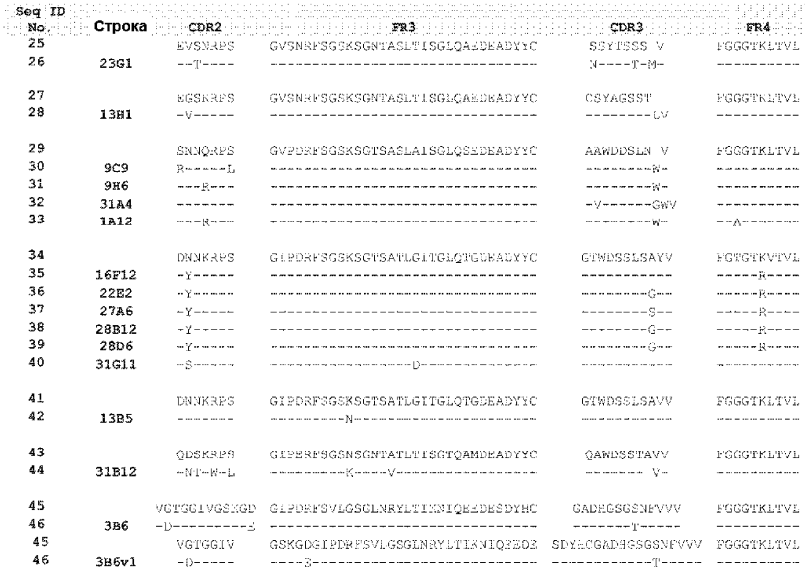
Фиг. 2A

Seq ID No.	Строка	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
25		Зародышевая линия			QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGGYNYVS	WYQQHPGKAPKLMIY
26	23G1	V1-4		JL3	----------	----------S--	----------
27		Зародышевая линия			QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMIY
28	13H1	V1-7		JL3	L----------	--------N-----	----YS---------
29		Зародышевая линия			QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	SGSSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIY
30	9C9	V1-16		JL3	----------	---------K---	----V----------
31	9H6	V1-16		JL3	----------P---------	----------	----------
32	31A4	V1-16		JL3	----------	----------	----------
33	1A12	V1-16		JL3	----------	---------K---	----F----------
34		Зародышевая линия			QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
35	16F12	V1-19		JL1	----------	----------I--	----------
36	22E2	V1-19		JL1	----------	----------L--	----------
37	27A6	V1-19		JL1	----------	----------L--	----F----------
38	28B12	V1-19		JL1	----------	----------F--	----------
39	28D6	V1-19		JL1	--------T---------	----------V--	----------
40	31G11	V1-19		JL1	----------	----------T--	----------
41		Зародышевая линия			QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
42	13B5	V1-19		JL2	----------	---N----------	----------
43		Зародышевая линия			SYELTQPPSVSVSPGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLVIY
44	31B12	V2-1		JL2	----------A----	----------	----------
45		Зародышевая линия			QPVLTQPPSASASLGASVTLTC	TLSSGYSNYKVD	WYQQRPGKGPRFVMR
46	3B6	V5-2		JL2	--------LF---------	--------S-E---	----------

Фиг. 2B

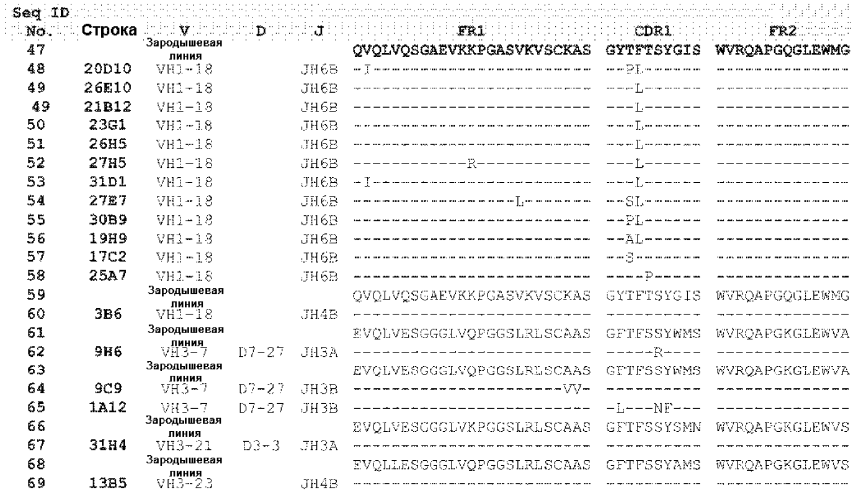
Seq ID No.	Строка	CDR2	FR3	CDR3	FR4
4		LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQALQTPFT	FGPGTKVDIK
5	30A4	---E---	----------E----------	--V------	----------
6		AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYSTPLT	FGGGTKVEIK
7	3C4	-------	----------S---------	--------I	----------
8		AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYSTPIT	FGQGTRLEIK
9	23B5	-------	----------N----------	-----S---	----------
10	25G4	--A----	----------	-----A---	----------
11		GNSNRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSLSGSV	FGGGTKLTVL
12	31H4	-------	----------	----------	----------
13	27B2	--TY---	----------	----M----V-	----------
14		EVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSSVV	FGGGTKLTVL
15	25A7	-------	---T----------	---------	----------
286	25A7v1	-------	---T----------	---------	---------
16	27H5	-------	---I----------F-	-----T-M-	----------
287	27H5v1	-------	---I----------F-	-----T-M-	---------
17	26H5	-------	---I----------F-	-----T-M-	----------
18	31D1	-------	----------F-	-----T-M-	--------A--
19	20D10	-------	----------F-	-----T-M-	----------
20	27E7	-------	----------F-	-----T-M-	----------
21	30B9	-------	----------F-	-----T-M-	----------
22	19H9	-------	-I----------F-	-----T-M-	----------
287	19H9v1	-------	-I----------F-	-----T-M-	---------
23	26E10	-------	----------	N----T-M-	----------
23	21B12	-------	----------	N----T-M-	----------
24	17C2	-------	----------	-----TNM-	----------

Фиг. 2C



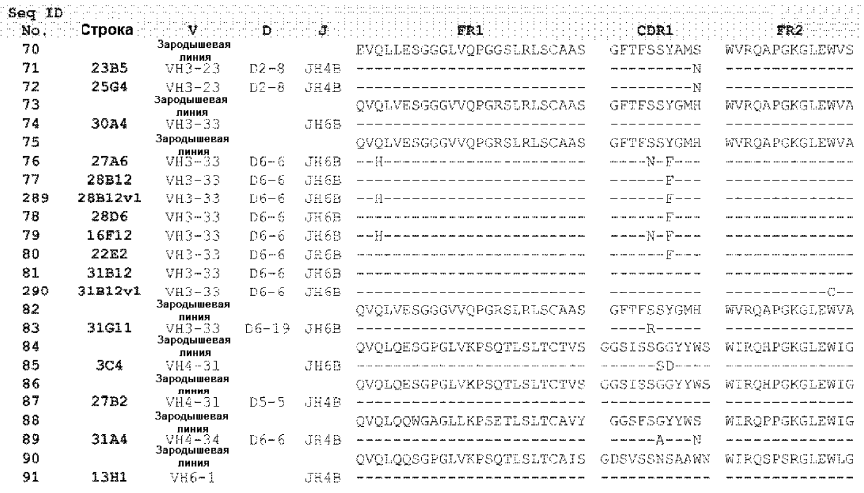
Seq ID No.	Строка	CDR2	FR3	CDR3	FR4
25		EVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSS V	FGGGTKLTVL
26	23G1	--T----	----------	N----T-M-	----------
27		EGSKRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSST	FGGGTKLTVL
28	13B1	-V-----	----------	-------LV	----------
29		SNNQRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC	AAWDDSLN V	FGGGTKLTVL
30	9C9	R-----L	----------	--------W-	----------
31	9H6	---R---	----------	--------W-	----------
32	31A4	-------	----------	-V------GWV	----------
33	1A12	---R---	----------	--------W-	--A-------
34		DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC	GTWDSSLSAVV	FGTGTKVTVL
35	16F12	-Y-----	----------	----------	-----R----
36	22E2	-Y-----	----------	--------G-	-----R----
37	27A6	-Y-----	----------	--------S-	-----R----
38	28B12	-Y-----	----------	--------G-	-----R----
39	28D6	-Y-----	----------	--------G-	-----R----
40	31G11	-S-----	----------D----------	----------	----------
41		DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC	GTWDSSLSAVV	FGGGTKLTVL
42	13B5	-------	----------N----------	----------	----------
43		QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTAVV	FGGGTKLTVL
44	31B12	-NT-W-L	---------K----V----------	------- V-	----------
45		VGTGGIVGSKGD	GIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHC	GADHGSGSNFVVV	FGGGTKLTVL
46	3B6	-D---------S	----------	-------T-----	----------
45		VGTGGIV	GSKGDGIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDE	SDYHCGADHGSGSNFVVV	FGGGTKLTVL
46	3B6v1	-D-----	----S----------	----------T-----	----------

Фиг. 2D



Seq ID No.	Строка	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
47		Зародышевая линия			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYGIS	WVRQAPGQGLEWMG
48	20D10	VH1-18		JH6B	-I----------	--PL------	----------
49	26E10	VH1-18		JH6B	----------	---L------	----------
49	21B12	VH1-18		JH6B	----------	---L------	----------
50	23G1	VH1-18		JH6B	----------	---L------	----------
51	26H5	VH1-18		JH6B	----------	---L------	----------
52	27H5	VH1-18		JH6B	----------R-----------	---L------	----------
53	31D1	VH1-18		JH6B	-I----------	---L------	----------
54	27E7	VH1-18		JH6B	----------L----------	--SL------	----------
55	30B9	VH1-18		JH6B	----------	--PL------	----------
56	19H9	VH1-18		JH6B	----------	--AL------	----------
57	17C2	VH1-18		JH6B	----------	--S-------	----------
58	25A7	VH1-18		JH6B	----------	----P-----	----------
59		Зародышевая линия			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYGIS	WVRQAPGQGLEWMG
60	3B6	VH1-18		JH4B	----------	----------	----------
61		Зародышевая линия			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYWMS	WVRQAPGKGLEWVA
62	9H6	VH3-7	D7-27	JH3A	----------	-----R----	----------
63		Зародышевая линия			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYWMS	WVRQAPGKGLEWVA
64	9C9	VH3-7	D7-27	JH3B	----------VV-	----------	----------
65	1A12	VH3-7	D7-27	JH3B	----------	-L---NF---	----------
66		Зародышевая линия			EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVS
67	31H4	VH3-21	D3-3	JH3A	----------	----------	----------
68		Зародышевая линия			EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
69	13B5	VH3-23		JH4B	----------	----------	----------

Фиг. 3A



Seq ID No.	Строка	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
70		Зародышевая линия			EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
71	23B5	VH3-23	D2-8	JH4B	----------	---------N	----------
72	25G4	VH3-23	D2-8	JH4B	----------	---------N	----------
73		Зародышевая линия			QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
74	30A4	VH3-33		JH6B	----------	----------	----------
75		Зародышевая линия			QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
76	27A6	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-------	-----N-F---	----------
77	28B12	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	------F---	----------
289	28B12v1	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-------	------F---	----------
78	28D6	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	------F---	----------
79	16F12	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-------	----N-F---	----------
80	22E2	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	------F---	----------
81	31B12	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	----------	----------
290	31B12v1	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	----------	----------C--
82		Зародышевая линия			QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
83	31G11	VH3-33	D6-19	JH6B	----------	----R-----	----------
84		Зародышевая линия			QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	GGSISSGGYYWS	WIRQHPGKGLEWIG
85	3C4	VH4-31		JH6B	----------	------SD----	----------
86		Зародышевая линия			QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	GGSISSGGYYWS	WIRQHPGKGLEWIG
87	27B2	VH4-31	D5-5	JH4B	----------	----------	----------
88		Зародышевая линия			QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY	GGSFSGYYWS	WIRQPPGKGLEWIG
89	31A4	VH4-34	D6-6	JR4B	----------	-----A---N	----------
90		Зародышевая линия			QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS	GDSVSSNSAAWN	WIRQSPSRGLEWLG
91	13H1	VH6-1		JH4B	----------	----------	----------

Фиг. 3B

Seq ID No.	Строка	CDR2	FR3	CDR3	FR4
47		WISAYNGNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	YGMDV	WGQGTTVTVSS
48	20D10	----------V--	S----------V----------	G-----	----------
49	26E10	-V-F----------	-G-----P----------	G-----	----------
49	21B12	-V-F----------	-G-----P----------	G-----	----------
50	23G1	-V-F----------	-G-----P----------	G-----	----------
51	26H5	---F---------V--	----------V----------	G-----	----------
52	27H5	---V---------V--	----------V-------S----------	G-----	----------
53	31D1	---F---------V--	----------V----------F---	G-----	----------
54	27E7	----------V--	----------V---V----------	G-----	----------
55	30B9	----------V--	----------V----------	G-----	----------
56	19H9	----------V--	----------V----------	G-----	----------
57	17C2	-V----------F--	----------	G-V---	----------
58	25A7	----------E----	----------V----------F----	G-V---	----------
59		W1SAYNGNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	GY DY	WGQGTLVTVSS
60	3B6	---T---------V--	----------	--TR--	----------
61		NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	NWG AFDV	WGQGTMVTVSS
62	9H6	---H----------	----------	ES---F----	--H-------
63		NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTTSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	NWG APDI	WGQGTMVTVSS
64	9C9	----------	----------	ES---F----	----------
65	1A12	----------	----------S-T-	ES---F----	----------
66		SISSSSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	DYDFWSGYYTAFDV	WGQGTMVTVSS
67	31H4	---------S-------	----------F---	------A--D----	----------
68		AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	FDY	WGQGTLVTVSS
69	13B5	T-------R----------	----------	EVGSP---	----------

Фиг. 3C

Seq ID No.	Строка	CDR2	FR3	CDR3	FR4
70		AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	VLMVYA DY	WGQGTLVTVSS
71	23B5	T-----DN----------	----------	KF-------ML--	----------
72	25G4	T-------N----------	----------	KF-------ML--	----------
73		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	YYYGMDV	WGQGTTVTVSS
74	30A4	--------D----------	----------	ETGPLKL--------	----------
75		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	IAA GMDV	WGQGTTVTVSS
76	27A6	L--S---D----------	----------	AIAALYYYY----	----------
77	28B12	L--N----------	----------	AIAALYYYY----	--H-------
78	28D6	L--N----------	----------	AIAALYYYY----	----------
79	16F12	L--S---DS---------	----------	AIAALYYYY----	----------
80	22E2	L--N----------	----------	AIAALYYYY----	----------
291	22E2v1	L--N----------	----------	AIAALYYYY----	----------
81	31B12	I----------	----------	RGGLAARPG----	----------
292	31B12v1	I----------	----------	RGGL---PG----	----------
82		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GIAVAYYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
83	31G11	L--E----T--V-----	----------	----------	----------
84		YIYYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	YYYGMDV	WGQGTTVTVSS
85	3C4	----------	-I---------L----------	GGVTT---A---	----------
86		YIYYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	EDTAMV YFDY	WGQGTLVTVSS
87	27B2	---N----------	----------	------P----	----------
88		EINHSGSTNYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	GQLV FDY	WGQGTLVTVSS
89	31A4	------R-D-------	----------K------N----------	----P---	----------
90		RTYYRSKWYNDYAVSVKS	RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR	FDY	WGQGTLVTVSS
91	13H1	---------KN-S-----	----------G---------	GGPTAA---	----------

Фиг. 3D

31H4

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTAGT
TACATTTCCTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTTCTGTGCGAGAGATTACGATTTTTGGAGTGCTTACTATGATGCTTTTGATGTCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 152)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYISY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDYDFWSAYYDAFDVWGQGT
MVTVSS **(SEQ ID NO: 67)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGT
ACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTCTGGTAACAGCAATCGGC
CCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACA
GCAGCCTGAGTGGTTCGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 153)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLISGNSNRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 12)**

Фиг. 3E

20D10

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGATTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACCCCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGCGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 92)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WISAYNGNTNYAQKVQGSVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 48)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCAA
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 93)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQYPGKPPKLKIYE
VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGG
TKLTVL **(SEQ ID NO: 19)**

Фиг. 3F

26E10

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAGCTATGGTATCAG
CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGGTCAGT
TTTTATAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGGCACCA
TGACCACAGACCCATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAG
ATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTC
TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 94)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWVS
FYNGNTNYAQKLQGRGTMTTDPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDV
WGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 49)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA
TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC
TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGG
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATT
ATTACTGCAATTCATATACAAGCACCAGCATGGTATTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 95)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 23)

Альтернативная нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи **(26E10v1);**
5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA
TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC
TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGG
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATT
ATTACTGCAACTCATATACAAGCACCAGCATGGTATTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 293)**

Фиг. 3G

26H5

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCTTTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 96)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WISFYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 51)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTATTCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 97)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIY
EVSNRPSGVSIRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGG
TKLTVL **(SEQ ID NO: 17)**

Фиг. 3H

31D1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGATTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCTTTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTTCTGT
GCGAGAGGTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 98)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WISFYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYFCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 53)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCGTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGCCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 99)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIY
EVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGG
GTKLAVL **(SEQ ID NO: 18)**

Фиг. 3I

23G1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGGTCAGTTTTTATAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGCTC
CAGGGCAGAGGCACCATGACCACAGACCCATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 100)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WVSFYNGNTNYAQKLQGRGTMTTDPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 50)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCAT
GATTTATGAGGTCACTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAACTCATATACAAGCACCAGCA
TGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 101)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIY
EVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMVFGG
GTKLTVL **(SEQ ID NO: 26)**

Фиг. 3J

27B2

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACA
GACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGT
GGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATATATAACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCC
CTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCT
CCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTG
TGCGAGAGAGGATACAGCTATGGTTCCTTACTTTGACTACTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 102)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIG
YIYNSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDT
AMVPYFDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO: 87)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGTACTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCA
GAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCACA
TTATGATGTGCACTGGTACCAGCAGGTTCCAGGAACAGCCCCCAAACT
CCTCATCTATGGTAACACCTATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTC
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCC
AGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAACAGCC
TGAGTGGTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3'
(SEQ ID NO: 103)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAHYDVHWYQQVPGTAPKLLIY
GNTYRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDNSLSGVVF
GGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 13)**

