

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202293510** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.03.22

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

(22) Дата подачи заявки  
2021.05.27

(54) **ИНГИБИТОРЫ PCSK9 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С ХОЛЕСТЕРИНОМ НАРУШЕНИЙ**

(31) 63/032,451

(32) 2020.05.29

(33) US

(86) PCT/US2021/034489

(87) WO 2021/243002 2021.12.02

(71) Заявитель:  
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

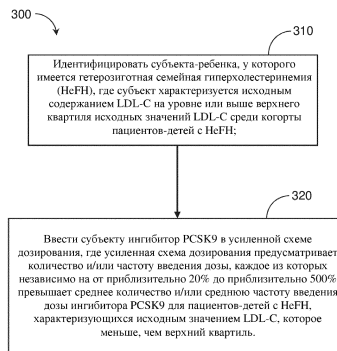
(72) Изобретатель:

**Хэймер Эндрю У., Бриджес Иэн  
Мэттью, Ван Хуэй, Руцца Андреа,  
Куртц Кристофер (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Предусмотрены способы снижения содержания холестерина LDL у субъекта-ребенка, у которого имеется связанное с холестерином нарушение, например гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), посредством введения ингибитора PCSK9.



202293510

A1

A1

202293510

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576582EA/032

### ИНГИБИТОРЫ PCSK9 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С ХОЛЕСТЕРИНОМ НАРУШЕНИЙ

Ссылка на родственные заявки

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/032451, поданной 29 мая 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0002]** Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронной форме. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием ARMOL025WO.txt, созданного 5 марта 2021 г., размер которого составляет 149410 байт. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки изобретения

Область изобретения

**[0003]** Настоящее изобретение относится к ингибиторам пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9) и к средствам терапии, нацеленным на PCSK9, для лечения связанных с холестерином нарушений, таких как гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH).

Сущность изобретения

**[0004]** В данном документе предусмотрен способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, включающий идентификацию субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше; и введение субъекту антитела к PCSK9 в дозе от приблизительно 350 до приблизительно 500 мг, вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается. Необязательно исходное содержание LDL-C составляет от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 550 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления исходное содержание LDL-C составляет 208 мг/дл или больше. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, от приблизительно 30% до приблизительно 50%, от приблизительно 20% до приблизительно 50%, от приблизительно 20% до приблизительно 80%, от приблизительно 30% до приблизительно 50% или от приблизительно 30% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на от приблизительно 30% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят с интервалом от каждых двух недель до каждых четырех недель, каждые две недели или каждые четыре недели. Если в данном документе явно не указано

иное, термины "каждые четыре недели", "ежемесячно" и "QM" в данном документе будут взаимозаменяемыми. Таким образом, введение "каждые четыре недели" будет включать введение "ежемесячно" и "QM". В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят каждые четыре недели, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 20%. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят каждые две недели, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%.

**[0005]** В данном документе также предусмотрен способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, включающий идентификацию субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL, составляющим приблизительно 210 мг/дл или меньше; и введение субъекту антитела к PCSK9 в дозе от приблизительно 350 до приблизительно 500 мг, вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 40%. Необязательно исходное содержание LDL-C составляет менее 208 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, от приблизительно 40% до приблизительно 60%, от приблизительно 40% до приблизительно 80%, от приблизительно 50% до приблизительно 60% или от приблизительно 50% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 45%. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят с интервалом от каждых двух недель до каждых четырех недель, каждые две недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят каждые четыре недели, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 40%. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят каждые две недели, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 50%.

**[0006]** В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VH эволюкумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична VH эволюкумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к

PCSK9 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VH эволюкумаба; вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VL эволюкумаба. Необязательно антитело к PCSK9 представляет собой эволюкумаб.

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления доза составляет приблизительно 420 мг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет приблизительно 490 мг.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере неделе 20 введения антитела к PCSK9.

**[0009]** В данном документе предусмотрен способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, включающий идентификацию субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; и введение субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, где усиленная схема дозирования предусматривает количество и/или частоту введения дозы, которые независимо друг от друга на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышают среднее количество и/или среднюю частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, за счет чего содержание LDL-C у субъекта снижается. Необязательно количество ингибитора PCSK9 на от приблизительно 5% до приблизительно 100% превышает среднее количество. В некоторых вариантах осуществления частота введения дозы ингибитора PCSK9 на от приблизительно 15% до приблизительно 400% превышает среднюю частоту введения дозы. В некоторых вариантах осуществления средняя частота введения дозы представляет собой частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты. В некоторых вариантах осуществления среднее количество представляет собой количество ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C в когорте. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на от приблизительно 30% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления снижение содержания LDL-C у субъекта составляет по меньшей мере 70% от среднего снижения содержания LDL-C, достигнутого у пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, и получающих ингибитор PCSK9 при средней частоте введения. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере

неделе 20 введения ингибитора PCSK9.

**[0010]** Также предусмотрен способ лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, включающий идентификацию субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении HeFH или ее симптомов, где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; и введение субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов, где усиленная схема дозирования предусматривает введение ингибитора PCSK9 в средней дозе, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает эталонную среднюю дозу ингибитора PCSK9 для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля. Необязательно эталонная средняя доза представляет собой дозу ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает повышение частоты введения дозы и/или количества ингибитора PCSK9, вводимого субъекту. В некоторых вариантах осуществления верхний квартиль находится в диапазоне от приблизительно 190 мг/дл до приблизительно 220 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления верхняя квартиль составляет приблизительно 200 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления исходное содержание LDL-C у субъекта составляет приблизительно 200 мг/дл или больше. В некоторых вариантах осуществления исходное содержание LDL-C составляет от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 550 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления исходное содержание LDL-C составляет 208 мг/дл или больше. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 одобрен государственным регулирующим органом для снижения уровней холестерина LDL в сыворотке крови у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления средняя частота введения дозы представляет собой частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой антитело, низкомолекулярный ингибитор или ингибирующую нуклеиновую кислоту. Необязательно ингибитор PCSK9 представляет собой антитело к PCSK9, siRNA или shRNA. Необязательно ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволокумаба, алирокумаба, бокоцизумаба, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, REGN728, LY3015014, 1B20, инклизирана, ISIS 394814, ALN-PCS02, SX-PCSK9 и BMS-962476. В некоторых вариантах осуществления средняя частота введения дозы находится в диапазоне от приблизительно одного раза каждые 2 недели до приблизительно одного раза каждые 12 недель. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение квартилей исходных значений LDL-C в когорте. В некоторых вариантах осуществления когорта содержит по

меньшей мере 25 пациентов-детей с HeFH. В некоторых вариантах осуществления исходные значения LDL-C среди когорты составляют по меньшей мере 130 мг/дл.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение исходного содержания LDL-C у субъекта. В некоторых вариантах осуществления идентификация включает диагностику и/или генотипирование субъекта в отношении HeFH. В некоторых вариантах осуществления идентификация включает диагностику и/или генотипирование пациента в отношении сложной формы HeFH.

**[0012]** В данном документе также предусмотрен способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, включающий введение субъекту-ребенку ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, где у субъекта имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH) или ее симптомы, где усиленная схема дозирования ингибитора PCSK9 предусматривает количество ингибитора PCSK9, которое на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднее количество стандарта лечения для взрослых, у которых имеется HeFH, и/или частоту введения дозы ингибитора PCSK9, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднюю частоту стандарта лечения для взрослых, у которых имеется HeFH, за счет чего уровень LDL-C у субъекта снижается. Необязательно усиленная схема дозирования приводит к снижению содержания LDL-C у субъекта на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования приводит к снижению содержания LDL-C у субъекта на 30-80%. В некоторых вариантах осуществления количество ингибитора PCSK9 повышено на от приблизительно 5% до приблизительно 100% по сравнению с количеством для стандарта лечения. В некоторых вариантах осуществления частота введения дозы ингибитора PCSK9 повышена на от приблизительно 15% до приблизительно 400% по сравнению с частотой введения дозы стандарта лечения. В некоторых вариантах осуществления усиленную схему дозирования продолжают до тех пор, пока не будет достигнута терапевтически приемлемая конечная точка для HeFH. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 одобрен государственным регулирующим органом для снижения содержания LDL-C у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления частота введения дозы стандарта лечения составляет от одного раза каждые 2 недели до одного раза каждые 12 недель. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой антитело к PCSK9. Необязательно антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную VH эволюкумаба; переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба; и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 представляет собой эволюкумаб.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления количество стандарта лечения

составляет от 400 до 500 мг/доза. В некоторых вариантах осуществления количество и/или частота стандарта лечения составляет приблизительно 420 мг/месяц.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере неделе 20 введения ингибитора PCSK9.

**[0015]** В данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, включающий идентификацию субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении HeFH или ее симптомов, и введение субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов, где усиленная схема дозирования предусматривает введение ингибитора PCSK9 в средней дозе, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднюю дозу стандарта лечения ингибитором PCSK9 для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у взрослого пациента. Необязательно усиленная схема дозирования предусматривает более высокую частоту введения дозы ингибитора PCSK9, чем частота введения дозы стандарта лечения. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает более высокое количество ингибитора PCSK9, чем количество стандарта лечения. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой антитело, низкомолекулярный ингибитор или ингибирующую нуклеиновую кислоту. Необязательно ингибитор PCSK9 представляет собой антитело к PCSK9. Необязательно ингибитор PCSK9 представляет собой siRNA или shRNA. Необязательно ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволокумаба, алирокумаба, бокоцизумаба, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, инклизирана, ISIS 394814, SX-PCSK9 и BMS-962476.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту одного или нескольких других средств терапии для снижения содержания холестерина LDL. Необязательно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL предусматривает статин, фибрат, секвестрант желчных кислот, ниацин, антиагрегант, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, антагонист рецептора ангиотензина II, ингибитор ацил-КоА-холестерин-ацетилтрансферазы (ACAT), ингибитор всасывания холестерина, ингибитор белка-переносчика сложного эфира холестерина (СЕТР), ингибитор микросомального белка-переносчика триглицеридов (МТТР), модулятор холестерина, модулятор желчных кислот, агонист рецептора активации пролиферации пероксисом (PPAR), средство на основе генной терапии, составное средство для защиты сосудов, ингибитор гликопротеина Пб/Ша, аспирин или аспириноподобное соединение, ингибитор ИВ АТ, ингибитор скваленсинтазы или ингибитор хемоаттрактантного белка моноцитов (MCP)-I.