Фиг. 3K

16F12

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAACAGCTTT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATCTGGTCTGATGGAAGTGATGAATACTATGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG
CGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 104)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKGLEWVA
LIWSDGSDEYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARA
IAALYYYYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 79)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTC
ATTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGCTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 105)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDY
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGT
GTRVTVL **(SEQ ID NO: 35)**

Фиг. 3L

22E2

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGCAGCTTT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATATGGAATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT
GCGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG
GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 106)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVA
LIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
AIAALYYYYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 80)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTC
ATTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGTCTGA
GTGGTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 107)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDY
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSGYVFGT
GTRVTVL **(SEQ ID NO: 36)**

Фиг. 3M

27A6

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAACAGCTTT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATATGGTCTGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG
CGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 108)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKGLEWVA
LIWSDGSDKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARA
IAALYYYYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 76)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGTTCCAACATTGGGAATAAT
TTTGTATCCTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCA
TTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCTGACCGATTCTCTGG
CTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGACT
GGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGAGT
TCTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 109)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQFPGTAPKLLIYDY
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSSYVFGT
GTRVTVL **(SEQ ID NO: 37)**

Фиг. 3N

28B12

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGCAGCTTT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATATGGAATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT
GCGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG
GGCCACGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 110)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVA
LIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
AIAALYYYYGMDVWGHGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 77)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTC
ATTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGGTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 111)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDY
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSGYVFGT
GTRVTVL **(SEQ ID NO: 38)**

Фиг. 3O

28D6

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA
GTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGCAGCTTTGGCATGC
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTA
ATGGAATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGC
ATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 112)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWV
LIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
AIAALYYYYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 78)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCACAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTC
ATTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCTGACCGATTCTCTC
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTACTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGGTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 113)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPTVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYD
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSGYVFG
GTRVTVL **(SEQ ID NO: 39)**

Фиг. 3P

31G11

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGGAGCTAT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATATGGCATGATGGAAGTAATACATACTATGTAGACTCCGTGA
AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG
CGAGAGGTATAGCAGTGGCTTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 114)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWV
ALIWHDGSNTYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGIAVAYYYYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 83)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTC
ATTTATGACAGTAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGACATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGCTTATGTTTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 115)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDS
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLDITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGT
GTKVTVL **(SEQ ID NO: 40)**

Фиг. 3Q

23B5

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTAT
GCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
TCAACTATTAGTGGTAGTGGTGATAACACATACTACGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTG
CGAAAAAGTTTGTACTAATGGTGTATGCTATGCTTGACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 116)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVS
TISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKK
FVLMVYAMLDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO: 71)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGA
GACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGTTAT
TTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATC
TATGCTGCCTCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTGCAACCTGA
AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTCCCCCATCACC
TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA3' **(SEQ ID NO: 117)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
DILMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQSYSSPITFGQGTRLE
IK **(SEQ ID NO: 9)**

Фиг. 3R

25G4

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTAT
GCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
TCAACTATTAGTGGTAGTGGTGGTAACACATACTACGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTG
CGAAAAAGTTTGTACTAATGGTGTATGCTATGCTTGACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 118)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVS
TISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKK
FVLMVYAMLDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO: 72)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTATCTGCATCTGTAGGA
GACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCATCTAT
TTAAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTTACCTCCTGATCT
ATGCTGCAGCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA
AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTGCCCCCATCACC
TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA3' **(SEQ ID NO: 119)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISIYLNWYQQKPGKAPYLLIYAAA
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSAPITFGQGTRLE
IK **(SEQ ID NO: 10)**

Фиг. 3S

27E7

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCACTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAGTTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGGTGAGGAGTCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 120)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QVQLVQSGAEVKKPGASLKVSCKASGYSLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WISAYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMEVRSLRSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 54)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAATACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 121)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIY
EVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGG
GTKLTVL **(SEQ ID NO: 20)**

Фиг. 3T

27H5

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAGGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCGTTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGCTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 122)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WISVYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLSSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 52)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTATTCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 123)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIY
EVSNRPSGVSIRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGG
TKLTVL **(SEQ ID NO: 16)**

Фиг. 3U

30B9

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACCCCTTGACCAGCTATGGTATCAG
CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGC
GCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCA
TGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAG
ATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTC
TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 124)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISA
YNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDV
WGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 55)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA
TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC
TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGG
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AATACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATT
ATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 125)**

Альтернативная нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA
TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC
TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGG
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATT
ATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 294)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIYEVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 21)

Фиг. 3V

19H9

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTTCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACGCCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 126)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYALTSYGISWVRQAPGQGLEWM
GWISAYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCA
RGYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 56)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAACAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGATTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 127)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTNSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIY
EVSNRPSGISNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGG
TKLTVL **(SEQ ID NO: 22)**

Фиг. 3W

17C2

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAGCTTTACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGGTCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGTTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAACTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 128)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WVSAYNGNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCA
RGYVMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 57)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTTTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGCTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACGCA
TGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTC
TGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAG
GCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAGCACCAAC
ATGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 129)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGAYNSVSWYQQHPGKAPKRMIY
EVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSTNMVFGG
GTKLTVL **(SEQ ID NO: 24)**

Фиг. 3X

13H1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTACAGTTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCA
GACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAAC
AGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAG
TGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAAAAATTATTCA
GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
CAGTTCTCTCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGGGGACACGGCTGTGT
ATTACTGTGCAAGAGGGGGGCCAACTGCTGCTTTTGACTACTGGGGCC
AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 130)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLG
RTYYRSKWYKNYSVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPGDTAVYYCAR
GGPTAAFDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO: 91)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CTTTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGGAATTATA
ACCTTGTCTCCTGGTACCAACAGTATTCAGGCAAAGCCCCCAAACTCAT
GATTTATGAGGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACAATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCTGCTCATATGCAGGTAGTAGCAC
TTTGGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 131)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

LSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGNYNLVSWYQQYSGKAPKLMIY
EVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSSTLVFG
GGTKLTVL **(SEQ ID NO: 28)**

Фиг. 3Y

9C9

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGTCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATT
GGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGG
CCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGA
AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTG
CGAGAGAGTCAAACTGGGGATTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGA
CAATGGTCACCGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 132)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVA
NIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE
SNWGFAFDIWGQGTMVTVSS **(SEQ ID NO: 64)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCA
GAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAA
GACTGTAAACTGGTACCAACAGGTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCT
CATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTTAGGGGTCCCTGACCGATTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGT
CTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGA
ATTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 133)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWYQQVPGTAPKLLIYRN
NQRPLGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWVFGG
GTKLTVL **(SEQ ID NO: 30)**

Фиг. 3Z

9H6

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCGCTATT
GGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGG
CCAACATAAAGCATGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGA
AGGGCCGATTCACCATTTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG
CGAGAGAGTCAAACTGGGGATTTGCTTTTGATGTCTGGGGCCACGGGA
CAATGGTCACCGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 134)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVA
NIKHDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE
SNWGFAFDVWGHGTMVTVSS **(SEQ ID NO: 62)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGCCCCCCGGACA
GAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAAT
ACTGTAAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTC
ATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTC
TGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAA
TTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 135)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSVLTQPPSASGPPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSN
NRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWVFGG
GTKLTVL **(SEQ ID NO: 31)**

Фиг. 3AA

13B5

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTAT
GCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
TCAACTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGGACATATTACGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTG
CGAAAGAAGTTGGCAGTCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG
TCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 136)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVST
ISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEV
GSPFDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO: 69)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAACTCCAACATTGGGAATAA
TTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTC
ATTTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAACTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 137)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYD
NNKRPSGIPDRFSGSNSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFG
GGTKLTVL **(SEQ ID NO: 42)**

Фиг. 3BB

31B12

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATG
GTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGAGGGGGGGTCTGGCAGC
TCGTCCGGGCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA3' **(SEQ ID NO: 138)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGLAARP
GGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 81)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCTGTGTCCCCAGGACAGACA
GCCAGAATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAAATACCAA
GTGGCCCTTAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACA
GTCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACT
GTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC
CGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 139)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQNTKWP
LGIPERFSGSKSGNTVTLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 44)

Альтернативная нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACA
GCCAGAATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGCTGGT
ATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAAATACCAA
GTGGCCCTTAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACA
GTCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACT
GTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC
CGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 295)**

Фиг. 3CC

3C4

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACA
GACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGT
GATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCC
TCAAGAGTCGAATTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCTGTTCTC
CCTGAAGTTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGGGGGGTGACTACGTACTACTACGCTATGGACGTCTGGGGC
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 140)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSSDYYWSWIRQHPGKGLEWIG
YIYYSGSTYYNPSLKSRITISVDTSKNLFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVT
TYYYAMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 85)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'GACATACAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA
GACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGCGCATTAGCAACTAT
TTAAGTTGGTATCTGCAGAAACCAGGGATTGCCCCTAAGCTCCTGATCT
ATGCTGCATCCAGTTTGCAGAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAATCTGA
AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCATT
TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA3' **(SEQ ID NO: 141)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRISNYLSWYLQKPGIAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQSYSTPLIFGGGTKVE
IK **(SEQ ID NO: 7)**

Фиг. 3DD

30A4

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTAT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATGGTATGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT
GCGAGAGAGACTGGTCCCTTGAAACTCTACTACTACGGTATGGACGTCT
GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 142)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
VIWYDGSDKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ETGPLKLYYYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 74)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTCACCCCTGGA
GAGCCGCCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTA
ATGGATACAACTTTTTGAATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCC
ACAACTCCTGATCTATTTGGGTTCTCATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGAC
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGGAAATCAGC
AGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGTTCTAC
AAACTCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA3'
(SEQ ID NO: 143)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
DIVMTQSPLSLSVTPGEPPSISCRSSQSLLHSNGYNFLNWYLQKPGQSPQLLI
YLGSHRASGVPDRFSGSGSGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQVLQTPFTFG
PGTKVDIK **(SEQ ID NO: 5)**

Фиг. 3EE

1A12

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGG
GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCTTTAGTAA
CTTTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
TGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGG
ACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA
TTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT
GTGTATTCCTGTACGAGAGAGTCAAACTGGGGATTTGCTTTTGATAT
CTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 144)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSNFWMSWVRQAPGKGLEW
VANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYS
CTRESNWGFAFDIWGQGTMVTVSS **(SEQ ID NO: 65)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGC
AGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGT
AAAACTGTAAACTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACGGCCCCCAAAC
TCCTCATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGA
TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGG
GCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATG
ACAGCCTGAATTGGGTGTTCGGCGCAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
3' **(SEQ ID NO: 145)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWYQQFPGTAPKLLIYS
NNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWV
FGAGTKLTVL **(SEQ ID NO: 33)**

Фиг. 3FF

3B6

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :
5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAG
CTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGT
GGATGGGATGGATCAGCACTTACAATGGTAACACAAACTATGCACA
GAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGC
ACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCG
TTTATTACTGTGCGAGAGGGTATACTCGGGACTACTGGGGCCAGGGA
ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 146)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEW
MGWISTYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY
YCARGYTRDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO: 60)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :
5'CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACTTTTTGCATCAGCCTCCCTGGGAG
CCTCGGTCACACTCACCTGCACCCTGAGCAGCGGCTACAGTAGTTAT
GAAGTGGACTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAGGGCCCCCGGTTTG
TCATGCGAGTGGACACTGGTGGGATTGTGGGATCCAAGGGGGAAGG
CATCCCTGATCGCTTCTCAGTTTTGGGCTCAGGCCTGAATCGGTATCT
GACCATCAAGAACATCCAGGAAGAGGATGAGAGTGACTACCACTGT
GGGGCAGACCATGGCAGTGGGACCAACTTCGTGGTGGTATTCGGCG
GAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 147)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :
QPVLTQPLFASASLGASVTLTCTLSSGYSSYEVDWYQQRPGKGPRFVM
RVDTGGIVGSKGEGIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHCGADH
GSGTNFVVVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 46)**

Фиг. 3GG

31A4

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCG
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGC
GTACTACTGGAACTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAG
TGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGAACCGACTACAACCCGT
CCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAAGCA
GTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGGCAGCTCGTCCCCTTTGACTACTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 148)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWNWIRQPPGKGLEWI
GEINHSGRTDYNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLKLNSVTAADTAVYYCAR
GQLVPFDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO: 89)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGC
AGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGT
AATACTGTAAATTGGTATCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACT
CCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGAT
TCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGG
CTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGTATGGGATGA
CAGCCTGAATGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
CTA3' **(SEQ ID NO: 149)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY
SNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAVWDDSLNG
WVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 32)**

Фиг. 3HH

25A7

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTCCCAG
CTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGT
GGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCAGA
GAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGC
ACAGCCTACATGGAGGTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCG
TGTTTTACTGTGCGAGAGGCTACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 150)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFPSYGISWVRQAPGQGLEW
MGWISAYNGNTNYAEKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEVRSLRSDDTAVF
YCARGYVMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 58)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC
AGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTCGT
TATAATTCTGTCTCCTGGTACCAACACCACCCAGGCAAAGCCCCCAA
AGTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTACTC
GCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCT
GGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATAC
AAGCAGCAGCGTTGTATTCGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCTA
3' **(SEQ ID NO: 151)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGRYNSVSWYQHHPGKAPKVM
IYEVSNRPSGVSTRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSVVF
GGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 15)**

Фиг. 3II

21B12

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAG
CTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGT
GGATGGGATGGGTCAGTTTTTATAATGGTAACACAAACTATGCACAG
AAGCTCCAGGGCAGAGGCACCATGACCACAGACCCATCCACGAGCA
CAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 94)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEW
MGWVSFYNGNTNYAQKLQGRGTMTTDPSTSTAYMELRSLRSDDTAVY
YCARGYGMDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 49)**

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC
AGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGT
TATAACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAA
ACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATC
GCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCT
GGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAATTCATATAC
AAGCACCAGCATGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
3' **(SEQ ID NO: 296)**

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLM
IYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMV
FGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 23)**

Фиг. 3JJ

Константные домены

IgG2 человека :

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 154)

IgG4 человека :

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 155)

Лямбда человека :

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPTECS (SEQ ID NO: 156)

Каппа человека :

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)

Фиг. 3KK

5H5.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG
GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCA
CCGGCTACTATATACACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGG
CTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTCACAGTGGTGGCGCAAA
CTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACA
CGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCT
GACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCAACTGGAACTA
CGACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:418)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQVVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGL
EWMGWINPHSGGANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDD
TAVYYCARGNWNYDYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:419)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT
AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTA
GCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA
AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCAT
CTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTTCTGTCAAA
GGTATCAGATTGCCCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGG
ATATCAAA3' (SEQ ID NO:420)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKLL
IYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQRYQIAPF
TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:421)

Фиг. 3LL

24F7.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATCTGGTATGATGGAAGTACTAAATAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:422)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGSTKYYADSVKGRSTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCARSVAGYHYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 423)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCT
ATTATGCAACCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAAACTACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCC
CGGGACAGCATTGGTAACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:424)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRGYYATWYQQKPRQAPVLV
IYGKNYRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSIG
NHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:425)

Фиг. 3MM

22B11.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GTAGCTATGGCTTGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTAGATGGAAGTAATAAATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTAC
CACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:426)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGLHWVRQAPGKGLE
WVAVIWLDGSNKYYADSVKGRSTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYHYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:427)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTT
ATTATGGAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTA
CTTGTCATCTTTGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTC
ACGGGACATCATTGGTGACCATCTGCTGTTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:428)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYGSWYQQKPRQAPVLVI
FGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDIIGD
HLLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:429)

Фиг. 3NN

30F1.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GGAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGAAGTAATAAATAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCTAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA3'(SEQ ID NO:430)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWFDGSNKYYADSVKGRSTISRDNSKNTLYLLMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYHYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:431)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAGGGAGACAGCCTCAGAAGCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGAATCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAATC
CCGGGACATCATTGGTGACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCA
AACTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:432)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPRQAPVLVI
YGKNNRPSGIPDRISGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDIIGD
HLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:433)

Фиг. 3OO

24B9.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAGATCGGGGACTGGAC
TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID
NO:434)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCVRDRGLDWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:435)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAGTC
CCGGGACAGCAGTGGTGACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:436)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRGYYASWYQQKPRQAPVLV
IYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDSSG
DHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:437)

Фиг. 3PP

24B9.2

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAGTAAATAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA3'(SEQ ID NO:438)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQVVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGSSKYYADSVKGRSTISRDNSKNTVYLQMNSLRAED
TAVYYCARSVAGYHYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:439)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAGTC
CCGGGACAGCAGTGGTGACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:440)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRGYYASWYQQKPRQAPVLV
IYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDSSG
DHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:441)

Фиг. 3QQ

20A5.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGTCTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTTATAAAGA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACA
ACTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTAC
CACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:442)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVVQPGRSLSLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVIWYDGSYKDYADSVKGRSTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYIHYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:443)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTATT
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAATCACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAATC
CCGGGACATCATTGGTAACCATCTGCTGTTCGGCGGAGGGACTAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:444)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPRQAPILVI
YGKNNRPSGIPDRFSGSTSGITASLTITGAQAEDEADYYCKSRDIIGN
HLLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:445)

Фиг. 3RR

20A5.2

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGCGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCCTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTCATATGGTATGATGGAAGTAACAAATA
CTATGCAGCCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGTGGTTCGGGG
AGTCATCGCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:446)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVASGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSYGMHWVRQAPGQGL
EWVAVIWYDGSNKYYAASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCARGGGSGSHRYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
NO:447)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTATT
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAATCACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAATC
CCGGGACATCATTGGTAACCATCTGCTGTTCGGCGGAGGGACTAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:448)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPRQAPILVI
YGKNNRPSGIPDRFSGSTSGITASLTITGAQAEDEADYYCKSRDIIGN
HLLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:449)

Фиг. 3SS

20E5.1 – версия 1 (v1)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAGGTAATAAATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCATCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAGCACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTTTATTATTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACC
ATTATTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCGCCTCA3' (SEQ ID NO:450)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGGNKYYADSVKGRSIISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYHYYYGMDVWGQGTTVTVAS (SEQ ID NO:451)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGG
ACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGG
TGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACC
CCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGAT
TTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTG
ACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGC
AGCTCATATACAAGCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGGCCGTCCTA3' (SEQ ID NO:452)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPK
LMIYEVSNRPSGISNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTST
SMVFGGGTKLAVL (SEQ ID NO:453)

Фиг. 3TT

20E5.1 – версия 2 (v2)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAGGTAATAAATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCATCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAGCACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTTTATTATTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACC
ATTATTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCGCCTCA3' (SEQ ID NO:454)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGGNKYYADSVKGRSIISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYHYYYGMDVWGQGTTVTVAS (SEQ ID NO:455)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACGTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCC
CGGGACAACATTGGTGACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:456)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRGYYASWYQQKPRQAPVLV
IYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDNIG
DHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:457)

Фиг. 3UU

8A3.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTA
GTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAAACAAGATGGAAGTGAGAAATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CGCCAGGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTTGTATTAATGG
TGTATGATATAGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCC
AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:458)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLE
WVASIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARDLVLMVYDIDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
NO:459)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCC
TGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCT
GCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCC
AGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGC
CTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAG
ATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG
GTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTAGAGATCAAA3' (SEQ ID NO:460)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQS
PQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ
ALQTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:461)

Фиг. 3VV

11F1.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTA
GTAACTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAAACAAGATGGAAGTGAGAAATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCGCCATCTCCAGAGACAA
CGCCAAGAACTCACTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTTGTACTAATGG
TGTATGATATAGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCC
AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:462)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGL
EWVASIKQDGSEKYYVDSVKGRFAISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDT
AVYYCARDLVLMVYDIDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
NO:463)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCT
GGAGAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTG
CATAGTAATGGGTACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCA
GGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAT
CTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGT
TTATTACTGCATGCAAACTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGCGG
AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA3' (SEQ ID NO:464)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQS
PQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTHLTLKISRVEAEDVGVYYCMQ
TLQTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:465)

Фиг. 3WW

12H11.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGCCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATACTATGATGGAATTAATAAACAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGGACTGGACT
GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:466)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVQLVESGGGVAQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIYYDGINKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARDRGLDWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:467)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCT
GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTT
TATACAGCTCCAACAGTAAGAACTACTTAGTTTGGTACCAGCAGA
AACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCCTCTACCC
GGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTG
GCAGTTTATTACTGTCAACAATATTATAGTACTCCGTGGACGTTC
GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA3' (SEQ ID NO:468)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKNYLVWYQQKPG
QPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ
QYYSTPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:469)

Фиг. 3XX

11H4.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCTTTA
GTAACTTTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAATGATAAATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CGCCAAGAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTCAAACTGGGGA
TTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT
TCA3' (SEQ ID NO:470)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSNFWMSWVRQAPGKGL
EWVANIKQDGNDKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED
TAVYYCARESNWGFAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:471)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGG
GCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGG
AAGTAAAACTGTAAACTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACGGCCC
CCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCC
CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTG
CAGCATGGGATGACAGCCTGAATTGGGTGTTCGGCGCAGGGACC
AAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:472)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWYQQFPGTAPKLL
IYSNNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDS
LNWVFGAGTKLTVL (SEQ ID NO:473)

Фиг. 3YY

11H8.1

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCTTTA
GTAACTTTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CGCCAAGAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTCAAACTGGGGA
TTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT
TCA3' (SEQ ID NO:474)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSNFWMSWVRQAPGKGL
EWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARESNWGFAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:475)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGG
GCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGG
AAGTAAAACTGTAAACTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACGGCCC
CCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCC
CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTG
CAACATGGGATGACAGACTGAATTGGGTGTTCGGCGCAGGGACC
AAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:476)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWYQQFPGTAPKLL
IYSNNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDR
LNWVFGAGTKLTVL (SEQ ID NO:477)

Фиг. 3ZZ

11G1.5

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCAC
AGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTTCTCACTCAG
CAATGTTAGAATGGGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGA
AGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAAATT
CCTACAGAACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGAC
ACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCT
GTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGATAGTGGGAGCTAC
AACGGATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAC
CGTCTCTTCA3' (SEQ ID NO:478)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNVRMGVSWIRQPPGKAL
EWLAHIFSNDENSYRTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTAT
YYCARIVGATTDDAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:479)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGG
ACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTA
AAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTG
CTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATC
AGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTTTTACTGTCAGGT
GTGGGATAGTAGTAGTGATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:480)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV
VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADFYCQVWDSS
SDPVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:481)

Фиг. 3AAA

8A1.2

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи :

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTA
GTAACTATTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAGATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCCGAGACAC
CGCCAAGAACTCTCTGTATCTCCAAATGAACAGCCTGCGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACCTCTTGTACTAATGGT
GTATGCTCTACACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCA
CGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:482)

Последовательность аминокислот вариабельного участка тяжелой цепи :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGL
EWVASIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARPLVLMVYALHYYYYGMDVWGHGTTVTVSS (SEQ ID
NO:483)

Нуклеотидная последовательность вариабельного участка легкой цепи :

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCC
TGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCT
GCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCC
AGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGC
CTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAG
ATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG
GTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA3' (SEQ ID NO:484)

Последовательность аминокислот вариабельного участка легкой цепи :

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQS
PQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ
ALQTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:485)

Фиг. 3BBB

Тяжелый вариабельный	SEQ ID NO:	Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1	CDR1	FR2
	493	VH1|1-02		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTGYYMH	WVRQAPGQGLEWMG
5H5.1G	419	VH1|1-02	JH6	---V----------	--------I-	----------
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1	CDR1	FR2
	494	VH3|3-33		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
24B9.1G	435	VH3|3-33	JH4	----------	----------	----------
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1	CDR1	FR2
	495	VH3|3-33		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
24F7.1G	423	VH3|3-33	JH6	----------	----------	----------
22B11.1G	427	VH3|3-33	JH6	----------	--------L-	----------
20A5.1G	443	VH3|3-33	JH6	----------S------	----------	----------
20A5.2G	447	VH3|3-33	JH6	-----A----------	---L------	-------Q------
30F1.1G	431	VH3|3-33	JH6	----------S----------	----RN----	----------
20E5.1G	451	VH3|3-33	JH6	---V----------	-----N----	----------
24B9.2G	439	VH3|3-33	JH6	---V----------G---------	-----N----	----------

Фиг. 3CCC

Тяжелый вариабельный	SEQ ID NO:	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	493	WINPNSGGTNYAQKFQG	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR		
5H5.1G	419	----H---A--------	----------	GNWNYDYYGMDV	WGQGTTVTVSS
		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	494	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
24B9.1G	435	----------	----------V-	DRGLD	WGQGTLVTVSS
		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	495	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
24F7.1G	423	-------T---------	-S----------	SVAGYHYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
22B11.1G	427	---L----------	-S----------	SVAGYHYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
20A5.1G	443	-------Y-D-------	-S----------	SVAGYHYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
20A5.2G	447	----------A-----	----------	GGGSGSHRYYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
30F1.1G	431	---F----------	-S----------L----------	SVAGYHYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
20E5.1G	451	------G----------	-SI-------S----------	SVAGYHYYYGMDV	WGQGTTVTVAS
24B9.2G	439	-------S---------	-S---------V----------	SVAGYHYYYGMDV	WGQGTTVTVSS

Фиг. 3DDD

Каппа вариабельный	SEQ ID NO:	Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1	CDR1	FR2
	496	VK1|A20		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISNYLA	WYQQKPGKVPKLLIY
5H5.1K	421	VK1|A20	JK3	----------	----D------	----------
Лямбда вариабельный						
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1	CDR1	FR2
	497	VL2|2a2		QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGGYNYVS	WYQQHPGKAPKLMIY
20E5.1L v1	453	VL2|2a2	JL2	----------	----------S--	--------P-------

		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1	CDR1	FR2
	498	VL3|3I		SSELTQDPAVSVALGQTVRITC	QGDSLRSYYAS	WYQQKPGQAPVLVIY
30F1.1L	433	VL3|3I	JL2	----------	----------	------R---------
22B11.1L	429	VL3|3I	JL2	----------	---------G-	------R--------F
24B9.1L	437	VL3|3I	JL2	----------	-------G----	------R---------
24B9.2L	441	VL3|3I	JL2	----------	------G----	------R---------
20E5.1L v2	457	VL3|3I	JL2	----------	------G----	------R---------
24F7.1L	425	VL3|3I	JL2	----------	------G---T	------R---------
20A5.1L	445	VL3|3I	JL2	----------	------T----	------R---I-----
20A5.2L	449	VL3|3I	JL2	----------	------T----	------R---I-----

Фиг. 3EEE

Каппа вариабельный	SEQ ID NO:				
		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	496	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
5H5.1K	421	-------	----------F-	QRYQIAPFT	FGPGTKVDIK
Лямбда_вариабельный					
		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	497	EVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC		
20E5.1L v1	453	-------	-I----------F-	SSYTSTSMV	FGGGTKLAVL

		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	498	GKNNRPS	GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC		
30F1.1L	433	-------	-----I---T----------	KSRDIIGDHLV	FGGGTKLTVL
22B11.1L	429	-------	---------T----------	NSRDIIGDHLL	FGGGTKLTVL
24B9.1L	437	-------	---------T----------	KSRDSSGDHLV	FGGGTKLTVL
24B9.2L	441	-------	---------T----------	KSRDSSGDHLV	FGGGTKLTVL
20E5.1L v2	457	-------	---------T----------	NSRDNIGDHLV	FGGGTKLTVL
24F7.1L	425	---Y---	---------T----------	NSRDSIGNHLV	FGGGTKLTVL
20A5.1L	445	-------	----------T--I------	KSRDIIGNHLL	FGGGTKLTVL
20A5.2L	449	-------	---------T--I------	KSRDIIGNHLL	FGGGTKLTVL

Фиг. 3FFF

	SEQ ID NO:				SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1		CDR1		FR2	
	486	VH2|226		QVTLRESGFVLVKPTETLTLTCTVS	506	GFSLSNARMGVS	507	WIRQPPGKALEWLA	509
11G1.5	479	VH2|226	JH3	----------	506	-----V-----	508	----------	509
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1		CDR1		FR2	
	487	VH3|307		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	510	GFTFSSYWMS	511	WVRQAPGKGLEWVA	514
11H8.1	475	VH3|307	JH3		510	L NT	512		514
11H4.1	471	VH3|307	JH3	----------	510	-L---NT---	512	----------	514
8A3.1	459	VH3|307	JH6	----------	510	----------	511	----------	514
11F1.1	463	VH3|307	JH6	----------	510	-----N----	500	----------	514
8A1.2	483	VH3|307	JH6	----------	510	-----N---T	513	----------	514
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1		CDR1		FR2	
	488	VH3|3-33		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	515	GFTFSSYGMH	517	WVRQAPGKGLEWVA	518
12H11.1	467	VH3|3-33	JH4	----------A----------	516	----------	517	----------	518

Фиг. 3GGG

	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	486	HISSNDEKSYSTSLKS	519	RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCART	521		522		
11G1.5	479	--I----N--R-----	520	----------	521	VGATTDDAFDI		WSQGTMVTVSS	523
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	487	NIKQDGSEKYYVDSVKG	526	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	529				
11H8.1	475	----------	526	----------	529	RSNWGFAFDI	533	WSQGTMVTVSS	523
11H4.1	471	------NE----------	527	----------	529	RSNWGFAFDI	533	WSQGTMVTVSS	523
8A3.1	459	S----------	501	----------R----------	530	DLVLMVYDIDYYYYGMDV	502	WGQGTTVTVSS	524
11F1.1	463	S----------	501	--A----------F----------	531	DLVLMVYDIDYYYYGMDV	502	WGQGTTVTVSS	524
8A1.2	483	S--------R---------	528	---------T----------	532	PLVLMVYALHYYYYGMDV	534	WGHGTTVTVSS	525
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	488	VIWYDGSNRYYADSVKG	535	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	537				
12H11.1	467	--Y---T--R-------	536	----------	537	DRGLD	538	WSQGTLVTVSS	539

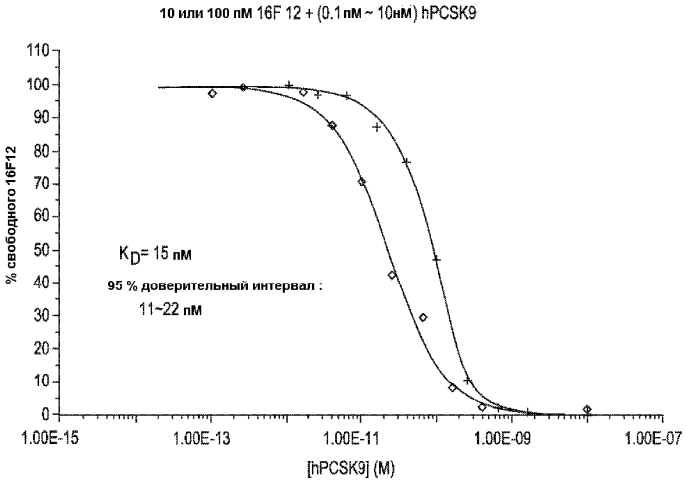
Фиг. 3HHH

	SEQ ID NO:				SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1		CDR1		FR2	
	489	VK2|A19		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC	540	RSSQSLLHSNGYNYLD	503	WYLQKPGQSPQLLIY	541
8A1.2	485	VK2|A19	JK4	----------	540	----------	503	----------	541
8A3.1	461	VK2|A19	JK4	----------	540	----------	503	----------	541
11F1.1	465	VK2|A19	JK4	----------	540	----------	503	----------	541
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1		CDR1		FR2	
	490	VK4|B3		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	542	KSSQSVLYSSNNKNYLA	543	WYQQKPGQPPKLLIY	545
12H11.1	469	VK4|B3	JK1	----------	542	----------S----V	544	----------	545
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1		CDR1		FR2	
	491	VL1|1c		QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	546	SGSSSNIGSNTVN	547	WYQQLPGTAPKLLIY	549
11H4.1	473	VL1|1c	JL3b	----------	546	---------K---	548	----F----------	550
11H8.1	477	VL1|1c	JL3b	----------	546	---------K---	548	----F----------	550
		Зародышевая линия	Зародышевая линия	FR1		CDR1		FR2	
	492	VL3|3h		SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC	551	GGNNIGSKSVH	553	WYQQKPGQAPVLVIY	554
11G1.5	481	VL3|3h	JL2	----------Q------	552	----------	553	----------V-	555

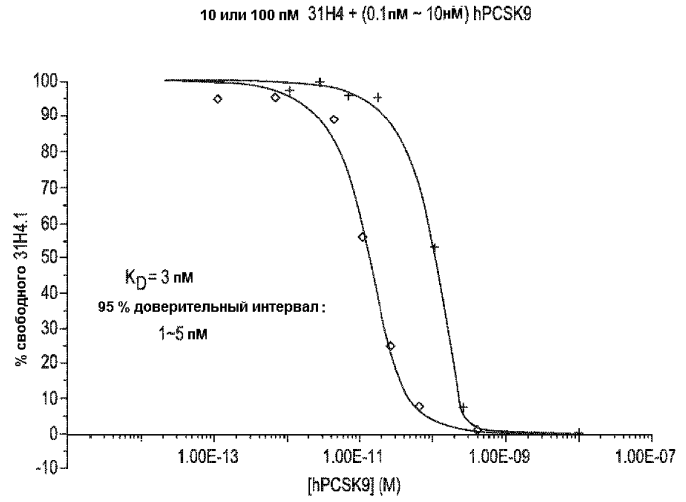
Фиг. 3III

	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	489	LGSNRAS	504	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	556				
8A1.2	485	-------	504	----------	556	MQALQTPLT	558	FGGGTKVEIK	559
8A3.1	461	-------	504	----------	556	MQALQTPLT	558	FGGGTKVEIK	559
11F1.1	465	-------	504	----------HL----------	567	MQTLQTPLT	505	FGGGTKVEIK	559
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	490	WASTRES	560	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	561				
12H11.1	469	-------	560	----------	561	QQVYSTPWT	562	FGQGTKVEIK	563
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	491	SNNQRPS	564	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC	566				
11H4.1	473	---R---	565	----------	566	AAWDDSLNGV	567	FGAGTKLTVL	569
11H8.1	477	---R---	565	----------	566	ATWDDRLNGV	568	FGAGTKLTVL	569
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	492	YDSDRPS	570	GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC	572				
11G1.5	481	D------	571	----------P--	573	QVWDSSSDPVV	574	FGGGTKLTVL	575