**[0017]** Также предусмотрен способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, включающий введение субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH, где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше, антитела к PCSK9 с частотой

введения дозы, составляющей приблизительно один раз в месяц и в количестве от приблизительно 400 мг до приблизительно 450 мг; по меньшей мере одного статина и по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, который отличается от антитела к PCSK9, и по меньшей мере одного статина, вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%. Необязательно антитело к PCSK9 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную VH эволюкумаба; вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба; и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную VL эволюкумаба. Необязательно антитело к PCSK9 представляет собой эволюкумаб. В некоторых вариантах осуществления количество составляет приблизительно 420 мг.

**[0018]** В данном документе также предусмотрен способ лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, включающий введение субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH и исходное содержание холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, ингибитора PCSK9; по меньшей мере одного статина и по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которое отличается от ингибитора PCSK9 и по меньшей мере одного статина, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или его симптомов, где ингибитор PCSK9 вводят в соответствии со схемой дозирования ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля. Необязательно верхний квартиль находится в диапазоне от приблизительно 190 мг/дл до приблизительно 220 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления исходное содержание LDL-C составляет приблизительно 200 мг/дл или больше. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 вводят в соответствии со схемой дозирования ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты.

**[0019]** В данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, включающий введение субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH, ингибитора PCSK9, где ингибитор PCSK9 вводят в соответствии со схемой дозирования стандарта лечения для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у взрослого пациента; по меньшей мере одного статина; по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которое отличается от ингибитора PCSK9 и по меньшей мере одного статина, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов. Необязательно по меньшей мере одно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL вводят в соответствии с усиленной схемой дозирования,



предусматривающей среднюю дозу по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднюю дозу стандарта лечения по меньшей мере одним другим средством терапии для снижения содержания холестерина LDL для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у пациента-ребенка. Необязательно схема усиленного дозирования предусматривает повышение частоты введения дозы и/или повышение количества ингибитора PCSK9.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой антитело, низкомолекулярный ингибитор или ингибирующую нуклеиновую кислоту. Необязательно ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволюкумаба, алирокумаба, бокоцизумаба, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, REGN728, LY3015014, 1B20, инклизирана, ISIS 394814, SX-PCSK9 и BMS-962476. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL предусматривает второй ингибитор PCSK9. Необязательно второй ингибитор PCSK9 представляет собой низкомолекулярный ингибитор или ингибирующую нуклеиновую кислоту. Необязательно второй ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволюкумаба, алирокумаба, бокоцизумаба, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, REGN728, LY3015014, 1B20, инклизирана, ISIS 394814, SX-PCSK9 и BMS-962476.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL предусматривает статин, фибрат, секвестрант желчных кислот, ниацин, антиагрегант, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, антагонист рецептора ангиотензина II, ингибитор ацил-КоА-холестерин-ацетилтрансферазы (ACAT), ингибитор всасывания холестерина, ингибитор белка-переносчика сложного эфира холестерина (СЕТР), ингибитор микросомального белка-переносчика триглицеридов (МТТР), модулятор холестерина, модулятор желчных кислот, агонист рецептора активации пролиферации пероксисом (PPAR), средство на основе генной терапии, составное средство для защиты сосудов, ингибитор гликопротеина IIb/IIIa, аспирин или аспириноподобное соединение, ингибитор IB AT, ингибитор скваленсинтазы или ингибитор хемоаттрактантного белка моноцитов (MCP)-I.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет 17 лет или младше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет от 10 до 17 лет. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется сложная форма HeFH. В некоторых вариантах осуществления субъект получает по меньшей мере одно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 или антитело к PCSK9 вводят подкожно или внутривенно.

**[0023]** В данном документе предусмотрен набор для лечения субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении гетерозиготной семейной

гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, содержащий лекарственную форму, содержащую ингибитор PCSK9 в количестве, достаточном для введения ингибитора PCSK9 субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH, в усиленной схеме дозирования, предусматривающей введение субъекту ингибитора PCSK9 с частотой введения дозы, которая в по меньшей мере 2 раза превышает среднюю частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля. Необязательно средняя частота введения дозы представляет собой частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты.

**[0024]** Также предусмотрен набор для лечения субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, содержащий лекарственную форму, содержащую ингибитор PCSK9 в количестве, достаточном для введения ингибитора PCSK9 субъекту-ребенку, в усиленной схеме дозирования, предусматривающей введение субъекту ингибитора PCSK9 в дозировке, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает дозировку стандарта лечения ингибитором PCSK9 для лечения или предупреждения связанного с холестерином нарушения у взрослого пациента с HeFH.

**[0025]** В данном документе также предусмотрен способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови, включающий введение субъекту ингибитора PCSK9, где у субъекта имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия, где субъект представляет собой субъекта-ребенка, где ингибитор PCSK9 вводят в количестве, которое по меньшей мере так же эффективно, как 420 мг эволокумаба, где ингибитор PCSK9 вводят с частотой, составляющей каждые две недели или больше, за счет чего содержание LDL-C у субъекта снижается на более чем 30%.

**[0026]** В данном документе предусмотрен способ снижения холестерина LDL в сыворотке крови (LDL-C) у субъекта, включающий идентификацию субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; и введение субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, где усиленная схема дозирования предусматривает частоту и/или количество введения дозы, которые на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышают среднюю частоту введения дозы и/или среднее количество в утвержденной государственным регулирующим органом этикетке для ингибитора PCSK9, за счет чего содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%. Необязательно усиленная схема дозирования предусматривает частоту введения дозы, которая в по меньшей мере 2 раза превышает среднюю частоту введения дозы.

**[0027]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволокумаба, алирокумаба, бокоциумаба, 1D05-IgG2, RG-7652,

LGT209, REGN728, LY3015014, 1B20, инклисирана, ISIS 394814, ALN-PCSK02, SX-PCSK9 и BMS-962476.

Краткое описание графических материалов

**[0028]** На фиг. 1 показана схематическая диаграмма дизайна исследования эволюумаба для снижения содержания холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) у субъектов-детей с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (HeFH).

**[0029]** На фиг. 2A и 2B показаны схематические диаграммы способов снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

**[0030]** На фиг. 3 показана схематическая диаграмма способа снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

**[0031]** На фиг. 4 показана схематическая диаграмма способа лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

**[0032]** На фиг. 5 показана схематическая диаграмма способа снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

**[0033]** На фиг. 6 показана схематическая диаграмма способа лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

**[0034]** На фиг. 7 показана схематическая диаграмма способа снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

**[0035]** На фиг. 8 показана схематическая диаграмма способа лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

**[0036]** На фиг. 9 показана схематическая диаграмма способа лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

**[0037]** На фиг. 10A и 10B показаны аминокислотные последовательности зрелой формы PCSK9 с подчеркнутым продоменом.

**[0038]** На фиг. 11 показаны последовательности нуклеиновых кислот PCSK9 человека, при этом последовательность, кодирующая сигнальную последовательность, выделена жирным шрифтом.

**[0039]** На фиг. 12 показана аминокислота PCSK9 человека с подчеркнутым

продоменом и сигнальной последовательностью, выделенной жирным шрифтом.

**[0040]** На фиг. 13 показаны аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты PCSK9 человека с подчеркнутым продоменом и сигнальной последовательностью, выделенной жирным шрифтом.

**[0041]** На фиг. 14 показаны некоторые аспекты последовательности некоторых вариантов осуществления ингибиторов PCSK9.

**[0042]** На фиг. 15A и 15B показаны некоторые аспекты последовательности некоторых вариантов осуществления ингибиторов PCSK9. Выделенные области обозначают переменные области.

**[0043]** На фиг. 16 показаны некоторые аспекты последовательности некоторых вариантов осуществления ингибиторов PCSK9.

**[0044]** На фиг. 17 показаны некоторые аспекты последовательности некоторых вариантов осуществления ингибиторов PCSK9.

**[0045]** На фиг. 18 показаны некоторые аспекты последовательности некоторых вариантов осуществления ингибиторов PCSK9.

**[0046]** На фиг. 19 показаны некоторые аспекты последовательности некоторых вариантов осуществления ингибиторов PCSK9.

**[0047]** На фиг. 20 показаны некоторые аспекты последовательности константных доменов некоторых вариантов осуществления ингибиторов PCSK9.