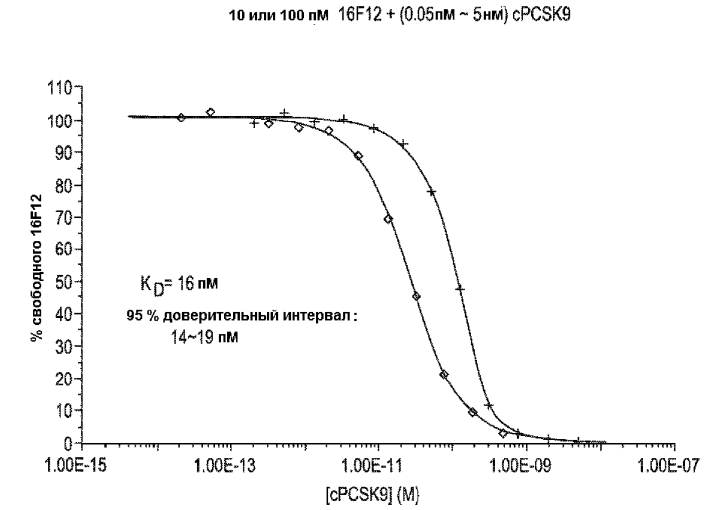
Фиг. 3JJJ



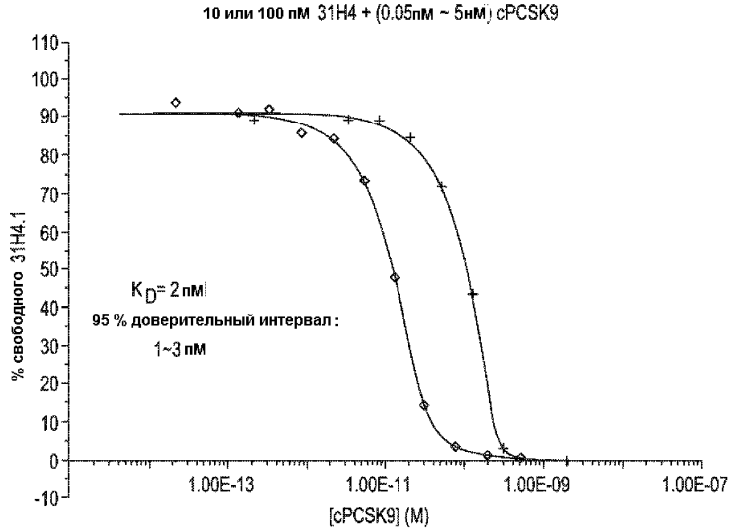
Фиг. 4A



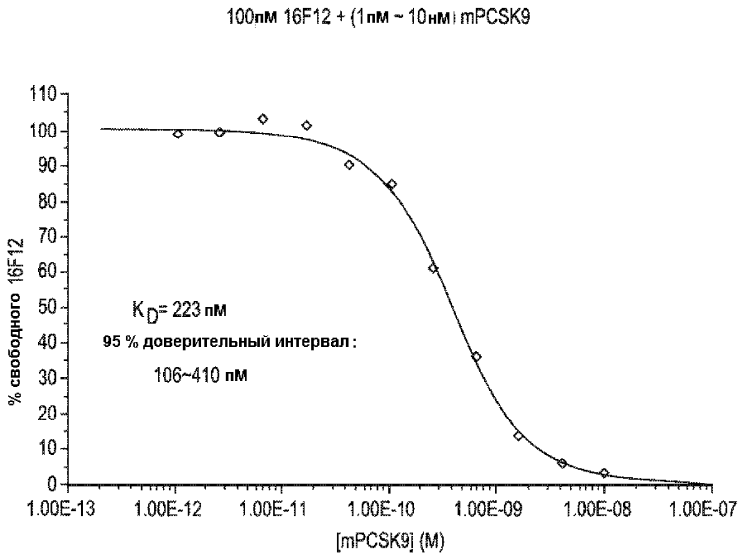
Фиг. 4B



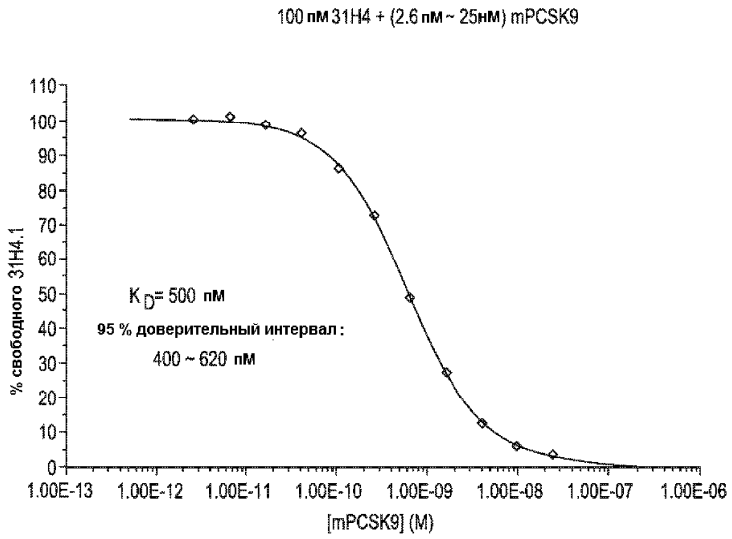
Фиг. 4C



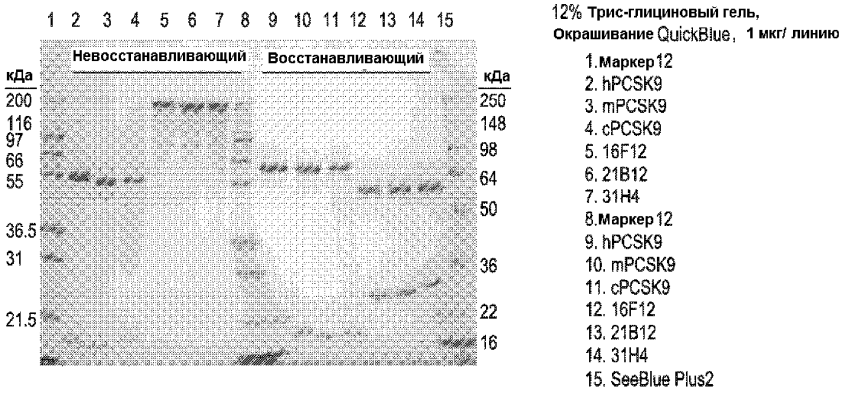
Фиг. 4D



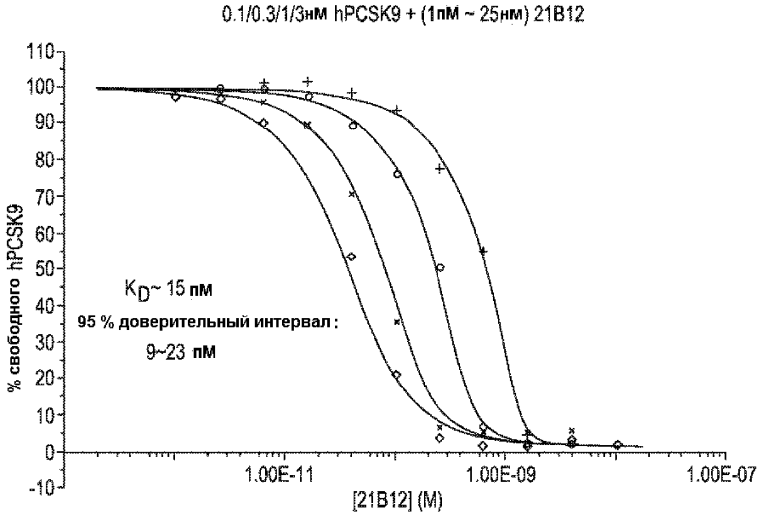
Фиг. 4E



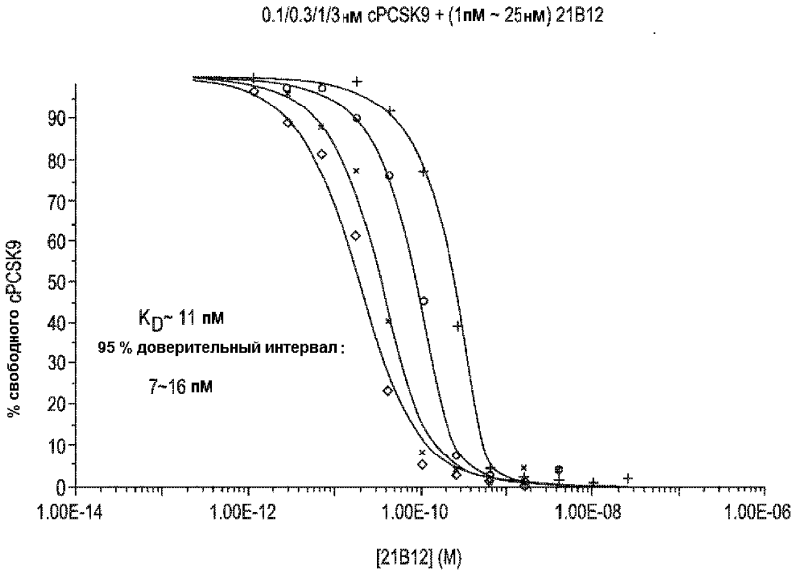
Фиг. 4F



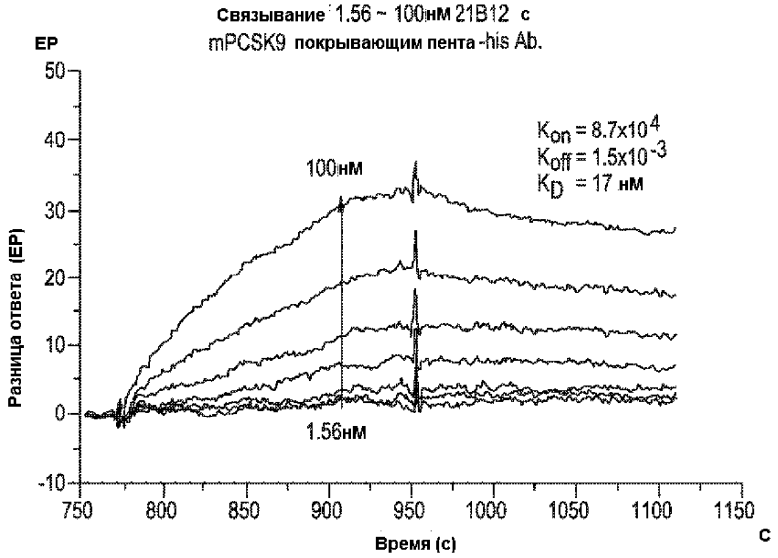
Фиг. 5A



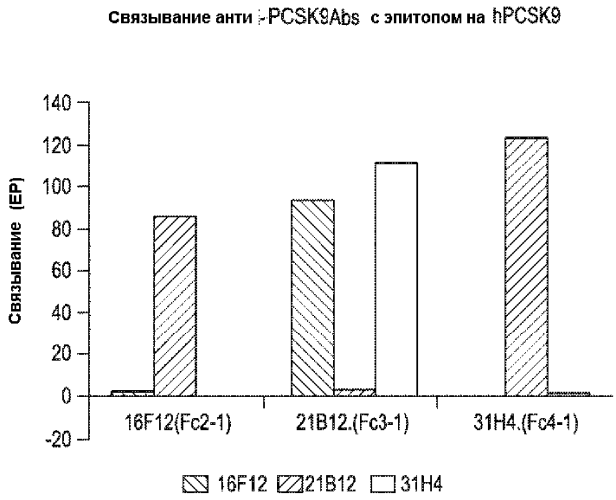
Фиг. 5B



Фиг. 5C

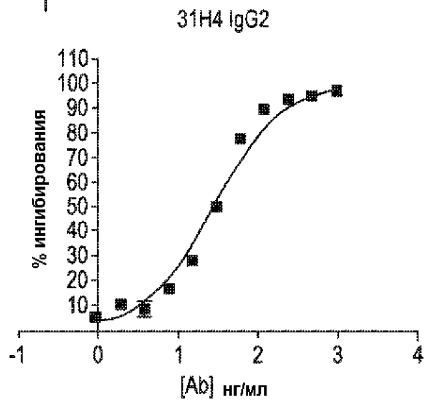


Фиг. 5D



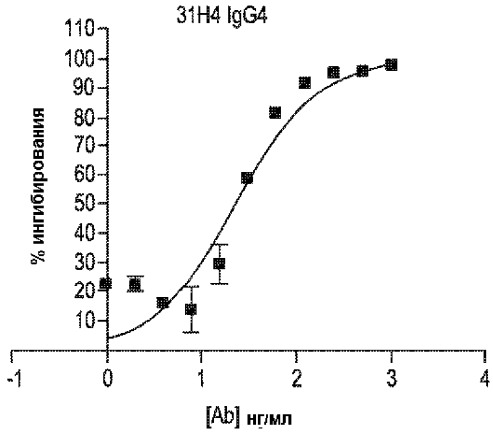
Фиг. 5E

Сигмовидная кривая доза - реакция	
Аппроксимированные значения	
Нижнее значение	0.0
Верхнее значение	100.0
LOGEC50	1.458
EC50	28.70



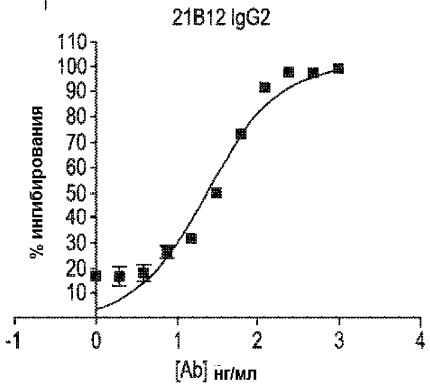
Фиг. 6A

Сигмовидная кривая доза - реакция	
Аппроксимированные значения	
Нижнее значение	0.0
Верхнее значение	100.0
LOGEC50	1.352
EC50	22.47



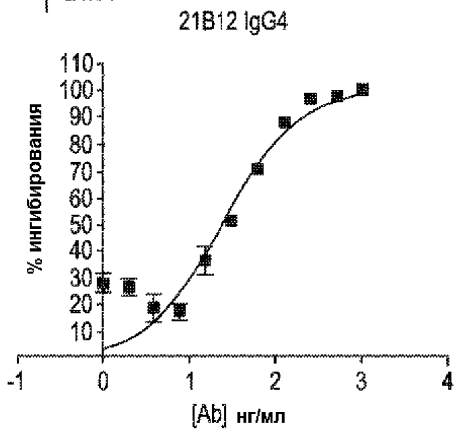
Фиг. 6B

Сигмовидная кривая доза - реакция	
Аппроксимированные значения	
Нижнее значение	0.0
Верхнее значение	100.0
LOGEC50	1.381
EC50	24.07

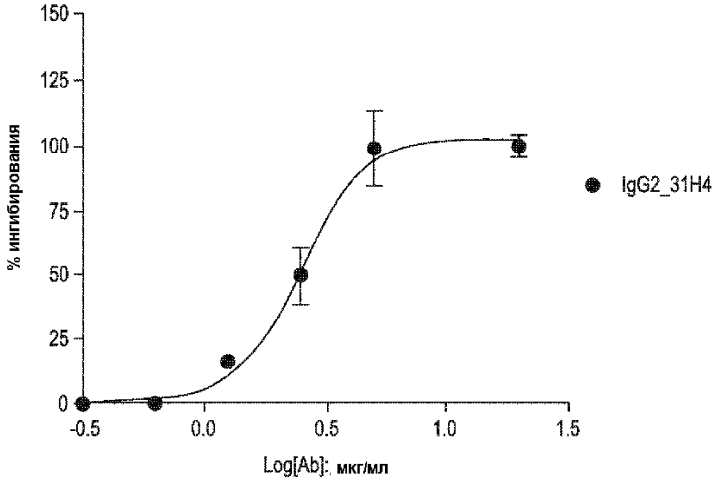


Фиг. 6C

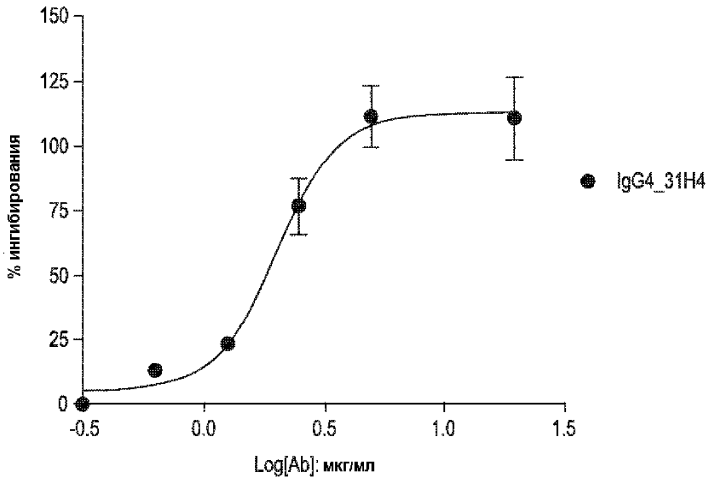
Сигмовидная кривая доза - реакция	
Аппроксимированные значения	
Нижнее значение	0.0
Верхнее значение	100.0
LOGEC50	1.380
EC50	24.01



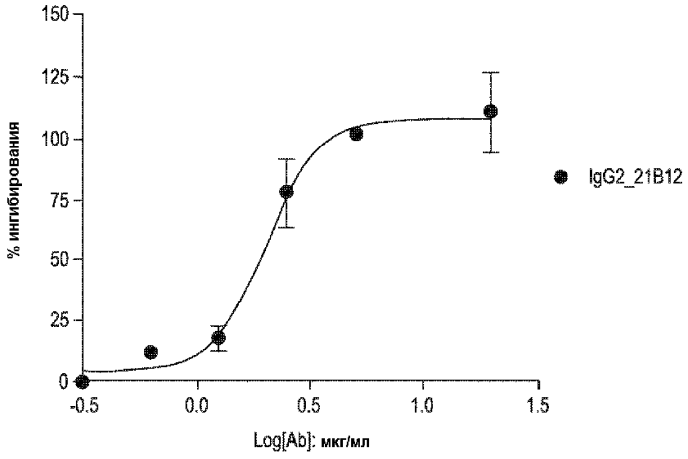
Фиг. 6D



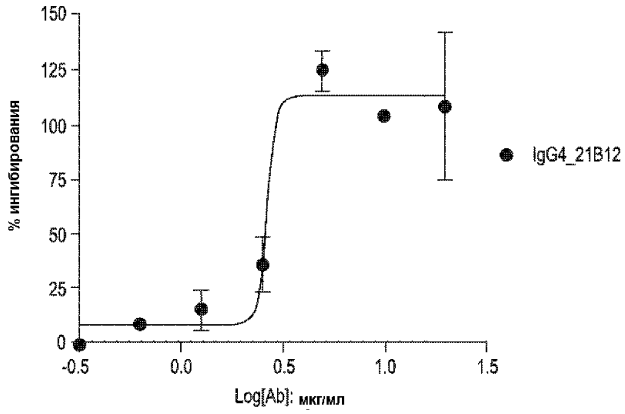
Фиг. 7A



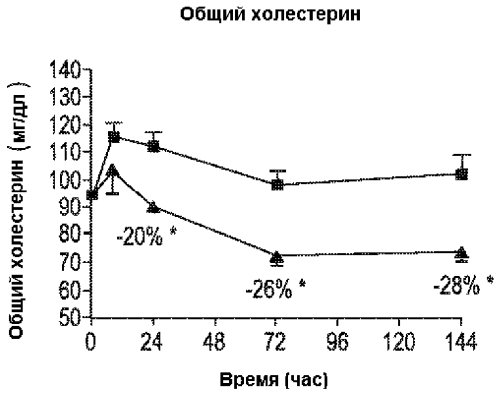
Фиг. 7B



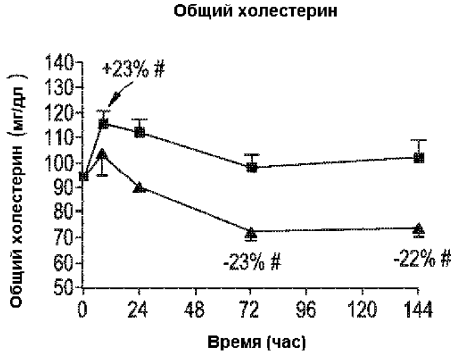
Фиг. 7C



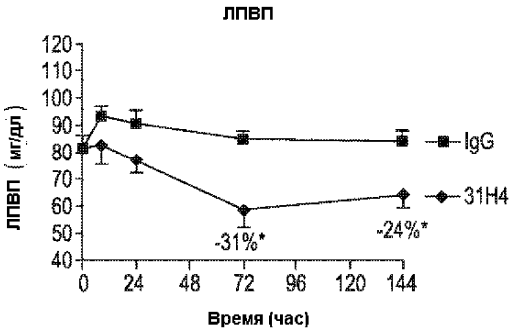
Фиг. 7D



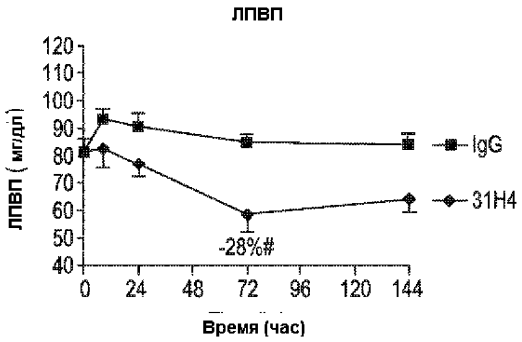
Фиг. 8A



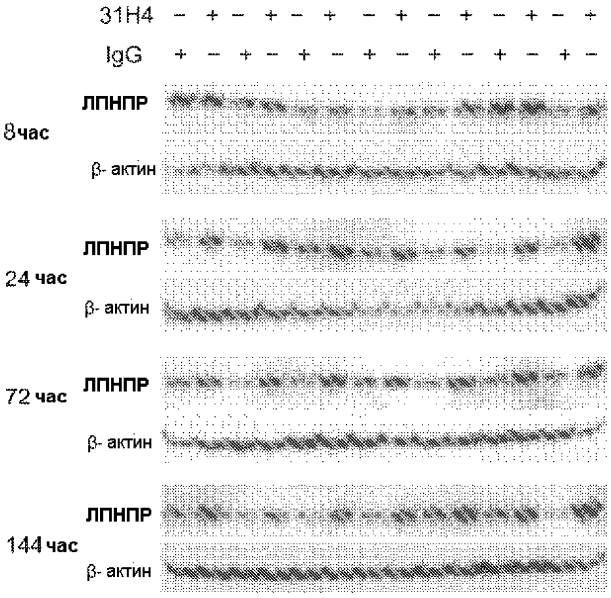
Фиг. 8B



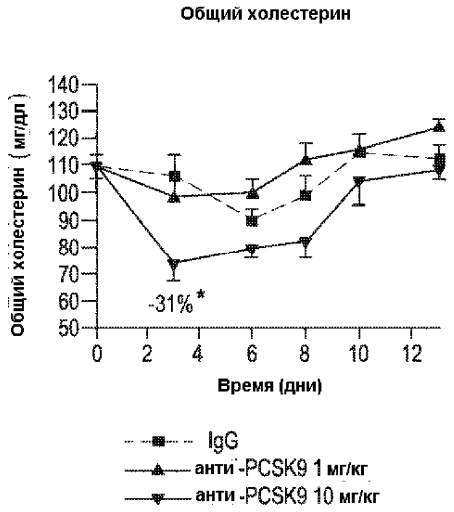
Фиг. 8C



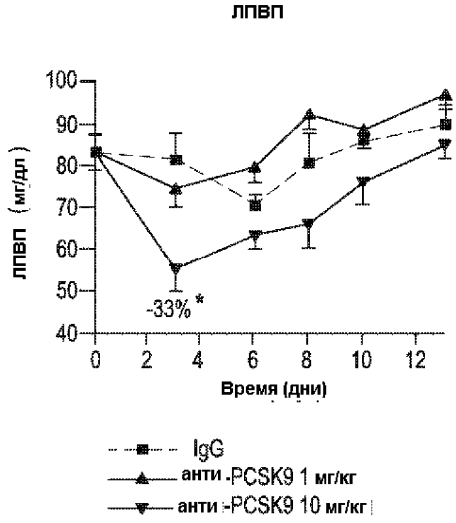
Фиг. 8D



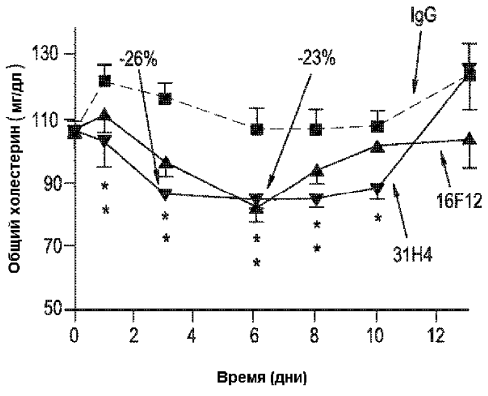
Фиг. 9



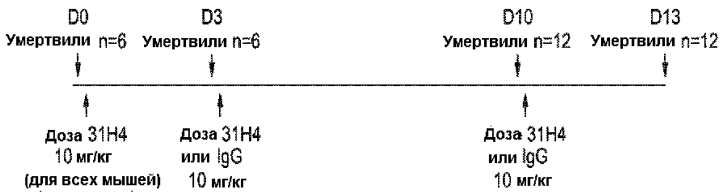
Фиг. 10A



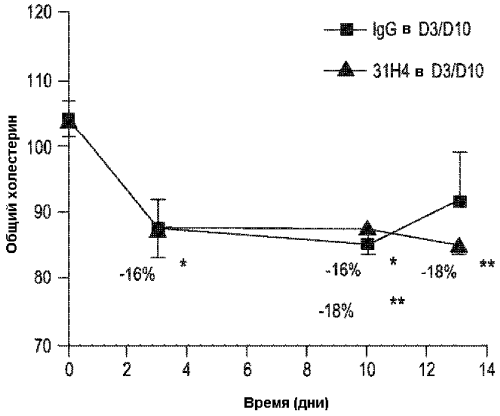
Фиг. 10B



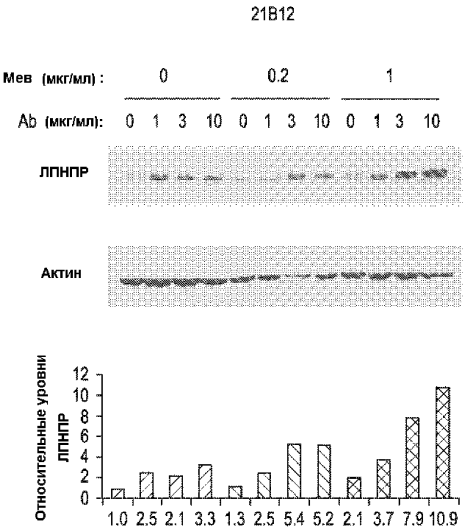
Фиг. 10C



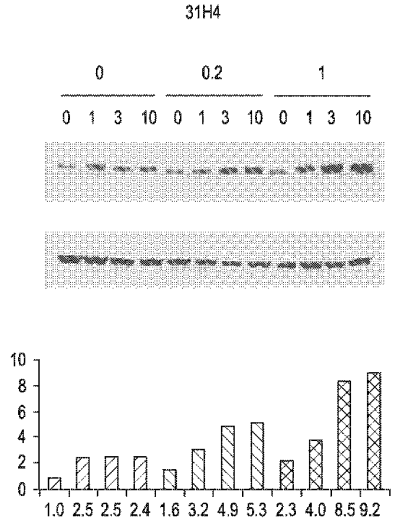
Фиг. 11A



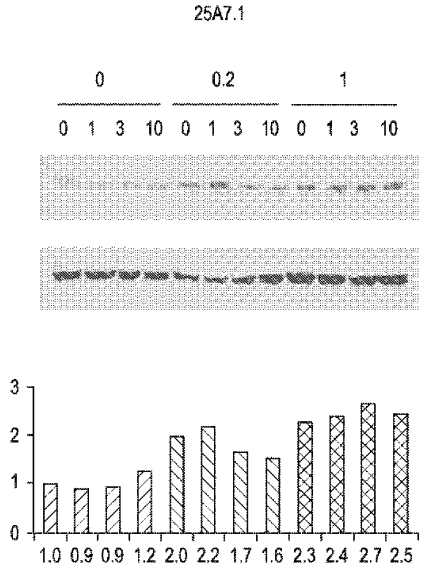
Фиг. 11B



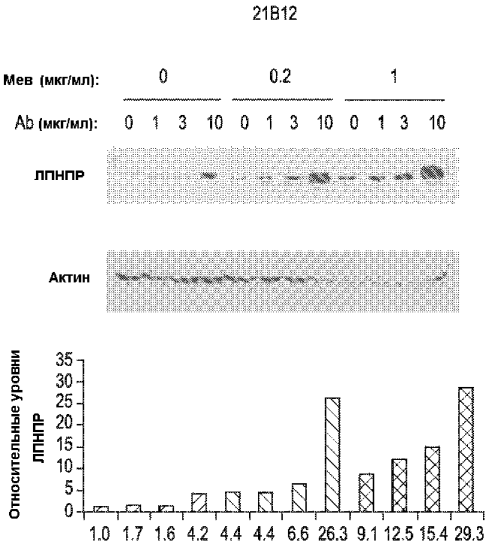
Фиг. 12A



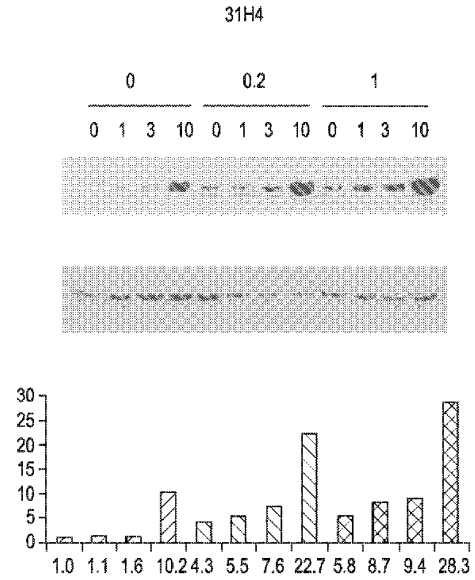
Фиг. 12B



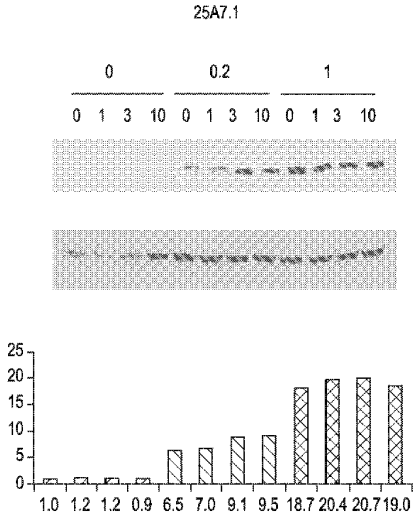
Фиг. 12C



Фиг. 12D



Фиг. 12E

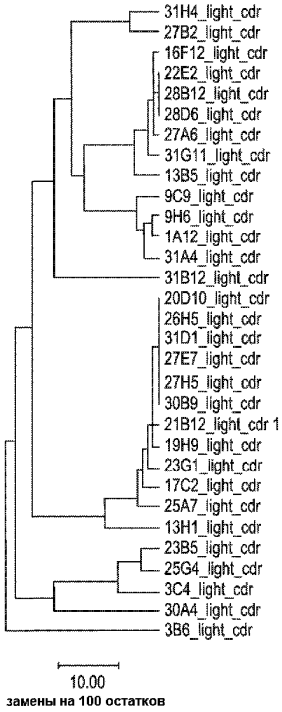


Фиг. 12F

Легкая цепь :

23B5_light_cdr	RASQSI.....SSYLN	(SEQ ID NO:209)	AASSLQS	(SEQ ID NO:211)	QQSYSSPIT~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:213)
25G4_light_cdr	RASQSI.....SIYLN	(SEQ ID NO:388)	AAASLQS	(SEQ ID NO:393)	QQSYSAPIT~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:394)
3C4_light_cdr	RASQRI.....SNYLS	(SEQ ID NO:219)	AASSLQS	(SEQ ID NO:211)	QQSYSTPLI~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:235)
30A4_light_cdr	RSSQSLLHSNGYNFLN	(SEQ ID NO:220)	LGSHRAS	(SEQ ID NO:227)	MQVLQTPFT~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:236)
21B12_light_cdr	~~TGTSSDVGGYNSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	NSYTSTSMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:395)
23G1_light_cdr	~~TGTSSDVGGYNSVS	(SEQ ID NO:158)	EVTNRPS	(SEQ ID NO:162)	NSYTSTSMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:395)
20D10_light_cdr	~~TGTSSDVGGYNSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSTSMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:164)
26H5_light_cdr	~~TGTSSDVGGYNSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSTSMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:164)
31D1_light_cdr	~~TGTSSDVGGYNSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSTSMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:164)
27E7_light_cdr	~~TGTSSDVGGYNSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSTSMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:164)
27H5_light_cdr	~~TGTSSDVGGYNSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSTSMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:164)
30B9_light_cdr	~~TGTSSDVGGYNSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSTSMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:164)
19H9_light_cdr	~~TGTNSDVGGYNSVS	(SEQ ID NO:389)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSTSMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:164)
17C2_light_cdr	~~TGTSSDVGAYNSVS	(SEQ ID NO:390)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSTNMV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:164)
25A7_light_cdr	~~TGTSSDVGRYNSVS	(SEQ ID NO:391)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSSSVV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:396)
13H1_light_cdr	~~TGTSSDVGNYNLVS	(SEQ ID NO:221)	EVSKRPS	(SEQ ID NO:228)	CSYAGSSTLV~~~~~~~~ (SEQ ID NO:237)
31H4_light_cdr	~~TGSSSNIGAGYDVH	(SEQ ID NO:222)	GNSNRPS	(SEQ ID NO:229)	QSYDSSLSGSV~~~~~~~ (SEQ ID NO:238)
27B2_light_cdr	~~TGSSSNIGAHYDVH	(SEQ ID NO:223)	GNTYRPS	(SEQ ID NO:230)	QSYDNSLSGVV~~~~~~~ (SEQ ID NO:239)
9H6_light_cdr	~~SGSSSNIGSNT.VN	(SEQ ID NO:197)	SNNRRPS	(SEQ ID NO:199)	AAWDDSLN.WV~~~~~~~ (SEQ ID NO:397)
1A12_light_cdr	~~SGSSSNIGSKT.VN	(SEQ ID NO:381)	SNNRRPS	(SEQ ID NO:199)	AAWDDSLN.WV~~~~~~~ (SEQ ID NO:397)
9C9_light_cdr	~~SGSSSNIGSKT.VN	(SEQ ID NO:381)	RNNQRPL	(SEQ ID NO:392)	AAWDDSLN.WV~~~~~~~ (SEQ ID NO:327)
31A4_light_cdr	~~SGSSSNIGSNT.VN	(SEQ ID NO:197)	SNNQRPS	(SEQ ID NO:731)	AVWDDSLNGWV~~~~~~~ (SEQ ID NO:240)
22E2_light_cdr	~~SGSSSNIGNNF.VS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSSLSGYV~~~~~~~ (SEQ ID NO:185)
28B12_light_cdr	~~SGSSSNIGNNF.VS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSSLSGYV~~~~~~~ (SEQ ID NO:185)
28D6_light_cdr	~~SGSSSNIGNNF.VS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSSLSGYV~~~~~~~ (SEQ ID NO:185)
16F12_light_cdr	~~SGSSSNIGNNF.VS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSSLSAYV~~~~~~~ (SEQ ID NO:185)
27A6_light_cdr	~~SGSSSNIGNNF.VS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSSLSSYV~~~~~~~ (SEQ ID NO:398)
31G11_light_cdr	~~SGSSSNIGNNF.VS	(SEQ ID NO:182)	DSNKRPS	(SEQ ID NO:184)	GTWDSSLSAYV~~~~~~~ (SEQ ID NO:399)
13B5_light_cdr	~~SGSNSNIGNNY.VS	(SEQ ID NO:224)	DNNKRPS	(SEQ ID NO:232)	GTWDSSLSAVV~~~~~~~ (SEQ ID NO:241)
31B12_light_cdr	~~~~SGDKLGDKYAC.	(SEQ ID NO:225)	QNTKWPL	(SEQ ID NO:233)	QAWDSSTVV~~~~~~~~~ (SEQ ID NO:242)
3B6_light_cdr	~~~~TLSSGYSSYEVD	(SEQ ID NO:226)	VDTGGIV	(SEQ ID NO:234)	SDYHCGADHGSGTNFVVV (SEQ ID NO:243)
Консенсус					