Подробное описание

**[0048]** Предусмотрены способы лечения субъекта, например, субъекта-ребенка, у которого имеется связанное с холестерином заболевание, например, семейная гиперхолестеринемия (FH), такая как гетерозиготная FH (HeFH), с применением ингибитора PCSK9. Как раскрыто в данном документе, эффективность ингибитора PCSK9 для лечения или предупреждения связанного с холестерином нарушения, например HeFH, может зависеть от множества факторов, таких как возраст субъекта, тяжесть нарушения у субъекта, измеренная с помощью исходных уровней холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови и/или генотипа субъекта. Например, HeFH может предусматривать сложную форму гетерозиготной FH, которая может быть относительно тяжелой по сравнению с гетерозиготами, содержащими аллель дикого типа рассматриваемого гена. Среди когорты пациентов-детей с HeFH исходное содержание LDL-C у каждого пациента может варьироваться. Не ограничиваясь какой-либо теорией, что согласуется с результатами, представленными в данном документе, ответ на средство терапии, представляющее собой ингибитора PCSK9, например, на средство терапии, представляющее собой антитело к PCSK9, может быть притуплен, если у субъекта-ребенка с HeFH, получающего лечение, имеется более тяжелая форма связанного с холестерином нарушения, что находит отражение, например, в том, что исходный уровень LDL-C у субъекта находится на уровне или выше верхнего квартиля исходных уровней LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH. Как раскрыто в данном документе, снижение содержания LDL-C в ответ на средство терапии, представляющее собой

ингибитор PCSK9, у субъекта-ребенка с HeFH, характеризующегося исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше, например, исходным содержанием LDL-C, составляющим 208 мг/дл или больше, может быть ослаблено по сравнению со снижением, достигаемым за счет того же средства терапии, представляющего собой ингибитор PCSK9, у пациента-ребенка с HeFH, характеризующегося исходным содержанием LDL-C ниже приблизительно 200 мг/дл, например, исходным содержанием LDL-C ниже 208 мг/дл. Субъект-ребенок с HeFH, у которого имеется тяжелая форма HeFH, например, характеризующийся исходным содержанием LDL-C на уровне или выше верхнего квартиля, может получить пользу от усиленной схемы дозирования для компенсации притупленного ответа на средство терапии, представляющее собой ингибитор PCSK9. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования включает повышенную частоту и/или величину дозы введения по сравнению с частотой и/или величиной дозы введения в схеме дозирования для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным содержанием LDL-C, которое меньше верхнего квартиля.

**[0049]** Термин "пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9" или "PCSK9" относится к полипептиду, представленному под SEQ ID NO: 1, 2, 4 и/или 6 на фиг. 10A, 10B, 12 и 13. "PCSK9" также упоминается как FH3, NARC1, HCHOLA3, пропротеиновая конвертаза субтилизин/кексинового типа 9 и конвертаза 1, регулирующая апоптоз нейронов. Ген PCSK9 кодирует белок пропротеиновой конвертазы, который принадлежит к подсемейству протеиназ К семейства секреторных субтилаз. Термин "PCSK9" обозначает как пробелок, так и продукт, образующийся после автокатализа пробелка. Если упоминается только автокатализированный продукт (как, например, для антитела, которое селективно связывается с расщепленным PCSK9), белок может называться "зрелым", "расщепленным", "процессированным" или "активным" PCSK9. Если упоминается только неактивная форма, белок может называться "неактивной", "формой-предшественником" или "непроцессированной" формой PCSK9.

**[0050]** "Ингибитор PCSK9" обозначает молекулу или средство терапии, которое подавляет активность PCSK9, вследствие чего содержание LDL-C (и/или других липидов, таких как не-HDL-C, ApoB, Lp(a) и т. д.) снижается. Это может включать, например, нейтрализующие антитела к PCSK9 и антисмысловые молекулы к PCSK9. Средство терапии, представляющее собой ингибитор PCSK9, обозначает способ, в котором применяют средство, представляющее собой ингибитор PCSK9.

**[0051]** Термин "исходное содержание", используемый в данном документе в отношении содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови, относится к уровню LDL-C в сыворотке крови у субъекта, которому не вводили ингибитор PCSK9 для лечения связанного с холестерином нарушения, например HeFH, или для предупреждения его симптомов. Обычно исходный уровень представляет собой содержание LDL-C натощак. В некоторых вариантах осуществления субъект получает средство терапии, снижающее содержание LDL-C, (отличное от ингибитора PCSK9), такое как статин, когда

устанавливают исходное содержание LDL-C.

**[0052]** "Медиана", используемая в данном документе в отношении уровней LDL-C в когорте пациентов, представляет собой значение LDL-C, отделяющее верхнюю половину от нижней половины всех уровней LDL-C в когорте. Половина значений LDL-C в когорте находится ниже медианы, а половина находится выше. "Верхний квартиль" представляет собой значение LDL-C, отделяющее верхние 25% от наиболее низких 75% всех уровней LDL-C в когорте. "Нижний квартиль" представляет собой значение LDL-C, отделяющее нижние 25% от наиболее высоких 75% всех уровней LDL-C в когорте.

**[0053]** "Стандарт лечения", используемый в данном документе, имеет свое обычное и общепотребительное значение, понятное специалисту в данной области техники, в свете настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления стандарт лечения включает рекомендации по проведению курса мероприятий, например, введению терапевтического средства для лечения нарушения, которые обычно признаются практикующими врачами безопасными и эффективными для достижения намеченной цели. В некоторых вариантах осуществления стандарт лечения включает одобренное правительством руководство по применению терапевтического средства для лечения пациента. В некоторых вариантах осуществления стандарт лечения включает руководство, принятое государственным регулирующим органом (например, Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) или Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA)). В некоторых вариантах осуществления стандарт лечения для терапевтического средства применяется к конкретной популяции пациентов, например, к взрослым пациентам.

**[0054]** "Государственный регулирующий орган", используемый в данном документе, относится к национальной, международной или местной правительственной организации, которой поручено одобрение средств терапии для лечения заболевания или нарушения у пациентов, например, у пациентов-людей. Подходящие государственные регулирующие органы включают без ограничения FDA, Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA), Агентство фармацевтических препаратов и медицинских устройств (Япония), Национальное управление по изделиям медицинского назначения (Китай), Министерство здравоохранения Канады, Агентство по регулированию лекарственных средств и изделий медицинского назначения (Великобритания), Центральную организацию по контролю за стандартами лекарственных средств (Индия) и Администрацию лекарственных средств (Австралия).

**[0055]** "Антитело" относится к иммуноглобулину любого изотипа и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и моноклональные антитела. "Антитело" само по себе представляет собой разновидность антигенсвязывающего белка. Например, человеческие антитела могут относиться к любому изотипу, включая IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE. Обычно человеческое антитело изотипа IgG будет содержать две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи.

Антитела могут быть получены исключительно из одного источника или могут быть "химерными", то есть разные части антитела могут быть получены из двух или более разных антител от одного и того же или разных видов. В целях иллюстрации белок PCSK9 (например, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 6) или его фрагмент являются примером антигена для антитела к PCSK9. Канонический иммуноглобулин представляет собой тетрамерную молекулу, при этом каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает варибельную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, в первую очередь отвечающих за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, которая в первую очередь отвечает за эффекторную функцию.

**[0056]** В качестве примера, антитела, имеющие замены, вставки или делеции 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков на N-конце и/или C-конце тяжелой и/или легкой цепей, включены в определение при условии, что антитела сохраняют такое же или аналогичное связывание и/или функцию, что и антитела, содержащие две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи.

**[0057]** В данном документе также описаны антигенсвязывающие белки, которые связываются с PCSK9. Антигенсвязывающий белок может содержать фрагмент антитела к PCSK9, в основном состоять из него или состоять из него. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, направленный на PCSK9, может быть заменен на антитело к PCSK9, описанное в данном документе. Антигенсвязывающие белки могут включать фрагменты антител (например, антигенсвязывающий фрагмент антитела), производные антител и аналоги антител. Дополнительные конкретные примеры включают без ограничения одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), нанотело (например, домен VH тяжелой цепи верблюжьих антител; VHH-фрагмент, см. Cortez-Retamozo et al., *Cancer Research*, Vol. 64:2853-57, 2004), Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fv-фрагмент, Fd-фрагмент и фрагмент определяющей комплементарности области (CDR). Эти молекулы могут быть получены из любого источника, представляющего собой млекопитающее, такое как человек, мышь, крыса, кролик или свинья, собака или верблюд. Фрагменты антител могут конкурировать за связывание целевого антигена с интактным антителом, и фрагменты могут быть получены посредством модификации интактных антител (например, ферментативного или химического расщепления) или синтезированы *de novo* с применением технологий рекомбинантной ДНК или пептидного синтеза. Антитело может содержать, например, альтернативный белковый остов или искусственный остов с привитыми CDR или производными CDR. Такие остовы включают без ограничения остовы, полученные из антител, содержащие мутации, введенные, например, для стабилизации трехмерной структуры антигенсвязывающего белка, а также полностью синтетические остовы, содержащие, например, биосовместимый полимер. См., например, Korndorfer et al., 2003,

Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129 (2003); Roque et al., *Biotechnol. Prog.* 20:639-654 (2004). Кроме того, можно применять пептидные миметики антител ("PAM"), а также остовы на основе миметиков антител, в которых в качестве остова используются фибронектиновые компоненты. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит по меньшей мере одну CDR из антитела, которое связывается с антигеном, и в некоторых вариантах осуществления содержит CDR3 тяжелой цепи из антитела, которое связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит все три CDR из тяжелой цепи антитела, которое связывается с антигеном, или из легкой цепи антитела, которое связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит все шесть CDR из антитела, которое связывается с антигеном (три из тяжелой цепи и три из легкой цепи). Антигенсвязывающий фрагмент в определенных вариантах осуществления представляет собой фрагмент антитела.