Фиг. 13A

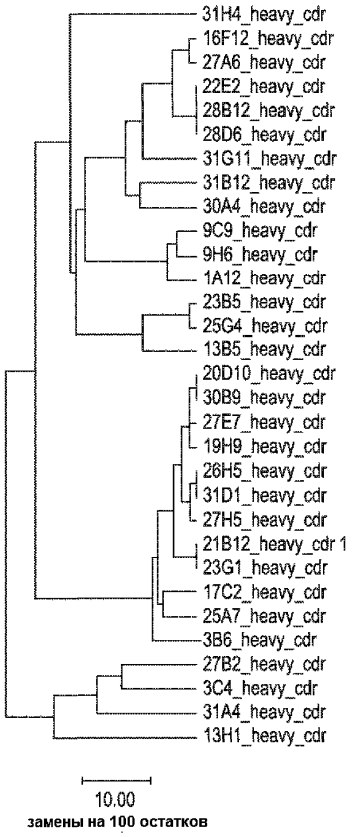


Фиг. 13B

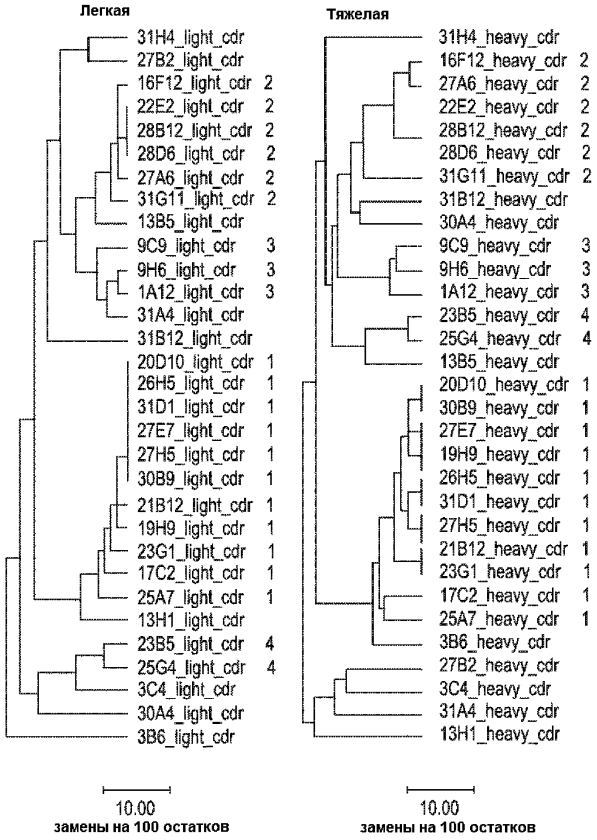
Тяжелая цепь:

```
20D10_heavy_cdr  ~~GYPLTSYGIS (SEQ ID NO:168)  WISAYNG.NTNYAQKVQG (SEQ ID NO:174)  GYGMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:180)
30B9_heavy_cdr   ~~GYPLTSYGIS (SEQ ID NO:169)  WISAYNG.NTN AQKVQG (SEQ ID NO:174)  GYGMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:180)
27E7_heavy_cdr   ~~GYSLTSYGIS (SEQ ID NO:366)  WISAYNG.NTN AQKVQG (SEQ ID NO:174)  GYGMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:180)
19H9_heavy_cdr   ~~GYALTSYGIS (SEQ ID NO:367)  WISAYNG.NTN AQKVQG (SEQ ID NO:174)  GYGMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:180)
21B12_heavy_cdr  ~~GYTLTSYGIS (SEQ ID NO:368)  WVSFYNG.NTN AQKLQG (SEQ ID NO:175)  GYGMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:180)
23G1_heavy_cdr   ~~GYTLTSYGIS (SEQ ID NO:368)  WVSFYNG.NTN AQKLQG (SEQ ID NO:175)  GYGMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:180)
26H5_heavy_cdr   ~~GYTLTSYGIS (SEQ ID NO:368)  WISFYNG.NTN AQKVQG (SEQ ID NO:174)  GYGMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:180)
31D1_heavy_cdr   ~~GYTLTSYGIS (SEQ ID NO:368)  WISFYNG.NTN AQKVQG (SEQ ID NO:174)  GYGMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:180)
27H5_heavy_cdr   ~~GYTLTSYGIS (SEQ ID NO:368)  WISVYNG.NTN AQKVQG (SEQ ID NO:174)  GYGMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:180)
17C2_heavy_cdr   ~~GYSFTSYGIS (SEQ ID NO:369)  WVSAYNG.NTN AQKFQG (SEQ ID NO:178)  GYVMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:387)
25A7_heavy_cdr   ~~GYTFPSYGIS (SEQ ID NO:370)  WISAYNG.NTN AEKLQG (SEQ ID NO:179)  GYVMDV~~~~~~~~(SEQ ID NO:387)
3B6_heavy_cdr    ~~GYTFTSYGIS (SEQ ID NO:344)  WISTYNG.NTN AQKVQG (SEQ ID NO:252)  GYTRDY~~~~~~~~(SEQ ID NO:261)
9C9_heavy_cdr    ~~GFTFSSYWMS (SEQ ID NO:371)  NIKQDGS.EKY VDSVKG (SEQ ID NO:377)  E....SNWGFAFDI(SEQ ID NO:385)
9H6_heavy_cdr    ~~GFTFSRYWMS (SEQ ID NO:372)  NIKHDGS.EKY VDSVKG (SEQ ID NO:378)  E....SNWGFAFDV(SEQ ID NO:386)
1A12_heavy_cdr   ~~GLTFSNFWMS (SEQ ID NO:373)  NIKQDGS.EKY VDSVKG (SEQ ID NO:377)  E....SNWGFAFDI(SEQ ID NO:385)
23B5_heavy_cdr   ~~GFTFSSYAMN (SEQ ID NO:374)  TISGSGD.NTY ADSVKG (SEQ ID NO:379)  KFVLMVYAMLDY~~(SEQ ID NO:218)
25G4_heavy_cdr   ~~GFTFSSYAMN (SEQ ID NO:374)  TISGSGG.NTY ADSVKG (SEQ ID NO:380)  KFVLMVYAMLDY~~(SEQ ID NO:218)
13B5_heavy_cdr   ~~GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:245)  TISGSGG.RTY ADSVKG (SEQ ID NO:253)  E....VGSPFDY~~(SEQ ID NO:262)
22E2_heavy_cdr   ~~GFTFSSFGMH (SEQ ID NO:188)  LIWNDGS.NKY ADSVKG (SEQ ID NO:381)  AIAAL.YYYYGMDV(SEQ ID NO:195)
28B12_heavy_cdr  ~~GFTFSSFGMH (SEQ ID NO:188)  LIWNDGS.NKY ADSVKG (SEQ ID NO:381)  AIAAL.YYYYGMDV(SEQ ID NO:195)
28D6_heavy_cdr   ~~GFTFSSFGMH (SEQ ID NO:188)  LIWNDGS.NKY ADSVKG (SEQ ID NO:381)  AIAAL.YYYYGMDV(SEQ ID NO:195)
16F12_heavy_cdr  ~~GFTFNSFGMH (SEQ ID NO:375)  LIWSDGS.DEY ADSVKG (SEQ ID NO:382)  AIAAL.YYYYGMDV(SEQ ID NO:195)
27A6_heavy_cdr   ~~GFTFNSFGMH (SEQ ID NO:375)  LIWSDGS.DKY ADSVKG (SEQ ID NO:383)  AIAAL.YYYYGMDV(SEQ ID NO:195)
31G11_heavy_cdr  ~~GFTFRSYGMH (SEQ ID NO:376)  LIWHDGS.NTY VDSVKG (SEQ ID NO:384)  GIAVA.YYYYGMDV(SEQ ID NO:196)
30A4_heavy_cdr   ~~GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:244)  VIWYDGS.DKY ADSVKG (SEQ ID NO:254) ETGPLKLYYYGMDV(SEQ ID NO:263)
31B12_heavy_cdr  ~~GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:246)  IIWYDGS.NKY ADSVKG (SEQ ID NO:255) R.GGLAARPGGMDV(SEQ ID NO:264)
31H4_heavy_cdr   ~~GFTFSSYSMN (SEQ ID NO:247)  SISSSSS.YIS ADSVKG (SEQ ID NO:256) DYDFWSAYYDAFDV(SEQ ID NO:265)
27B2_heavy_cdr   GGSISSGGYYWS (SEQ ID NO:248)  YIYNSGSTY..  NPSLKS (SEQ ID NO:257) ED.TAMVPY.FDY~(SEQ ID NO:266)
3C4_heavy_cdr    GGSISSSDYYWS (SEQ ID NO:249)  YIYYSGSTY..  NPSLKS (SEQ ID NO:258) GG.VTTYYYAMDV~(SEQ ID NO:267)
31A4_heavy_cdr   GGSFSA..YYWN (SEQ ID NO:250)  EINHSGRTD..  NPSLKS (SEQ ID NO:259) GQ.LVPFDY~~~~~(SEQ ID NO:268)
13H1_heavy_cdr   GDSVSSNSAAWN (SEQ ID NO:251)  RTYYRSKWYKN SVSVKS (SEQ ID NO:260) GGPTAAFDY~~~~~(SEQ ID NO:269)
Консенсус                                      *
```

Фиг. 13C



Фиг. 13D



Фиг. 13E

Консенсус для Группы 1:

```
20D10_light_heavy_cdr  TGTSSDVGGYNSVS  (SEQ ID NO:158)   EVSNRPS  (SEQ ID NO:162)  SSYTSTSMV  (SEQ ID NO:164)
30B9_light_heavy_cdr       S    G      (SEQ ID NO:158)        S   (SEQ ID NO:162)       S    TSM  (SEQ ID NO:164)
27E7_light_heavy_cdr       S    G      (SEQ ID NO:158)        S   (SEQ ID NO:162)       S    TSM  (SEQ ID NO:164)
19H9_light_heavy_cdr       N    G      (SEQ ID NO:159)        S   (SEQ ID NO:162)       S    TSM  (SEQ ID NO:164)
21B12_light_heavy_cdr      S    G      (SEQ ID NO:158)        S   (SEQ ID NO:162)       N    TSM  (SEQ ID NO:165)
23G1_light_heavy_cdr       S    G      (SEQ ID NO:158)        T   (SEQ ID NO:163)       N    TSM  (SEQ ID NO:165)
26H5_light_heavy_cdr       S    G      (SEQ ID NO:158)        S   (SEQ ID NO:162)       S    TSM  (SEQ ID NO:164)
31D1_light_heavy_cdr       S    G      (SEQ ID NO:158)        S   (SEQ ID NO:162)       S    TSM  (SEQ ID NO:164)
27H5_light_heavy_cdr       S    G      (SEQ ID NO:158)        S   (SEQ ID NO:162)       S    TSM  (SEQ ID NO:164)
17C2_light_heavy_cdr       S    A      (SEQ ID NO:160)        S   (SEQ ID NO:162)       S    TNM  (SEQ ID NO:166)
25A7_light_heavy_cdr       S    R      (SEQ ID NO:161)        S   (SEQ ID NO:162)       S    SSV  (SEQ ID NO:167)

20D10_light_heavy_cdr  GYPLTSYGIS  (SEQ ID NO:168)  WISAYNGNTNYAQKVQG  (SEQ ID NO:174)  GYGMDV  (SEQ ID NO:180)
30B9_light_heavy_cdr     PLT       (SEQ ID NO:168)  I A       Q V    (SEQ ID NO:174)    G     (SEQ ID NO:180)
27E7_light_heavy_cdr     SLT       (SEQ ID NO:169)  I A       Q V    (SEQ ID NO:174)    G     (SEQ ID NO:180)
19H9_light_heavy_cdr     ALT       (SEQ ID NO:170)  I A       Q V    (SEQ ID NO:174)    G     (SEQ ID NO:180)
21B12_light_heavy_cdr    TLT       (SEQ ID NO:171)  V F       Q L    (SEQ ID NO:175)    G     (SEQ ID NO:180)
23G1_light_heavy_cdr     TLT       (SEQ ID NO:171)  V F       Q L    (SEQ ID NO:175)    G     (SEQ ID NO:180)
26H5_light_heavy_cdr     TLT       (SEQ ID NO:171)  I F       Q V    (SEQ ID NO:176)    G     (SEQ ID NO:180)
31D1_light_heavy_cdr     TLT       (SEQ ID NO:171)  I F       Q V    (SEQ ID NO:176)    G     (SEQ ID NO:180)
27H5_light_heavy_cdr     TLT       (SEQ ID NO:171)  I V       Q V    (SEQ ID NO:177)    G     (SEQ ID NO:180)
17C2_light_heavy_cdr     SFT       (SEQ ID NO:172)  V A       Q F    (SEQ ID NO:178)    V     (SEQ ID NO:181)
25A7_light_heavy_cdr     TFP       (SEQ ID NO:173)  I A       F L    (SEQ ID NO:179)    V     (SEQ ID NO:181)
```

Консенсус для Группы 2:

```
22E2_light_heavy_cdr   SGSSSNIGNNFVS  (SEQ ID NO:182)   DYNKRPS  (SEQ ID NO:183)  GTWDSSLSGYV  (SEQ ID NO:185)
28B12_light_heavy_cdr                 (SEQ ID NO:182)     Y      (SEQ ID NO:183)          G   (SEQ ID NO:185)
28D6_light_heavy_cdr                  (SEQ ID NO:182)     Y      (SEQ ID NO:183)          G   (SEQ ID NO:185)
16F12_light_heavy_cdr                 (SEQ ID NO:182)     Y      (SEQ ID NO:183)          A   (SEQ ID NO:186)
27A6_light_heavy_cdr                  (SEQ ID NO:182)     Y      (SEQ ID NO:183)          S   (SEQ ID NO:187)
31G11_light_heavy_cdr                 (SEQ ID NO:182)     S      (SEQ ID NO:184)          A   (SEQ ID NO:186)

22E2_light_heavy_cdr   GFTFSSFGMH  (SEQ ID NO:188)  LIWHDGSNKYYADSVKG  (SEQ ID NO:191)  AIAALYYYYGMDV  (SEQ ID NO:195)
28B12_light_heavy_cdr     S F     (SEQ ID NO:188)     N   NK  A       (SEQ ID NO:191)  A  AL          (SEQ ID NO:195)
28D6_light_heavy_cdr      S F     (SEQ ID NO:188)     N   NK  A       (SEQ ID NO:191)  A  AL          (SEQ ID NO:195)
16F12_light_heavy_cdr     N F     (SEQ ID NO:189)     S   DE  A       (SEQ ID NO:192)  A  AL          (SEQ ID NO:195)
27A6_light_heavy_cdr      N F     (SEQ ID NO:188)     S   DK  A       (SEQ ID NO:193)  A  AL          (SEQ ID NO:195)
31G11_light_heavy_cdr     R Y     (SEQ ID NO:190)     H   NT  V       (SEQ ID NO:194)  G  VA          (SEQ ID NO:196)
```

Фиг. 13F

Консенсус для Группы 3:

```
9H6_light_heavy_cdr    SGSSSNIGSNTVN  (SEQ ID NO:197)   SNNRRPS  (SEQ ID NO:199)  AAWDDSLNWV  (SEQ ID NO:201)
1A12_light_heavy_cdr           K      (SEQ ID NO:198)   S  R  S  (SEQ ID NO:199)
9C9_light_heavy_cdr            K      (SEQ ID NO:198)   R  Q  L  (SEQ ID NO:200)

9H6_light_heavy_cdr    GFTFSRYWMS  (SEQ ID NO:202)  NIKHDGSEKYYVDSVKG  (SEQ ID NO:205)  ESNWGFAFDV  (SEQ ID NO:207)
1A12_light_heavy_cdr    L   NF     (SEQ ID NO:203)     Q               (SEQ ID NO:206)           I  (SEQ ID NO:208)
9C9_light_heavy_cdr     F   SY     (SEQ ID NO:204)     Q               (SEQ ID NO:206)           I  (SEQ ID NO:208)
```

Консенсус для Группы 4:

```
23B5_light_heavy_cdr   RASQSISSYLN  (SEQ ID NO:209)  AASSLQS  (SEQ ID NO:211)  QQSYSSPIT  (SEQ ID NO:213)
25G4_light_heavy_cdr         I     (SEQ ID NO:210)     A     (SEQ ID NO:212)       A     (SEQ ID NO:214)

23B5_light_heavy_cdr   GFTFSSYAMN  (SEQ ID NO:215)  TISGSGGNTYYADSVKG  (SEQ ID NO:216)  KFVLMVYAMLDY  (SEQ ID NO:218)
25G4_light_heavy_cdr                                      G          (SEQ ID NO:217)
```

Фиг. 13G

Группа 1 (11 членов)

	LV_CDR1	SEQ ID NO:	LV_CDR2	SEQ ID NO:	LV_CDR3	SEQ ID NO:	H_CDR1	SEQ ID NO:	H_CDR2	SEQ ID NO:	H_CDR3	SEQ ID NO:
	1										58	
Консенсус	TGTSSDVGGYNSVS	305	EVSNRPS	306	SSYTSTSMV	307	SYGIS	308	WISAYNGNTNYAQKVQG	309	GYGMDV	310
25A7	........R.....	311	....	312	.....S.V.	313	.....	308	..........E.L..	314	..V...	315
17C2	........A.....	316	....	312	......N..	317	.....	308	.V..........F..	318	..V...	315
21B12	....	305	....	312	N.........	319	.....	308	.V.F.........I..	320	.....	310
23G1	....	305	..T....	321	N.........	319	.....	308	.V.F.........L..	320	.....	310
19H9	...N...........	322	....	312	....	307	.....	308	....	309	.....	310
27H5	....	305	....	312	....	307	.....	308	...V.............	323	.....	310
26H5	....	305	....	312	....	307	.....	308	...F.............	324	.....	310
31D1	....	305	....	312	....	307	.....	308	...F.............	324	.....	310
27E7	....	305	....	312	....	307	.....	308	....	309	.....	310
20D10	....	305	....	312	....	307	.....	308	....	309	.....	310
30B9	....	305	....	312	....	307	.....	308	....	309	.....	310

Группа 2 (6 членов)
Легкая цепь:

	LV_CDR1	SEQ ID NO:	LV_CDR2	SEQ ID NO:	LV_CDR3	SEQ ID NO:
	1					
Консенсус	SGSSSNIGNNFVS	325	DYNKRPS	326	GTWDSSLSGYV	327
31G11	....	325	.S.....	331	........A..	332
28D6	....	325	....	326	....	327
28B12	....	325	....	326	....	327
22E2	....	325	....	326	....	327
16F12	....	325	....	326	........A..	332
27A6	....	325	....	326	........S..	337

Фиг. 13H

Группа 2, продолжение

Тяжелая цепь :

	H_CDR1	SEQ ID NO:	H_CDR2	SEQ ID NO:	H_CDR3	SEQ ID NO:
						66
Консенсус	SFGMH	328	LIWNDGSNKYYADSVKG	329	AIAALYYYYGMDV	330
31G11	.Y...	333	...H....T..V.....	334	G..VA........	335
28D6	.....	328	.....	329	.....	330
28B12	.....	328	.....	329	.....	330
22E2	.....	328	.....	329	.....	330
16F12	.....	328	...S...DE.....	336	.....	330
27A6	.....	328	...S...D.....	338	.....	330

Фиг. 13I

Группа 3 (3 члена)

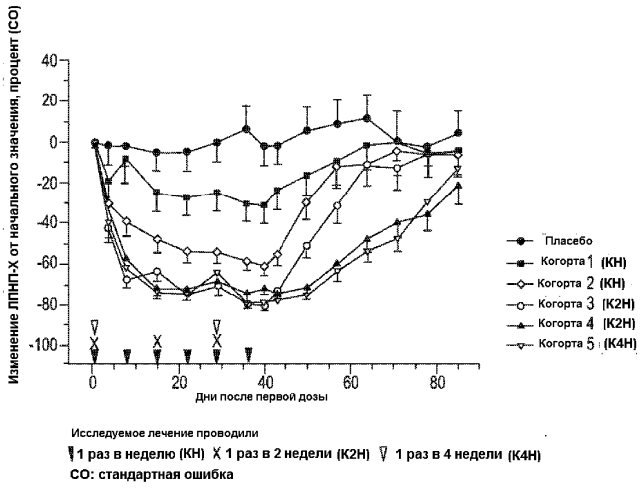
	LV_CDR1	SEQ ID NO:	LV_CDR2	SEQ ID NO:	LV_CDR3	SEQ ID NO:	H_CDR1	SEQ ID NO:	H_CDR2	SEQ ID NO:	H_CDR3	SEQ ID NO:
	1											62
Консенсус	SGSSSNIGSKTVN	339	SNNRRPS	340	AAWDDSLNWV	341	YWMS	342	NIKQDGSEKYYVDSVKG	343	ESNWGFAFDI	344
9H6	.........N...	345	.....	340	.....	341	R....	346	...H..............	347	V	348
9C9	.....	339	R..Q..L	349	.....	341	S....	350	.....	343	.....	344
1A12	.....	339	.....	340	.....	341	NF...	351	.....	343	.....	344