**[0058]** Антигенсвязывающий белок также может включать белок, содержащий один или несколько фрагментов антитела, включенных в одну полипептидную цепь или в несколько полипептидных цепей. Например, антигенсвязывающий белок может включать без ограничения диатело (см., например, EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90:6444-6448, 1993); интратело; доменное антитело (одиночный домен VL или VH или два или более доменов VH, соединенных с помощью пептидного линкера; см. Ward et al., *Nature*, Vol. 341:544-546, 1989); макситело (2 scFv, слитых с Fc-областью, см. Fredericks et al., *Protein Engineering, Design & Selection*, Vol. 17:95-106, 2004 и Powers et al., *Journal of Immunological Methods*, Vol. 251:123-135, 2001); триатело; тетратело; минитело (scFv, слитый с доменом CH3; см. Olafsen et al., *Protein Eng Des Sel.*, Vol.17:315-23, 2004); пептитело (один или несколько пептидов, присоединенных к Fc-области, см. WO 00/24782); линейное антитело (пара тандемных сегментов Fd (VH-CH1-VH-CH1), которые совместно с полипептидами комплементарных легких цепей образуют пару антигенсвязывающих областей, см. Zapata et al., *Protein Eng.*, Vol. 8:1057-1062, 1995); небольшое модульное иммунофармацевтическое средство (см. публикацию заявки на патент США № 20030133939) и белки, слитые с иммуноглобулинами (например, IgG-scFv, IgG-Fab, 2scFv-IgG, 4scFv-IgG, VH-IgG, IgG-VH и Fab-scFv-Fc).

**[0059]** В пределах легких и тяжелых цепей переменные (V) и константные (C) области соединены областью "J" размером приблизительно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также содержит область "D", состоящую из приблизительно 10 или более аминокислот. См. в целом *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включена посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей). Переменные области каждой пары легкая/тяжелая цепь образуют сайт связывания антитела, так что интактный иммуноглобулин имеет два сайта связывания.

**[0060]** Цепи иммуноглобулина проявляют одинаковую общую структуру из относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя



гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями или CDR. От N-конца к С-концу как легкие, так и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

**[0061]** Человеческие легкие цепи классифицируются как легкие каппа- и лямбда-цепи. Термин "легкая цепь" относится к полипептиду, содержащему от аминоконца к карбоксильному концу одну вариабельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина и один константный домен легкой цепи (CL) иммуноглобулина. Тяжелые цепи классифицируют как мю- ( $\mu$ ), дельта- ( $\Delta$ ), гамма- ( $\gamma$ ), альфа- ( $\alpha$ ) и эpsilon- ( $\epsilon$ ) цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. Термин "тяжелая цепь" относится к полипептиду, содержащему от аминоконца к карбоксильному концу одну вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, константный домен 1 тяжелой цепи (CH1) иммуноглобулина, шарнирную область иммуноглобулина, константный домен 2 тяжелой цепи (CH2) иммуноглобулина, константный домен 3 тяжелой цепи (CH3) иммуноглобулина и необязательно константный домен 4 тяжелой цепи (CH4) иммуноглобулина. Класс IgG дополнительно делится на подклассы, а именно, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Класс IgA дополнительно делится на подклассы, а именно IgA1 и IgA2. IgM имеет подклассы, включая без ограничения IgM1 и IgM2. Тяжелые цепи в антителах изотипа IgG, IgA и IgD содержат три домена (CH1, CH2 и CH3), тогда как тяжелые цепи в антителах изотипа IgM и IgE содержат четыре домена (CH1, CH2, CH3 и CH4). Константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина могут происходить из иммуноглобулина любого изотипа, включая подтипы. Цепи антитела связаны друг с другом посредством межполипептидных дисульфидных связей между доменом CL и доменом CH1 (т. е. между легкой и тяжелой цепью) и между шарнирными областями тяжелых цепей антитела.

**[0062]** "Поликлональное антитело" относится к популяции антител, которые, как правило, очень изменчивы по составу и специфичности связывания. "Моноклональное антитело" ("mAb"), используемое в данном документе, относится к одной или нескольким популяциям антител, имеющих идентичные последовательности. Моноклональные антитела связываются с антигеном в определенном эпитопе на антигене.

**[0063]** В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит по меньшей мере одну CDR, представленную на фиг. 14, 15A, 15B, 16, 17, 18 и/или 19. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела, представленные на фиг. 14, 15A, 15B, 16, 17, 18 и/или 19. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VH эволюкумаба; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VL, как представлено на фиг. 14, 15A, 15B, 16, 17, 18 и/или 19. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична VH эволюкумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична VL, как представлено на фиг. 14, 15A, 15B, 16, 17, 18 и/или 19.

**[0064]** Термин "CDR" относится к определяющей комплементарности области (также называемой "минимальными единицами распознавания" или "гиперпеременной областью") в пределах последовательностей переменных областей антитела. CDR позволяют антителу специфически связываться с конкретным представляющим интерес антигеном. Существуют три CDR переменной области тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3) и три CDR переменной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3). CDR в каждой из двух цепей, как правило, выравнены по каркасным областям с образованием структуры, которая специфически связывается с конкретным эпитопом или доменом на целевом белке. Как правило, от N-конца к C-концу встречающиеся в природе переменные области как легкой, так и тяжелой цепей соответствуют следующему порядку этих элементов: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Была разработана система нумерации 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 и 1991, NIH, Bethesda, MD) или Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883. С помощью этой системы можно идентифицировать определяющие комплементарности области (CDR) и каркасные области (FR) данного антитела. Другие системы нумерации аминокислот в цепях иммуноглобулина включают IMGT<sup>®</sup> (Международная информационная система ImMunoGeneTics; Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 29:185-203; 2005) и АНо (Honegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309(3):657-670; 2001). Для получения антитела одна или несколько CDR могут быть включены в молекулу либо ковалентно, либо нековалентно.

**[0065]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению может включать CDR в виде части более длинной полипептидной цепи, может связывать ковалентной связью CDR с другой полипептидной цепью или может включать CDR нековалентно. Антигенсвязывающие белки могут содержать по меньшей мере одну из CDR, описанных в данном документе, включенных в биосовместимую каркасную структуру. В одном примере биосовместимая каркасная структура содержит полипептид или его часть, которые являются достаточными для образования конформационно стабильной структурной опоры, или каркаса, или остова, который способен представлять одну или несколько последовательностей из аминокислот, которые связываются с антигеном (например, CDR, переменную область и т. д.) в локализованной области поверхности. Такие структуры могут представлять собой встречающийся в природе полипептид или полипептидную "складку" (структурный мотив) или могут иметь одну или несколько модификаций, таких как добавления, делеции или замены аминокислот, относительно встречающегося в природе полипептида или

складки. Эти остовы могут быть получены из полипептида любого вида (или более чем одного вида), такого как человек, другое млекопитающее, другое позвоночное, беспозвоночное, растение, бактерии или вирус.

**[0066]** Как правило, биосовместимые каркасные структуры основаны на белковых каркасах или скелетах, отличных от доменов иммуноглобулина. Например, можно использовать те, которые основаны на фибронектине, анкирине, липокаLINE, неокарзинокрасителе, цитохроме b, белке типа цинкового пальца CP1, PST1, суперспирали, LACI-D1, домене Z и доменах тендамистата (см., например, Nygren and Uhlen, 1997, *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 463-469).

**[0067]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое антитело. Способы получения биспецифических антител известны из уровня техники. Один такой способ получения "биспецифического" или "бифункционального" антигенсвязывающего белка или антитела предусматривает слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553. Другой способ предусматривает конструирование Fc-части тяжелых цепей, например, чтобы создать "выступы" и "впадины", которые способствуют образованию гетеродимеров из тяжелых цепей при совместной экспрессии в клетке. U.S. 7695963. Еще один способ также предусматривает конструирование Fc-части тяжелой цепи, но с применением электростатической координации для стимуляции образования гетеродимера, в то же время препятствуя образованию гомодимера из тяжелых цепей при совместной экспрессии в клетке. WO 09/089004, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0068]** Термин "человеческое антитело" включает антитела с областями антитела, такими как переменные и константные области или домены, которые по сути соответствуют последовательностям иммуноглобулина зародышевой линии человека, известным из уровня техники, включающим, например, описанные в Kabat et al. (1991) (loc. cit.). Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные за счет случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или за счет соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Человеческие антитела могут содержать до одного, двух, трех, четырех, пяти или более положений, замещенных аминокислотным остатком, который не кодируется последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека. Определение человеческих антител, используемое в данном документе, также предусматривает полностью человеческие антитела, которые включают только неискусственные и/или генетически измененные человеческие последовательности антител, которые могут быть получены с использованием технологий или систем, известных из уровня техники, таких как, например, технология фагового дисплея или технология трансгенных мышей, включая без ограничения Xenomouse.

**[0069]** Гуманизированное антитело имеет последовательность, которая отличается от последовательности антитела, полученного от отличного от человека вида, одной или несколькими аминокислотными заменами, делециями и/или добавлениями, так что гуманизированное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее выраженный иммунный ответ по сравнению с антителом отличного от человека вида при его введении субъекту-человеку. В одном варианте осуществления определенные аминокислоты в каркасных и константных доменах тяжелой и/или легкой цепей антитела отличного от человека вида подвергаются мутации с получением гуманизированного антитела. В другом варианте осуществления константный(-ые) домен(-ы) из человеческого антитела сливаются с переменным(-ыми) доменом(-ами) отличного от человека вида. В другом варианте осуществления один или несколько аминокислотных остатков в одной или нескольких последовательностях CDR отличного от человеческого антитела изменяют для снижения вероятной иммуногенности отличного от человеческого антитела при его введении субъекту-человеку, где измененные аминокислотные остатки либо не являются критическими для иммуноспецифического связывания антитела с его антигеном, либо изменения, вносимые в аминокислотную последовательность, представляют собой консервативные изменения, так что связывание гуманизированного антитела с антигеном не является значительно ухудшенным, чем связывание отличного от человеческого антитела с антигеном. Примеры получения гуманизированных антител можно найти в патентах США №№ 6054297, 5886152 и 5877293.