Группа 4 (2 члена)

	KV_CDR1	SEQ ID NO:	KV_CDR2	SEQ ID NO:	KV_CDR3	SEQ ID NO:
	1					
Консенсус	RASQSIS YLN	352	AA SLQS	353	QQSYS PIT	354
25G4	.......I...	355	..A....	356	.....A...	357
23B5	.......S...	358	..S....	359	.....S...	360

	H CDR1	SEQ ID NO:	H CDR2	SEQ ID NO:	H CDR3	SEQ ID NO:
					71	
Консенсус	SYAMN	361	TISGSG NTYYADSVKG	362	KFVLMVYAMLDY	363
25G4	.....	361	......G..........	364	.....	363
23B5	.....	361	......D..........	365	.....	363

Фиг. 13J

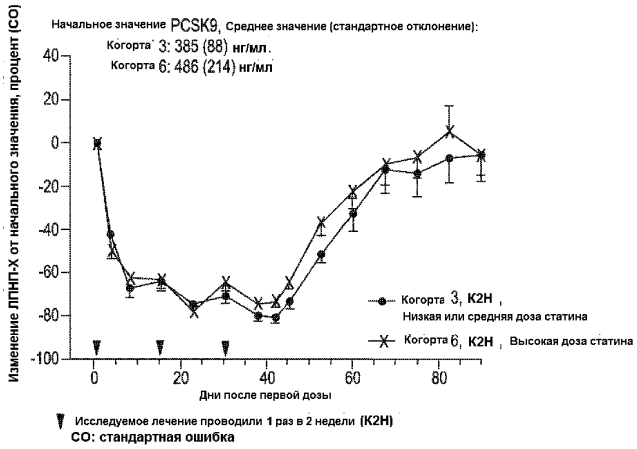


Исследуемое лечение проводили

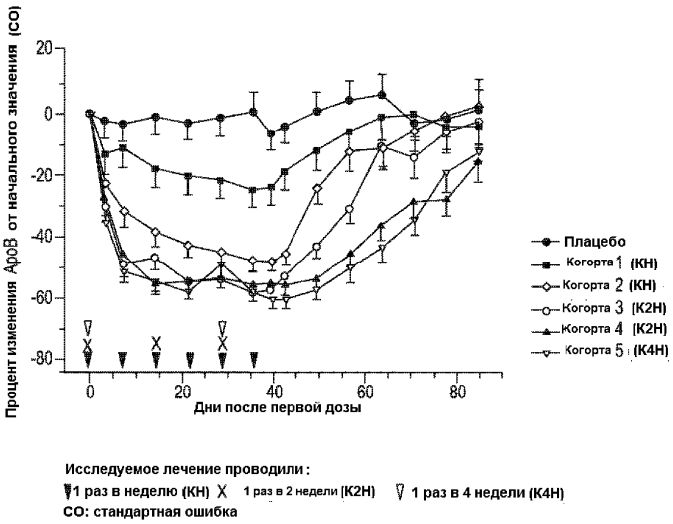
1 раз в неделю (КН) X 1 раз в 2 недели (К2Н) 1 раз в 4 недели (К4Н)