**[0070]** Термин "нейтрализующее антитело", или "ингибирующее антитело", или "антагонистическое антитело" относится к антителу, которое связывается с целевой молекулой и приводит к снижению и/или предупреждению биологического эффекта этой целевой молекулы. Это может быть выполнено, например, с помощью непосредственной блокировки сайта на целевой молекуле, посредством которого целевая молекула взаимодействует с другими молекулами (например, блокировки лиганд-связывающего сайта рецептора или блокировки рецептор-связывающего сайта на лиганде), или с помощью опосредованной блокировки сайта на целевой молекуле, посредством которого целевая молекула взаимодействует с другими молекулами (например, структурные или энергетические изменения в целевой молекуле). В некоторых вариантах осуществления эти термины могут также обозначать антитело, которое препятствует выполнению биологической функции целевой молекулой, с которой оно связано. При оценке связывания и/или специфичности антитела или его иммунологически функционального фрагмента антитело или фрагмент могут приводить по сути к ингибированию связывания целевой молекулы с ее партнером по связыванию, если избыток антитела приводит к снижению количества партнера по связыванию, связанного с целевой молекулой, на по меньшей мере приблизительно 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%, 99,5%, 99,9% и 100%. В некоторых вариантах осуществления ингибирование является полным. Измерение снижения

связывания выполняют с использованием различных анализов, известных специалистам в данной области техники (например, анализ конкурентного связывания *in vitro*), и проводят с использованием соответствующих контрольных молекул таким образом, чтобы измерить фактическое ингибирование. Например, из уровня техники хорошо известны многочисленные конкурентные анализы, неограничиваемыми примерами которых являются конкурентный ELISA, применение платформы ViaCore®, платформы Kinexa® и т. п. Другие примеры включают: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (МА), твердофазный прямой или непрямой иммуоферментный анализ (EIA), сэндвич-конкурентный анализ (см., например, Stahl et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см., например, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Press); твердофазный RIA с прямой меткой с использованием метки 1-125 (см., например, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой EIA с биотином и авидином (см., например, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552) и RIA с прямым мечением (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:7-82). Как правило, такой анализ предусматривает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих один из них, немеченого тестируемого антитела и меченого эталонного антитела. В случае антител к PCSK9 такая нейтрализующая молекула может приводить к снижению способности PCSK9 связывать LDLR со снижением уровней LDL-C (и/или других липидов, таких как не-HDL-C, ApoB, Lp(a) и т. д.). В некоторых вариантах осуществления нейтрализующую способность характеризуют и/или описывают с помощью конкурентного анализа. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующую способность описывают в виде значения IC<sub>50</sub> или EC<sub>50</sub>. В некоторых вариантах осуществления антитела обеспечивают нейтрализацию путем связывания с PCSK9 и предотвращения связывания PCSK9 с LDLR (или путем снижения способности PCSK9 связываться с LDLR). В некоторых вариантах осуществления антитела обеспечивают нейтрализацию путем связывания с PCSK9 и, хотя все еще позволяют PCSK9 связываться с LDLR, предотвращают или уменьшают опосредованное PCSK9 разрушение LDLR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело все еще может допускать связывание PCSK9/LDLR, но будет предотвращать (или уменьшать) последующее обусловленное PCSK9 разрушение LDLR. В некоторых вариантах осуществления нейтрализация приводит к снижению содержания LDL-C (и/или других липидов, таких как не-HDL-C, ApoB, Lp(a) и т. д.).

**[0071]** Считается, что антитело "специфически связывается" со своим целевым антигеном, если константа диссоциации ( $K_D$ ) составляет  $\leq 10^{-7}$  М. Антитело специфически связывает антиген с "высокой аффинностью", если  $K_D$  составляет  $\leq 5 \times 10^{-9}$  М, и с "очень высокой аффинностью", если  $K_D$  составляет  $\leq 5 \times 10^{-10}$  М. В одном варианте осуществления антитело характеризуется  $K_D \leq 10^{-9}$  М. В одном варианте осуществления

скорость диссоциации составляет  $<1 \times 10^{-5}$ . В других вариантах осуществления антитела будут связываться с PCSK9 человека с  $K_D$ , составляющей от приблизительно  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М, и в еще одном варианте осуществления антитела будут связываться с  $K_D \leq 5 \times 10^{-10}$ . Как будет понятно специалисту в данной области техники, в некоторых вариантах осуществления любое или все антитела могут специфически связываться с PCSK9.

**[0072]** Антитело является "селективным", когда оно связывается с одной мишенью более прочно, чем оно связывается со второй мишенью.

**[0073]** Термин "выделенный белок" означает, что рассматриваемый белок (1) не содержит по меньшей мере некоторых других белков, с которыми он обычно встречается, (2) в основном не содержит других белков из того же источника, например, от того же вида, (3) экспрессируется клеткой из другого вида, (4) был отделен от по меньшей мере приблизительно 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которыми он связан в природе, (5) функционально связан (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе, и/или (6) не встречается в природе. Как правило, "выделенный белок" составляет по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 25% или по меньшей мере приблизительно 50% данного образца. Такой выделенный белок может кодировать геномная ДНК, кДНК, мРНК или другая РНК синтетического происхождения или любая их комбинация. Предпочтительно выделенный белок по сути не содержит белки или полипептиды или другие контаминанты, которые находятся в его естественном окружении, которые будут мешать его терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или другому применению.

**[0074]** Термин "идентичность" относится к взаимосвязи между последовательностями двух или более полипептидных молекул или двух или более молекул нуклеиновых кислот, определенной путем выравнивания и сравнения последовательностей. "Процент идентичности" означает процент идентичных остатков аминокислот или нуклеотидов у сравниваемых молекул, и его рассчитывают на основании размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для этих расчетов гэпы в выравниваниях (если таковые имеются) предпочтительно учитываются с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т. е. "алгоритма"). Способы, которые можно применять для расчета идентичности выравниваемых нуклеиновых кислот или полипептидов, включают способы, 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; Carillo et al., 1988, *SIAM J. Applied Math.* 48:1073; и Altschul et al. (*J Mol Biol.* 1990 Oct. 5; 215(3):403-10).

**[0075]** При расчете процента идентичности сравниваемые последовательности, как правило, выравнивают способом, который дает наибольшее совпадение между последовательностями. Одним примером компьютерной программы, которую можно применять для определения процента идентичности, является пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, Университет штата Висконсин, Мэдисон, Висконсин, США). Компьютерный алгоритм GAP применяют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых должен быть определен процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для получения оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов ("охват совпадения", определяемый алгоритмом). Штраф за открытие гэпа (который рассчитывается как  $3 \times$  средняя диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднее значение диагонали применяемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой балл или число, присвоенное каждому полному аминокислотному совпадению в соответствии с определенной матрицей сравнения) и штраф за продление гэпа (который, как правило, составляет 1/10 долю от штрафа за открытие гэпа), а также матрицу сравнения, такую как PAM 120, PAM 250 или BLOSum 62, применяют в сочетании с алгоритмом. В определенных вариантах осуществления в этом алгоритме также применяется стандартная матрица сравнения (см. Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSum 62; Altschul, S. F. 1991, J Mol Biol. 1991 Jun 5; 219(3): 555-565 для матрицы сравнения PAM 120).

**[0076]** Как используется в данном документе, двадцать стандартных (например, встречающихся в природе) аминокислот и их сокращенные названия соответствуют общепринятой практике. См. Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), которая включена в данный документ посредством ссылки для любой цели. Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати стандартных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как  $\alpha$ -, $\alpha$ -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты также могут быть подходящими компонентами для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры нестандартных аминокислот включают: 4-гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутамат,  $\epsilon$ -N, N,N-триметиллизин,  $\epsilon$ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин,  $\sigma$ -N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В системе обозначений полипептидов, используемой в данном документе, находящимся слева направлением является направление в сторону аминоконца, а находящимся справа направлением является направление в сторону карбоксильного конца в соответствии со стандартной практикой и правилами.

**[0077]** Аналогично, если не указано иное, находящийся слева конец одонитевых полинуклеотидных последовательностей представляет собой 5'-конец; при этом

находящееся слева направление двухнитевых полинуклеотидных последовательностей обозначается как 5'-направление. Направление от 5' к 3', в котором происходит наращивание формирующихся РНК-транскриптов, обозначается как направление транскрипции; области последовательности на нити ДНК, содержащие такую же последовательность, что и РНК, и которые расположены в направлении 5' относительно 5'-конца РНК-транскрипта, называются "вышележащими последовательностями"; области последовательности на нити ДНК, содержащие такую же последовательность, что и РНК и которые расположены в направлении 3' относительно 3'-конца РНК-транскрипта, называются "нижележащими последовательностями".

**[0078]** Аминокислотные замены могут охватывать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые, как правило, вводятся посредством химического пептидного синтеза, а не посредством синтеза в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных фрагментов.

**[0079]** Встречающиеся в природе остатки можно разделить на классы на основе общих свойств боковой цепи: 1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; 2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; 3) кислотные: Asp, Glu; 4) основные: His, Lys, Arg; 5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и 6) ароматические: Trp, Tyr, Phe. Например, консервативные замены в полипептидных молекулах, описанных в данном документе (таких как антитела), могут предусматривать замену представителя одного из этих классов на представителя того же класса. Например, неконсервативные замены могут предусматривать замену представителя одного из этих классов на представителя из другого класса. Такие замены остатков могут вводиться, например, в области человеческого антитела, которые гомологичны антителам, не являющимся человеческими, или в негомологичные области молекулы.

**[0080]** При внесении изменений в антигенсвязывающий белок или белок PCSK9 в соответствии с определенными вариантами осуществления можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основании ее гидрофобности и характеристик заряда. Они являются следующими: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспарат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

**[0081]** Важность индекса гидропатичности аминокислоты в придании белку биологической функции взаимодействия является очевидной в данной области техники. Kyte et al., *J. Mol. Biol.*, 157:105-131 (1982). Известно, что определенные аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты, характеризующиеся аналогичным индексом или показателем гидропатичности, и при этом белки сохраняют аналогичную биологическую активность. В определенных вариантах осуществления при внесении изменений на основе индекса гидропатичности предусматривается замена аминокислот,



индексы гидропатичности которых находятся в пределах  $\pm 2$ . В определенных вариантах осуществления предусматриваются те, которые находятся в пределах  $\pm 1$ , и определенных вариантах осуществления предусматриваются те, которые находятся в пределах  $\pm 0,5$ .

**[0082]** Также из уровня техники понятно, что замену подобных аминокислот можно эффективно осуществлять на основании гидрофильности, в частности, если созданный таким образом биологически функциональный белок или пептид предполагается использовать в иммунологических вариантах осуществления, как в случае настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления самая высокая локальная средняя гидрофильность белка, которая обусловлена гидрофильностью его смежных аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, т. е. с биологическим свойством белка.

**[0083]** Этим аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспарат (+3,0 $\pm$ 1); глутамат (+3,0 $\pm$ 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 $\pm$ 1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). В определенных вариантах осуществления при внесении изменений на основе подобных значений гидрофильности предусматривается замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах  $\pm 2$ , в определенных вариантах осуществления предусматриваются те, которые находятся в пределах  $\pm 1$ , и в определенных вариантах осуществления предусматриваются те, которые находятся в пределах  $\pm 0,5$ . На основании гидрофильности также можно идентифицировать эпитопы в первичных аминокислотных последовательностях. Такие области также называют "коровыми областями эпитопа".

**[0084]** Иллюстративные аминокислотные замены представлены в таблице 1,0. В качестве примера выбранные иллюстративные замены показаны в правом столбце.

Таблица 1,0

Аминокислотные замены

Исходные остатки	Иллюстративные замены	Выбранная иллюстративная замена
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-диаминомасляная 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

**[0085]** Используемый в данном документе термин "субъект" относится к млекопитающему, включая человека, и может использоваться взаимозаменяемо с термином "пациент". Субъект или пациент может включать взрослых субъектов или субъектов-детей, если не указано иное. Возраст взрослого субъекта обычно составляет 18 лет или старше. В некоторых вариантах осуществления возраст взрослого субъекта составляет от 18 до 90 лет, например, от 18 до 85 лет или от 18 до 80 лет. Субъект-ребенок относится к субъекту младше 18 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта-ребенка составляет 17 лет или младше. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-ребенок в возрасте от 10 до 17 лет. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-ребенок младше 13 лет. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-ребенок в возрасте от 10 до 17 лет, у которого имеется HeFH.

**[0086]** Термин "лечение" охватывает облегчение по меньшей мере одного симптома или другого варианта осуществления нарушения, или снижение тяжести заболевания и т. п. Ингибитор PCSK9 и/или одно или несколько других средств терапии для снижения содержания холестерина LDL не обязательно должны обеспечивать полное излечение или устранять каждый симптом или проявление заболевания для того, чтобы представлять собой конкурентоспособное терапевтическое средство. Как признается в соответствующей области, лекарственные средства, используемые в качестве терапевтических средств, могут снижать тяжесть данного болезненного состояния, но не

обязательно устраняют каждое проявления заболевания, чтобы считаться пригодными терапевтическими средствами. В некоторых вариантах осуществления достаточным является простое снижение воздействия заболевания (например, за счет уменьшения числа или тяжести его симптомов, или за счет повышения эффективности другого лечения, или за счет получения другого благоприятного эффекта) или снижение вероятности того, что заболевание возникнет или ухудшится у субъекта. Определенные варианты осуществления настоящего изобретения направлены на способ, включающий введение субъекту ингибитора PCSK9 (например, антитела к PCSK9 или интерферирующей РНК) в количестве и в течение периода времени, достаточных для того, чтобы индуцировать устойчивое улучшение по сравнению с исходным уровнем показателя, который отражает тяжесть конкретного нарушения.

**[0087]** Термин "предупреждение" охватывает предупреждение по меньшей мере одного симптома или другого варианта осуществления нарушения и т. п. Профилактически вводимое лечение, включающее ингибитор PCSK9 и/или одно или несколько других средств терапии для снижения содержания холестерина LDL в соответствии с настоящим изобретением, не обязательно должно быть полностью эффективным в предупреждения возникновения состояния для того, чтобы представлять собой конкурентоспособное профилактическое средство. В некоторых вариантах осуществления достаточно просто уменьшить вероятность того, что заболевание возникнет или ухудшится у субъекта. В некоторых вариантах осуществления развитие симптома заболевания замедляется посредством терапевтических способов по настоящему изобретению.

**[0088]** Термин "не-HDL холестерин" охватывает все содержащие холестерин проатерогенные липопротеины, включая холестерин HDL, липопротеин очень низкой плотности, липопротеин средней плотности, липопротеин(а) и хиломикрон. Уровни не-HDL холестерина рассчитываются путем вычитания уровней холестерина HDL из уровней общего холестерина.

#### СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

**[0089]** Предусмотрены способы снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта, например, у субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH). Со ссылкой на фиг. 2А описывается неограничивающий пример терапевтических способов по настоящему изобретению. Способ **200** может включать идентификацию **210** субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше. Способ может дополнительно включать введение **220** субъекту антитела к PCSK9 в дозе, составляющей от приблизительно 350 до приблизительно 500 мг, вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят каждые четыре недели, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 20% или на от приблизительно 20% до

приблизительно 40%. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят чаще, чем каждые четыре недели, например, каждые две недели, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%, например, на по меньшей мере 45% или на от приблизительно 30% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления субъект-ребенок также получает дополнительное средство терапии для снижения содержания холестерина LDL (например, статин), описанное в данном документе.

**[0090]** Со ссылкой на фиг. 2B описывается неограничивающий пример терапевтических способов по настоящему изобретению. Способ **250** может включать идентификацию **260** субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или меньше. Способ может дополнительно включать введение **270** субъекту антитела к PCSK9 в дозе, составляющей от приблизительно 350 до приблизительно 500 мг, вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 40% или на от приблизительно 40% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления исходное содержание LDL-C составляет менее 208 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят каждые четыре недели, и уровень LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере приблизительно 40%. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят каждые две недели, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере приблизительно 50%.

**[0091]** В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (или по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична VH эволюкумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (или по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (или по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична VH эволюкумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% (или по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 представляет собой эволюкумаб. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей эволюкумаба показаны на фиг. 14.

Со ссылкой на фиг. 3 описывается неограничивающий пример терапевтических способов по настоящему изобретению. Способ **300** может включать идентификацию **310** субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH. Способ может дополнительно включать введение **320** субъекту-ребенку антитела к PCSK9 в усиленной схеме дозирования, где усиленная схема дозирования предусматривает количество и/или частоту введения дозы, каждое из которых независимо на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднее количество и/или среднюю частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше, чем верхний квартиль, за счет чего содержание LDL-C у субъекта-ребенка снижается. В некоторых вариантах осуществления исходное содержание LDL-C у субъекта составляет приблизительно 200 мг/дл или больше.

**[0092]** Со ссылкой на фиг. 4 предусматривается неограничивающий пример способа лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов. Способ **400** может включать идентификацию **410** субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении HeFH или ее симптомов, где субъект-ребенок характеризуется исходным содержанием LDL-C на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH. Кроме того, способ может включать введение **420** субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов, где усиленная схема дозирования предусматривает среднюю дозу, которая на от приблизительно 20 до приблизительно 500% превышает эталонную среднюю дозу ингибитора PCSK9 для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше, чем верхний квартиль. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает среднюю дозу на приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, приблизительно 120%, приблизительно 140%, приблизительно 160%, приблизительно 180%, приблизительно 200%, приблизительно 220%, приблизительно 250%, приблизительно 300%, приблизительно 350%, приблизительно 400%, приблизительно 450%, приблизительно 500% или больше или процентное значение в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, превышает эталонную среднюю дозу.

**[0093]** Со ссылкой на фиг. 5 описывается способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта. Способ **500** может включать введение **510** субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, где у субъекта имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH) или ее симптомы.

Усиленная схема дозирования ингибитора PCSK9 предусматривает количество ингибитора PCSK9, которое на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднее количество стандарта лечения для взрослых, у которых имеется HeFH, и/или частоту введения дозы ингибитора PCSK9, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднюю частоту стандарта лечения для взрослых, у которых имеется HeFH, за счет чего содержание LDL-C у субъекта снижается.

**[0094]** Со ссылкой на фиг. 6 описывается неограничивающий пример способа лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов. Способ **600** включает идентификацию **610** субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов. Способ может дополнительно включать введение **620** субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов, где усиленная схема дозирования предусматривает введение ингибитора PCSK9 в средней дозе, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднюю дозу стандарта лечения ингибитором PCSK9 для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у взрослого пациента.

**[0095]** В данном документе также предусмотрен способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови, включающий введение субъекту ингибитора PCSK9, где у субъекта имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия, где субъект представляет собой субъекта-ребенка, где ингибитор PCSK9 вводят в количестве, которое по меньшей мере так же эффективно, как 420 мг эволокумаба, где ингибитор PCSK9 вводят с частотой, составляющей каждые две недели или больше, за счет чего содержание LDL-C у субъекта снижается на более чем 30%. Эффективность ингибитора PCSK9 в некоторых вариантах осуществления основана на степени, в которой содержание LDL-C в сыворотке крови субъекта или содержание общего холестерина в сыворотке крови снижается при введении ингибитора PCSK9 пациентам с HeFH. В некоторых вариантах осуществления относительную эффективность ингибитора PCSK9 и эволокумаба в дозе 420 мг определяют у взрослых пациентов или пациентов-детей, у которых имеется HeFH. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 вводят в количестве, которое является по меньшей мере таким же эффективным, как и 420 мг эволокумаба, введенного взрослому пациенту с HeFH. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 вводят в количестве, которое является по меньшей мере таким же эффективным, как и 420 мг эволокумаба, введенного пациенту-ребенку, характеризующемуся исходным уровнем LDL-C, который составляет менее верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, которое находится на уровне или выше верхнего квартиля. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 является на по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере

90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или приблизительно 100% эффективным, как и 420 мг эволокумаба.