СО: стандартная ошибка

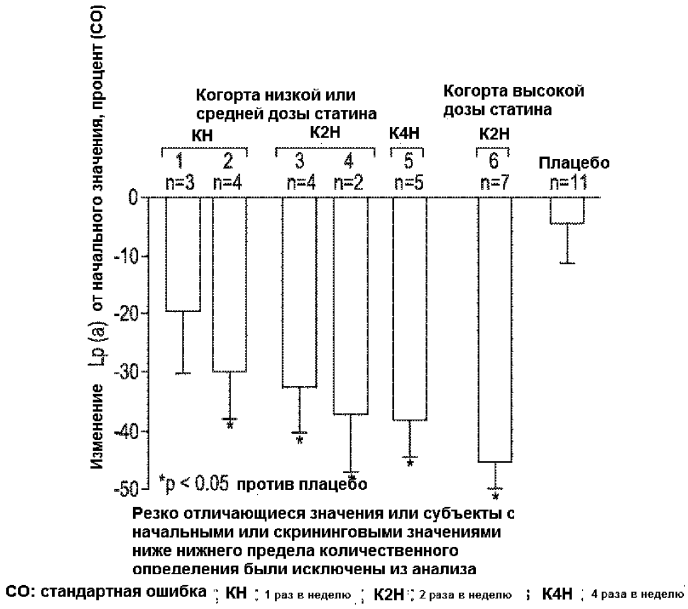
Фиг. 14



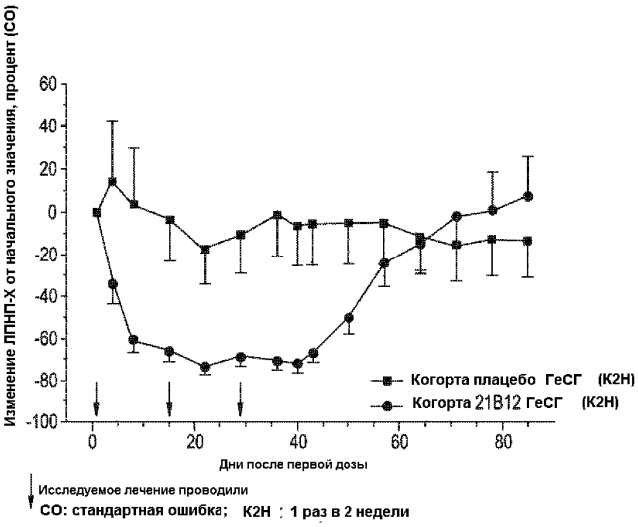
Фиг. 15



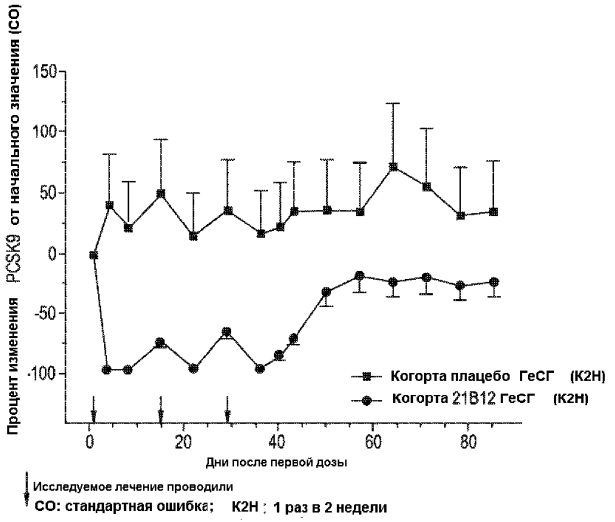
Фиг. 16



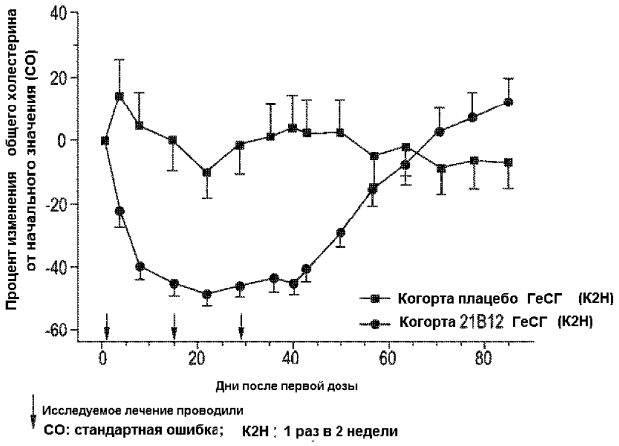
Фиг. 17



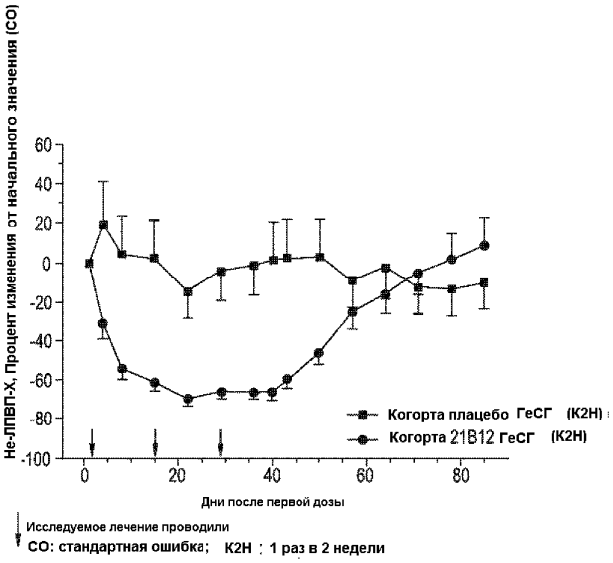
Фиг. 18



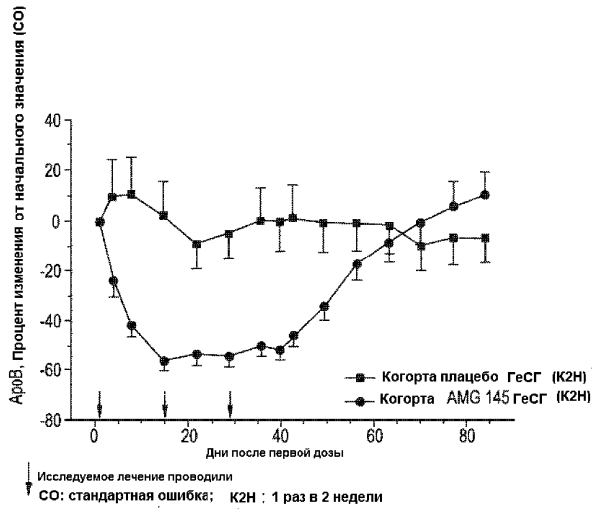
Фиг. 19



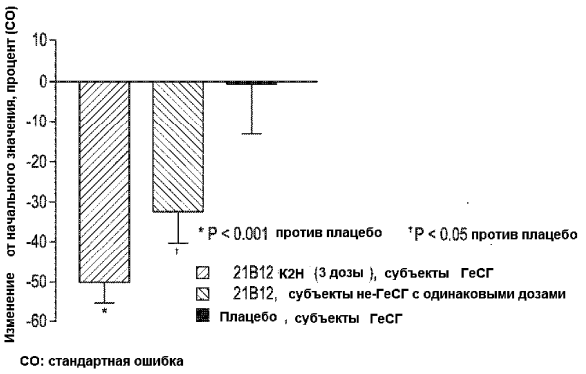
Фиг. 20



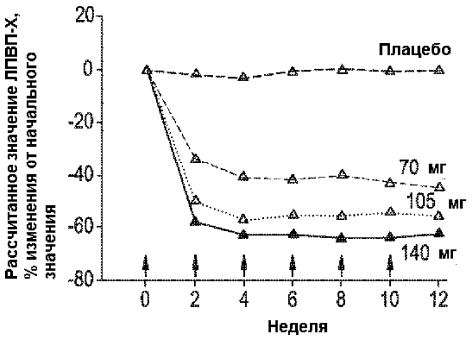
Фиг. 21



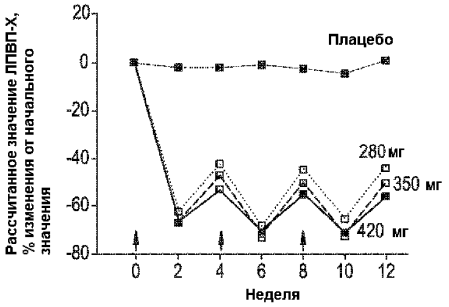
Фиг. 22



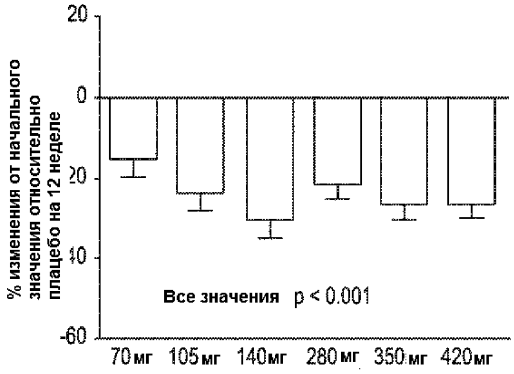
Фиг. 23



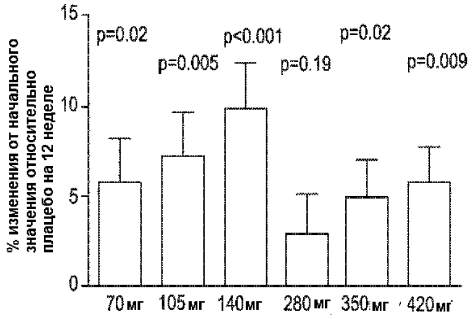
Фиг. 24A



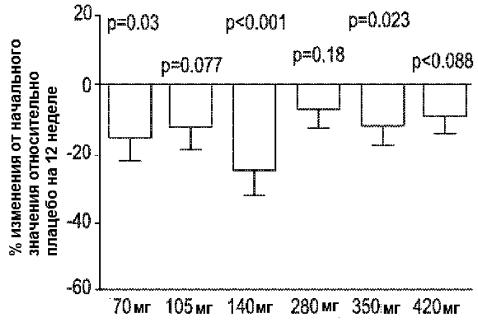
Фиг. 24B



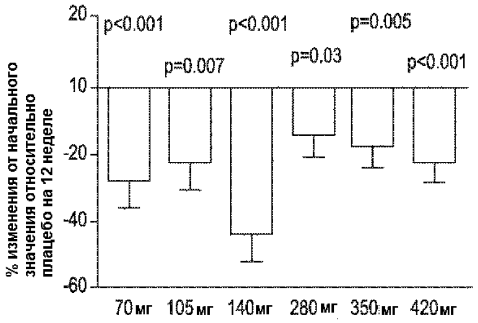
Фиг. 25A



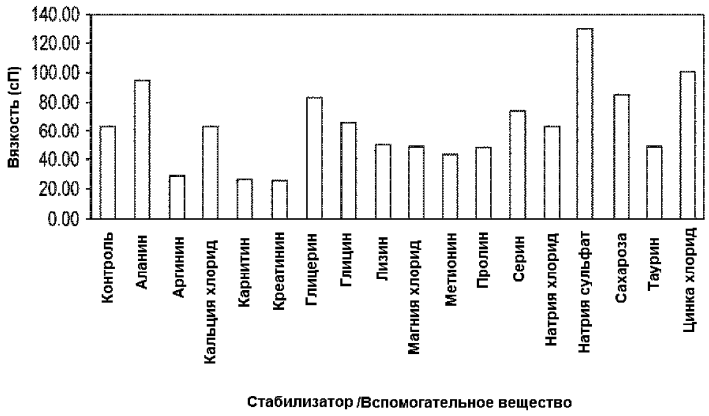
Фиг. 25B



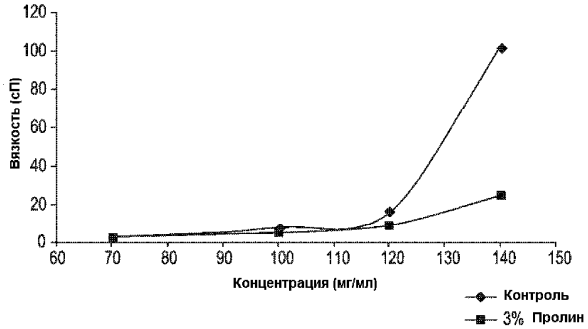
Фиг. 25C



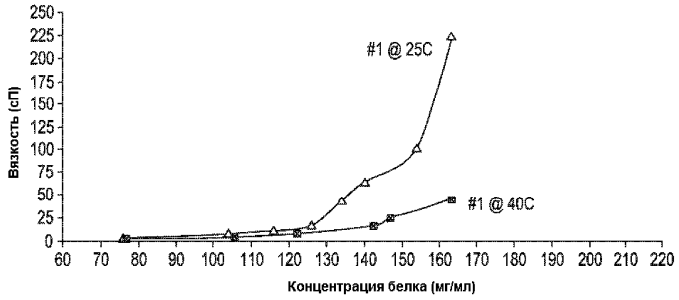
Фиг. 25D



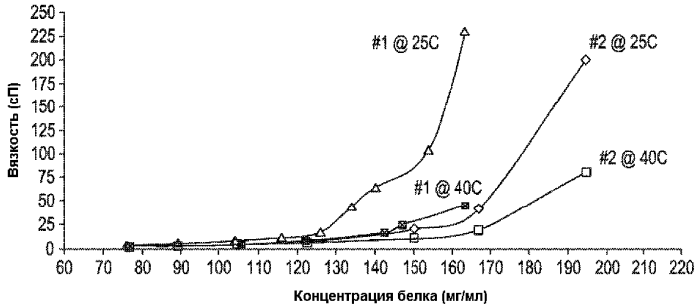
Фиг. 26



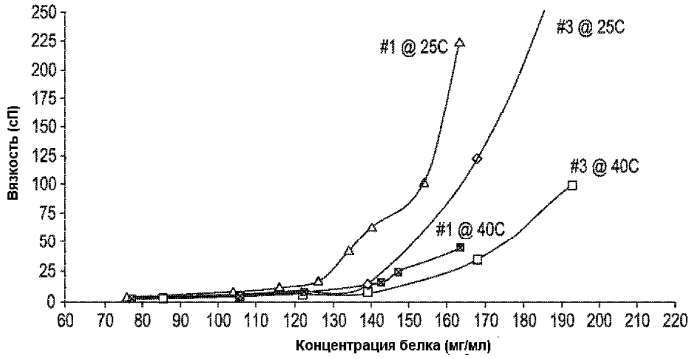
Фиг. 27



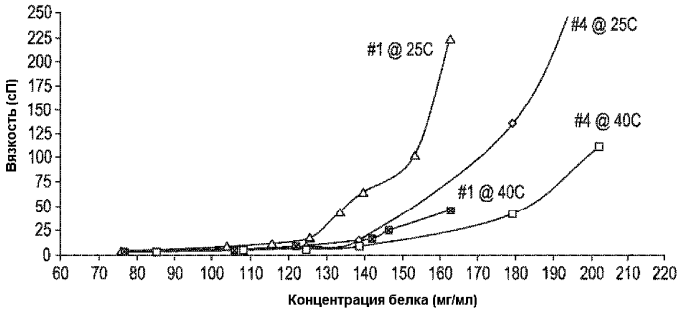
Фиг. 28A



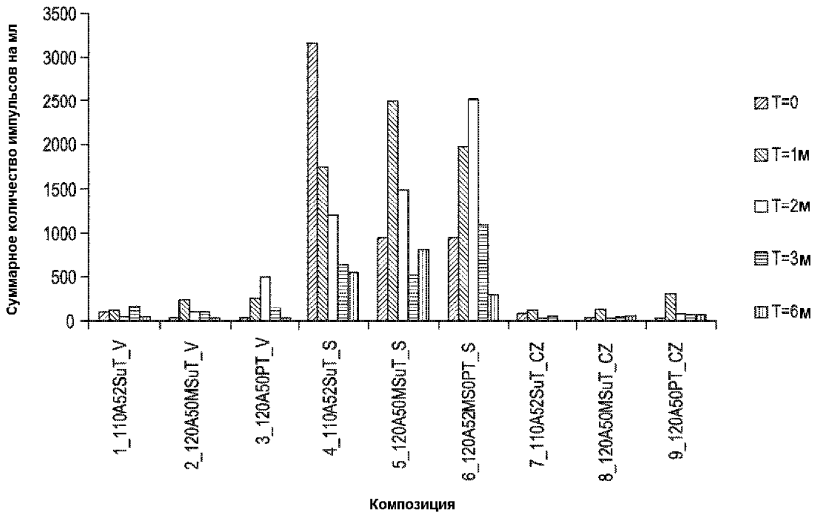
Фиг. 28B



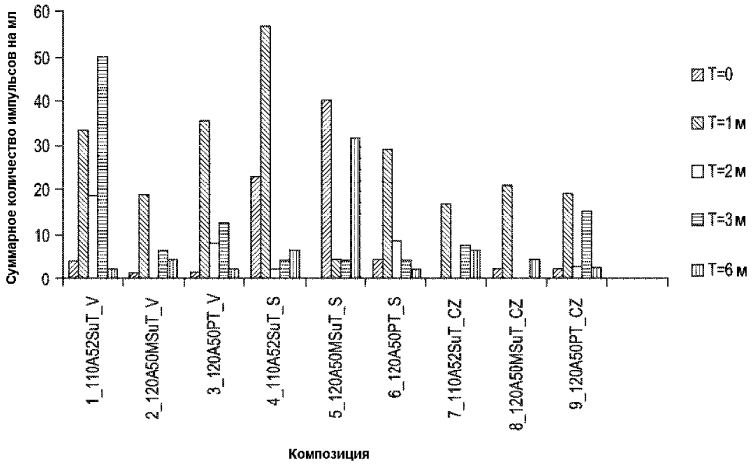
Фиг. 28C



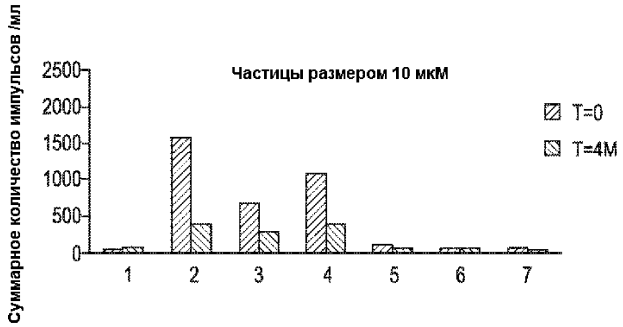
Фиг. 28D



Фиг. 29A

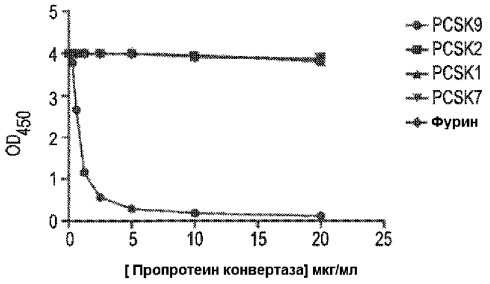


Фиг. 29B

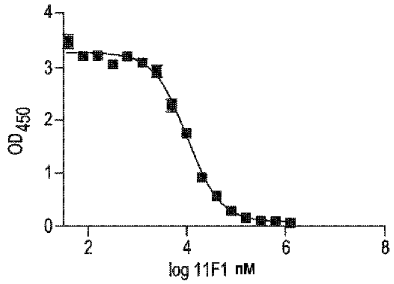


Фиг. 30A

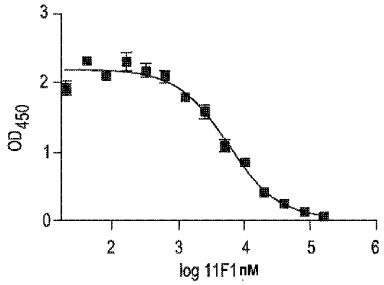
Фиг. 30B



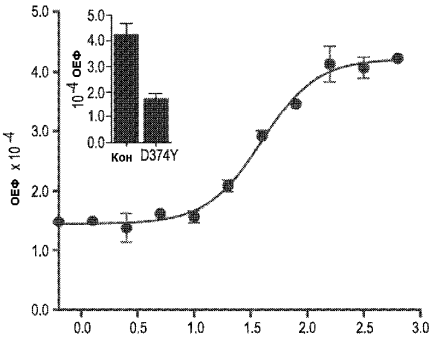
Фиг. 31



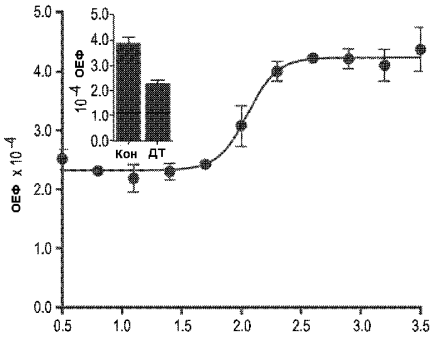
Фиг. 32



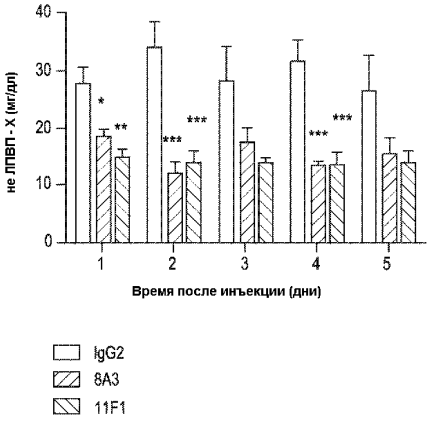
Фиг. 33



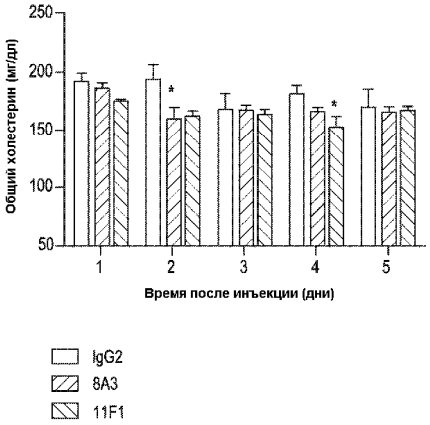
Фиг. 34



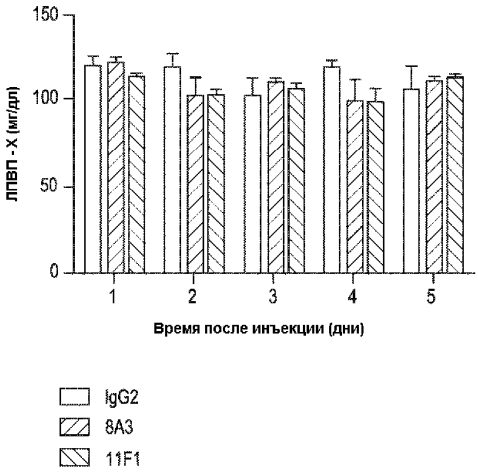
Фиг. 35



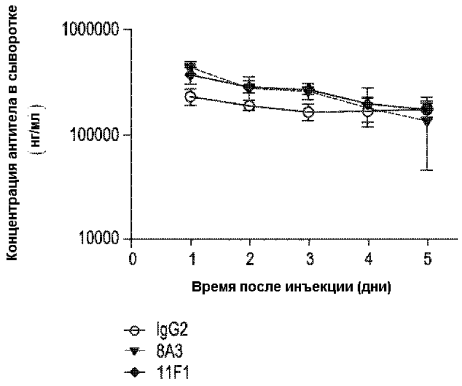
Фиг. 36



Фиг. 37



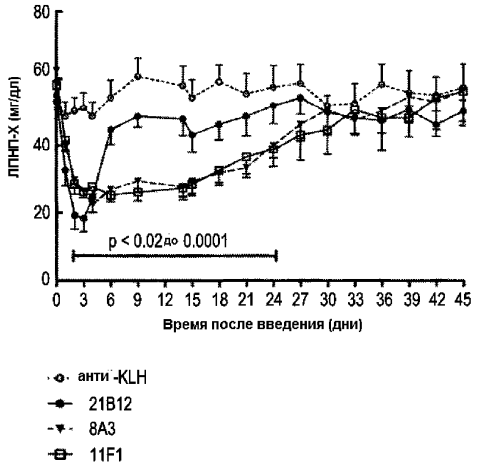
Фиг. 38



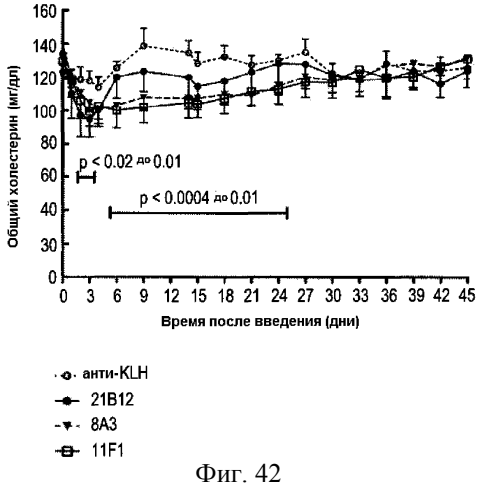
Фиг. 39

Антитело	AUC_{0-t} (мкг·час/мл)	CL_{0-t} (мл/час/кг)	Очевидный $t_{1/2}$ (час)
IgG2	23,500	0.511	>120
11F1	34,700	0.865	83
8A3	36,700	0.817	59

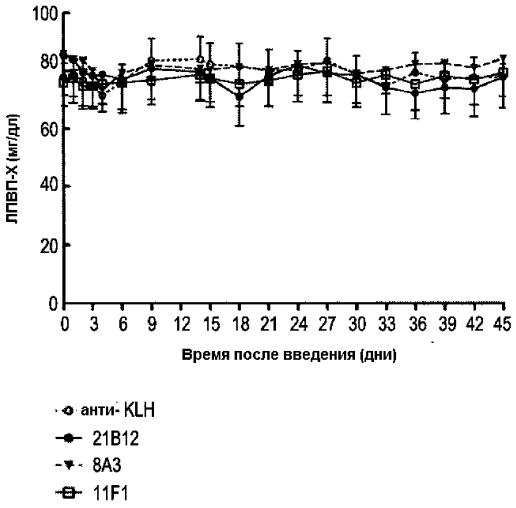
Фиг. 40



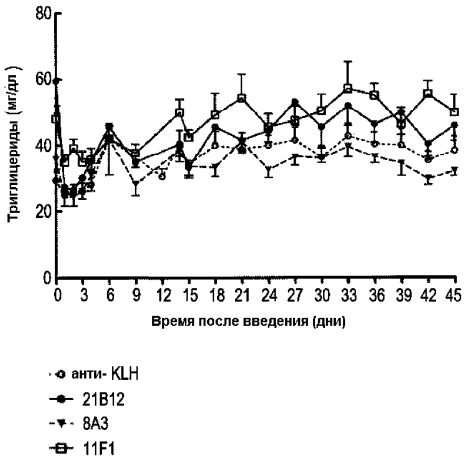
Фиг. 41



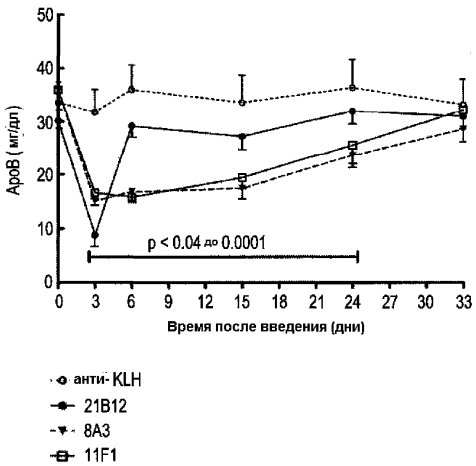
Фиг. 42



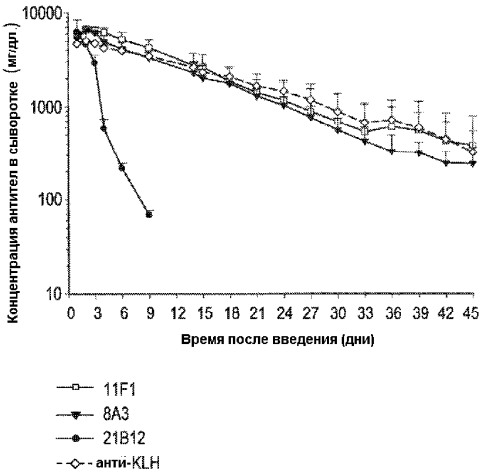
Фиг. 43



Фиг. 44



Фиг. 45



Фиг. 46

Антитело	Фармакокинетические параметры, среднее значение (± стандартное отклонение) $t_{1/2,z}$ (час)	CL/F (мл/час/кг)	Cmax (мкг/мл)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг*час/мл)
Anti-KLH	220 ± 130	0.234 ± 0.036	5.08 ± 0.15	2,170 ± 320
21B12	40 ± 6	1.57 ± 0.68	6.22 ± 2.21	355 ± 109
11F1	210 ± 110	0.228 ± 0.081	6.72 ± 0.62	2,440 ± 910
8A3	190 ± 40	0.255 ± 0.039	6.63 ± 0.66	1,990 ± 290

Фиг. 47

Сравнение последовательностей вариабельного участка легкой цепи и консенсусная последовательность

(HCDR1, HCDR2 **и** HCDR3 **подчеркнуты**):

8A1: Последовательность вариабельного участка легкой цепи (SEQ ID NO:485); LCDR1 (SEQ ID NO:503); LCDR2 (SEQ ID NO:504); LCDR3 (SEQ ID NO:558)

8A3: Последовательность вариабельного участка легкой цепи (SEQ ID NO:461); LCDR1 (SEQ ID NO:503); LCDR2 (SEQ ID NO:4); LCDR3 (SEQ ID NO:558)

11F1: Последовательность вариабельного участка легкой цепи (SEQ ID NO:465); LCDR1 (SEQ ID NO:503)); LCDR2 (SEQ ID NO:504); LCDR3 (SEQ ID NO:505)

Консенсус: Последовательность вариабельного участка легкой цепи (SEQ ID NO:582); LCDR1 (SEQ ID NO:503); LCDR2 (SEQ ID NO:504); LCDR3 (SEQ ID NO:584)

8A1: 1-DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA
8A3: 1-DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA
11F1: 1-DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA
Консенсус: 1-DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA

8A1: SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGTKVEIK-112 (SEQ ID NO:485)
8A3: SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGTKVEIK-112 (SEQ ID NO:461)
11F1: SGVPDRFSGSGSGTHLTLKISRVEAEDVGVYYCMQTLQTPLTFGGGTKVEIK-112 (SEQ ID NO:465)
Консенсус: SGVPDRFSGSGSGTX$_1$X$_2$TLKISRVEAEDVGVYYCMQX$_3$LQTPLTFGGGTKVEIK-112 (SEQ ID NO:582)

X_1 представляет собой H или D; X_2 представляет собой F или L; X_3 представляет собой T или A

Фиг. 48A

Сравнение последовательностей вариабельного участка тяжелой цепи и консенсусная последовательность (HCDR1, HCDR2 и HCDR3 подчеркнуты):

8A1: Последовательность вариабельного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO:459); HCDR1 (SEQ ID NO:513); HCDR2 (SEQ ID NO:528); HCDR3 (SEQ ID NO:534)

8A3: Последовательность вариабельного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO:461); HCDR1 (SEQ ID NO:)); HCDR2 (SEQ ID NO:501); HCDR3 (SEQ ID NO:502)

11F1: Последовательность вариабельного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO:463); HCDR1 (SEQ ID NO:)); HCDR2 (SEQ ID NO:501); HCDR3 (SEQ ID NO:502)

Консенсус: Последовательность вариабельного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO:583); HCDR1 (SEQ ID NO:585); HCDR2 (SEQ ID NO:586); HCDR3 (SEQ ID NO:587)

8A3: 1-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVASIKQDGSEKYY
11F1: 1-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVASIKQDGSEKYY
8A1: 1-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVASIKQDGSERYY
Консенсус: 1-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSX$_1$YWMX$_2$WVRQAPGKGLEWVASIKQDGSEX$_3$YY

8A3: 61-VDSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVLMVYDIDYYYYGMDVW
11F1: 61-VDSVKGRFAISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVLMVYDIDYYYYGMDVW
8A1: 61-VDSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPLVLMVYALHYYYYGMDVW
Консенсус: 61-VDSVKGRFX$_4$ISRDX$_5$AX$_6$NSLX$_7$LQMNSLRAEDTAVYYCARX$_8$LVLMVYX$_9$X$_{10}$X$_{11}$YYYYGMDVW

8A3: GQGTTVTVSS-127 (SEQ ID NO:459)
11F1: GQGTTVTVSS-127 (SEQ ID NO:463)
8A1: GHGTTVTVSS-127 (SEQ ID NO:483)
Консенсус: GX$_{12}$GTTVTVSS-127 (SEQ ID NO:583)

X_1 представляет собой S или N; X_2 представляет собой S или T; X_3 представляет собой K или R; X_4 представляет собой A или T; X_5 представляет собой N или T; X_6 представляет собой K или R; X_7 представляет собой Y или F; X_8 представляет собой D или P; X_9 представляет собой D или A; X_{10} представляет собой I или L; X_{11} представляет собой D или H; и X_{12} представляет собой Q или H

Фиг. 48B