**[0096]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 по настоящему изобретению (например, антитело к PCSK9, ингибирующую нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный ингибитор) вводят субъекту по меньшей мере каждые 4 недели, каждые 3 недели, каждые 2 недели или каждую неделю или чаще или с частотой в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9, например антитело к PCSK9, ингибирующую нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный ингибитор, вводят субъекту каждые 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дня или чаще. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9, например антитело к PCSK9, вводят с интервалом от каждых двух до четырех недель. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9, например антитело к PCSK9, вводят каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9, например антитело к PCSK9, вводят каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше, и ингибитор PCSK9, например антитело к PCSK9, вводят каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или меньше, и ингибитор PCSK9, например антитело к PCSK9, вводят каждые четыре недели.

**[0097]** В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 по настоящему изобретению вводят субъекту в количестве, например, количестве на дозу, составляющем по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 490, 500 мг или больше, или в количестве в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят в количестве, например, в количестве на дозу, составляющем приблизительно 420 мг. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 вводят в количестве, например, в количестве на дозу, составляющем приблизительно 490 мг.

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9, например, антитело к PCSK9 или ингибирующую нуклеиновую кислоту, вводят в соответствии с усиленной схемой дозирования. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает частоту и/или количество введения дозы, которые повышены по сравнению с эталонной схемой дозирования. В некоторых вариантах осуществления эталонная схема дозирования представляет собой схему дозирования для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эталонная схема дозирования представляет собой схему дозирования для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у пациентов-детей

с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эталонная схема дозирования представляет собой схему дозирования стандарта лечения ингибитором PCSK9 для взрослого пациента с HeFH. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 одобрен государственным регулирующим органом (например, одобрен FDA) для снижения содержания LDL-C у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования стандарта лечения ингибитором PCSK9, одобренного государственным регулирующим органом, представляет собой схему дозирования, предусмотренную на одобренной государственным регулирующим органом этикетке для ингибитора PCSK9. В некоторых вариантах осуществления эталонная схема дозирования представляет собой схему дозирования на одобренной государственным регулирующим органом этикетке (например, на одобренной FDA этикетке) для ингибитора PCSK9. В некоторых вариантах осуществления эталонная схема дозирования предусматривает среднюю частоту введения дозы и/или среднее количество на одобренной государственным регулирующим органом этикетке (например, на одобренной FDA этикетке) для ингибитора PCSK9.

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает частоту введения дозы и/или количество, например, количество на дозу, ингибитора PCSK9, которое превышает эталонную частоту введения дозы и/или эталонное количество ингибитора PCSK9. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает частоту введения дозы, превышающую эталонную частоту введения дозы. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает частоту введения дозы, которая в по меньшей мере 1,2 раза, по меньшей мере 1,3 раза, по меньшей мере 1,4 раза, по меньшей мере 1,5 раза, по меньшей мере 1,6 раза, по меньшей мере 1,7 раза, по меньшей мере 1,8 раза, по меньшей мере 1,9 раза, по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 2,1 раза, по меньшей мере 2,2 раза, по меньшей мере 2,5 раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 3,2 раза, по меньшей мере 3,5 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 5 раз и больше или кратное количество в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, превышает эталонную частоту введения дозы. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает частоту введения дозы, которая на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере 140%, по меньшей мере 160%, по меньшей мере 180%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 250%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500% или больше или процентное значение в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, превышает эталонную частоту введения дозы.



**[0100]** В некоторых вариантах осуществления эталонная частота введения дозы составляет приблизительно один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждые 12 недель, каждый месяц, каждые 2 месяца, каждые 3 месяца, каждые 4 месяца, каждые 6 месяцев или больше или частоту в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления эталонная частота введения дозы основана на схеме введения ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эталонная частота введения дозы представляет собой среднюю частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления средняя частота введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы, составляет приблизительно один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждый месяц, каждые 2 месяца, каждые 3 месяца, каждые 4 месяца, каждые 6 месяцев или больше или частоту в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений.

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает количество, например, количество на дозу, которое превышает эталонное количество, например, эталонное количество на дозу. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает количество, например, количество на дозу, которое на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере 140%, по меньшей мере 160%, по меньшей мере 180%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 250%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500% или больше или процентное значение в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, превышает эталонное количество.

**[0102]** В некоторых вариантах осуществления эталонное количество, например, эталонное количество на дозу, составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460 мг, 480 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг или больше или количество в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления эталонное количество, например,

эталонное количество на дозу, основано на схеме дозирования ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эталонное количество представляет собой среднее количество ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления среднее количество ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы, составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460 мг, 480 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг или больше или количество в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений.

**[0103]** В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает частоту введения дозы, которая повышена по сравнению со средней частотой введения дозы стандарта лечения ингибитором PCSK9, например, для взрослого с HeFH. В некоторых вариантах осуществления частота введения дозы ингибитора PCSK9, вводимого субъекту, на приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, приблизительно 120%, приблизительно 140%, приблизительно 160%, приблизительно 180%, приблизительно 200%, приблизительно 250%, приблизительно 300%, приблизительно 350%, приблизительно 400%, приблизительно 450%, приблизительно 500% или больше или процентное значение в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, превышает среднюю частоту введения дозы стандарта лечения. В некоторых вариантах осуществления частота введения дозы ингибитора PCSK9, вводимого субъекту, на от приблизительно 15% до приблизительно 400% превышает среднюю частоту введения дозы стандарта лечения. В некоторых вариантах осуществления средняя частота введения дозы стандарта лечения составляет приблизительно один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждый месяц, каждые 2 месяца, каждые 3 месяца, каждые 4 месяца, каждые 6 месяцев или больше или частоту в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений.

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает количество, например, количество на дозу, ингибитора PCSK9, которое превышает среднее количество стандарта лечения ингибитором PCSK9, например, для взрослого с HeFH. В некоторых вариантах осуществления количество ингибитора PCSK9, вводимого субъекту, на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%,

приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 100% или больше или процентное значение в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, превышает среднее количество стандарта лечения. В некоторых вариантах осуществления количество ингибитора PCSK9, вводимого субъекту, на от приблизительно 5% до приблизительно 100% превышает среднее количество стандарта лечения. В некоторых вариантах осуществления среднее количество стандарта лечения составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460 мг или больше или количество в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений.

**[0105]** В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает среднюю дозу ингибитора PCSK9, которая превышает эталонную среднюю дозу ингибитора PCSK9 (например, для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как раскрыто в данном документе). Термин "средняя доза", используемый в данном документе, относится к количеству терапевтического средства, например ингибитора PCSK9, вводимого субъекту за единицу времени (например, мг/день, мг/неделя, мг/месяц и т. д.). В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает среднюю дозы ингибитора PCSK9, которая превышает среднюю дозу стандарта лечения ингибитором PCSK9, например, для взрослого с HeFH. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает среднюю дозу, составляющую по меньшей мере 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 550, 600, 620, 650, 700, 720, 750, 800, 820, 850, 900, 920, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 мг/месяц, или среднюю дозу в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает среднюю дозу, которая на приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, приблизительно 120%, приблизительно 140%, приблизительно 160%, приблизительно 180%, приблизительно 200%, приблизительно 220%, приблизительно 250%, приблизительно 300%, приблизительно 350%, приблизительно 400%, приблизительно 450%, приблизительно 500% или больше или процентное значение в пределах диапазона, определяемого любыми

двумя из предыдущих значений, превышает эталонную среднюю дозу. В некоторых вариантах осуществления эталонная средняя доза составляет по меньшей мере 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 550, 600, 620, 650, 700, 720, 750, 800, 820, 850 или 900 мг/месяц или больше или среднюю дозу в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений.

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования предусматривает частоту и/или количество введений дозы, превышающие эталонную частоту и/или количество введений дозы (например, частоту и/или количество введений дозы для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; частоту и/или количество введений дозы для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH), как раскрыто в данном документе.

**[0107]** В некоторых вариантах осуществления субъекту-ребенку вводят по меньшей мере 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 мг ингибитора PCSK9 (такого как нейтрализующее антитело) на дозу. В некоторых вариантах осуществления эволокумаб вводят в количестве, составляющем по меньшей мере 350 мг, например, по меньшей мере 370 мг, по меньшей мере 390 мг, по меньшей мере 400 мг, по меньшей мере 420 мг, по меньшей мере 440 мг, по меньшей мере 450 мг, по меньшей мере 460 мг, по меньшей мере 470 мг, по меньшей мере 480 мг или приблизительно 490 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления количество вводимого нейтрализующего антитела к PCSK9 составляет по меньшей мере 350 мг, например, по меньшей мере 370 мг, по меньшей мере 390 мг, по меньшей мере 400 мг, по меньшей мере 420 мг, по меньшей мере 440 мг, по меньшей мере 450 мг, по меньшей мере 460 мг, по меньшей мере 470 мг, по меньшей мере 480 мг или приблизительно 490 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления количество вводимого антитела к PCSK9 составляет по меньшей мере 40 мг, например, по меньшей мере 80 мг, по меньшей мере 150 мг, по меньшей мере 200 мг, по меньшей мере 350 мг, по меньшей мере 400 мг, по меньшей мере 450 мг, по меньшей мере 480 мг или приблизительно 490 мг или количество в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений.

**[0108]** Когорта пациентов-детей с HeFH может представлять собой любую подходящую группу пациентов в возрасте менее 18 лет, у которых была диагностирована HeFH. В некоторых вариантах осуществления когорта представляет собой репрезентативную подгруппу общей популяции пациентов-детей, у которых имеется или диагностирована HeFH. В некоторых вариантах осуществления когорта включает приблизительно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800,

900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000 или больше пациентов или число пациентов в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления когорты включает по меньшей мере 25 пациентов-детей с HeFH. В некоторых вариантах осуществления когорты включает приблизительно 105 или больше пациентов-детей с HeFH. У пациентов когорты может быть диагностирована HeFH с применением любого подходящего показателя, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления средний возраст когорты составляет приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 лет или средний возраст в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления возраст пациента-ребенка в когорте составляет по меньшей мере 8, 9, 10, 11 или 12 лет. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70% или приблизительно 75% или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, пациентов в когорте младше 14 лет. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65% или приблизительно 70% или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, когорты принадлежат к мужскому полу. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, когорты являются представителями европеоидной расы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, когорты принадлежат к той же расе, что и раса субъекта-ребенка, которому вводят ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9 или ингибирующую нуклеиновую кислоту).

**[0109]** В некоторых вариантах осуществления когорты пациентов-детей с HeFH характеризуется медианным исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 150 мг/дл, приблизительно 155 мг/дл, приблизительно 160 мг/дл, приблизительно 165 мг/дл, приблизительно 170 мг/дл, приблизительно 175 мг/дл, приблизительно 180 мг/дл, приблизительно 185 мг/дл, приблизительно 190 мг/дл,

приблизительно 195 мг/дл, приблизительно 200 мг/дл, приблизительно 205 мг/дл, приблизительно 210 мг/дл, приблизительно 215 мг/дл, приблизительно 220 мг/дл, приблизительно 225 мг/дл или приблизительно 230 мг/дл, или медианным исходным содержанием LDL-C в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется медианным исходным содержанием LDL-C, составляющим от приблизительно 160 мг/дл до приблизительно 190 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется медианным исходным содержанием LDL-C, составляющим 173 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется верхним квартилем исходного содержания LDL-C, составляющим приблизительно 180 мг/дл, приблизительно 185 мг/дл, приблизительно 190 мг/дл, приблизительно 195 мг/дл, приблизительно 200 мг/дл, приблизительно 205 мг/дл, приблизительно 210 мг/дл, приблизительно 215 мг/дл, приблизительно 220 мг/дл, приблизительно 225 мг/дл, приблизительно 230 мг/дл, приблизительно 235 мг/дл, приблизительно 240 мг/дл, приблизительно 245 мг/дл, приблизительно 250 мг/дл, приблизительно 255 мг/дл или приблизительно 260 мг/дл, или верхним квартилем исходного содержания LDL-C в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется верхним квартилем исходного содержания LDL-C, составляющим от приблизительно 190 мг/дл до приблизительно 220 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется верхним квартилем исходного содержания LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется верхним квартилем исходного содержания LDL-C, составляющим приблизительно 210 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется верхним квартилем исходного содержания LDL-C, составляющим 208 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется нижним квартилем исходного содержания LDL-C, составляющим приблизительно 135 мг/дл, приблизительно 140 мг/дл, приблизительно 145 мг/дл, приблизительно 150 мг/дл, приблизительно 155 мг/дл, приблизительно 160 мг/дл или приблизительно 165 мг/дл, или нижним квартилем исходного содержания LDL-C в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется верхним квартилем исходного содержания LDL-C, составляющим 154 мг/дл.

**[0110]** В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется средним исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 150, приблизительно 155, приблизительно 160, приблизительно 165, приблизительно 170, приблизительно 175, приблизительно 180, приблизительно 185, приблизительно 190, приблизительно 195, приблизительно 200 мг/дл, приблизительно 205 мг/дл, приблизительно 210 мг/дл, приблизительно 215 мг/дл, приблизительно 220 мг/дл, приблизительно 225 мг/дл или приблизительно 230 мг/дл, или средним исходным содержанием LDL-C в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления пациент-ребенок в когорте характеризуется исходным содержанием LDL-

С, составляющим приблизительно 110 мг/дл или больше, например, приблизительно 115 мг/дл или больше, приблизительно 120 мг/дл или больше, приблизительно 125 мг/дл или больше, приблизительно 130 мг/дл или больше, приблизительно 135 мг/дл или больше, приблизительно 140 мг/дл или больше, приблизительно 145 мг/дл или больше, включая приблизительно 150 мг/дл или больше. В некоторых вариантах осуществления пациент-ребенок в когорте характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим по меньшей мере 130 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления пациент-ребенок в когорте характеризуется исходным содержанием LDL-C в диапазоне от приблизительно 90 мг/дл до приблизительно 550 мг/дл, например, от приблизительно 100 мг/дл до приблизительно 500 мг/дл, от приблизительно 110 мг/дл до приблизительно 450 мг/дл, от приблизительно 110 мг/дл до приблизительно 400 мг/дл, от приблизительно 120 мг/дл до приблизительно 350 мг/дл, от приблизительно 130 мг/дл до приблизительно 300 мг/дл, включая от приблизительно 130 мг/дл приблизительно до 275 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления пациент-ребенок в когорте характеризуется исходным содержанием (например, натошак) триглицеридов, составляющим приблизительно 600 мг/дл или меньше, например, приблизительно 550 мг/дл или меньше, приблизительно 500 мг/дл или меньше, приблизительно 475 мг/дл или меньше, приблизительно 450 мг/дл или меньше, приблизительно 425 мг/дл или меньше, приблизительно 400 мг/дл или меньше, приблизительно 375 мг/дл или меньше, включая приблизительно 350 мг/дл или меньше, или исходным содержанием триглицеридов в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений.

**[0111]** В некоторых вариантах осуществления когорта характеризуется медианным исходным содержанием не-HDL-C, составляющим приблизительно 150 мг/дл, приблизительно 155 мг/дл, приблизительно 160 мг/дл, приблизительно 165 мг/дл, приблизительно 170 мг/дл, приблизительно 175 мг/дл, приблизительно 180 мг/дл, приблизительно 185 мг/дл, приблизительно 190 мг/дл, приблизительно 195 мг/дл, приблизительно 200 мг/дл, приблизительно 205 мг/дл, приблизительно 210 мг/дл, приблизительно 215 мг/дл, приблизительно 220 мг/дл, приблизительно 225 мг/дл, приблизительно 230 мг/дл, приблизительно 235 мг/дл, приблизительно 240 мг/дл, приблизительно 250 мг/дл или приблизительно 260 мг/дл, или медианным исходным содержанием не-HDL-C в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления когорта характеризуется верхним квартилем исходного содержания не-HDL-C, составляющим приблизительно 190 мг/дл, приблизительно 195 мг/дл, приблизительно 200 мг/дл, приблизительно 205 мг/дл, приблизительно 210 мг/дл, приблизительно 215 мг/дл, приблизительно 220 мг/дл, приблизительно 225 мг/дл, приблизительно 230 мг/дл, приблизительно 235 мг/дл, приблизительно 240 мг/дл, приблизительно 245 мг/дл, приблизительно 250 мг/дл, приблизительно 255 мг/дл, приблизительно 260 мг/дл, приблизительно 265 мг/дл, приблизительно 270 мг/дл, приблизительно 275 мг/дл, приблизительно 280 мг/дл, приблизительно 290 мг/дл, или верхним квартилем исходного содержания не-HDL-C в

диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется нижним квартилем исходного содержания не-HDL-C, составляющим приблизительно 135 мг/дл, приблизительно 140 мг/дл, приблизительно 145 мг/дл, приблизительно 150 мг/дл, приблизительно 155 мг/дл, приблизительно 160 мг/дл, приблизительно 165 мг/дл, приблизительно 170 мг/дл, приблизительно 175 мг/дл, приблизительно 180 мг/дл, приблизительно 185 мг/дл, или нижним квартилем исходного содержания не-HDL-C в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений.

**[0112]** В некоторых вариантах осуществления когорты характеризуется средним исходным содержанием не-HDL-C, составляющим приблизительно 150, приблизительно 155, приблизительно 160, приблизительно 165, приблизительно 170, приблизительно 175, приблизительно 180, приблизительно 185, приблизительно 190, приблизительно 195, приблизительно 200 мг/дл, приблизительно 205 мг/дл, приблизительно 210 мг/дл, приблизительно 215 мг/дл, приблизительно 220 мг/дл, приблизительно 225 мг/дл, приблизительно 230 мг/дл, приблизительно 235 мг/дл, приблизительно 240 мг/дл, приблизительно 245 мг/дл, приблизительно 250 мг/дл, или средним исходным содержанием не-HDL-C в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений.

**[0113]** В некоторых вариантах осуществления у пациентов в когорте имеется один или несколько сердечно-сосудистых факторов риска, включая без ограничения гипертензию, низкое содержание HDL-C, курение сигарет в настоящее время, диабет II типа и семейный анамнез преждевременной ишемической болезни сердца (CHD). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55% или приблизительно 60%, или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, пациентов в когорте характеризуются низким содержанием HDL-C (например, содержанием HDL-C, составляющим приблизительно 60 мг/дл или меньше, приблизительно 50 мг/дл или меньше или приблизительно 40 мг/дл или меньше). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55% или приблизительно 60% или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, пациентов в когорте характеризуются семейным анамнезом преждевременной CHD.

**[0114]** В некоторых вариантах осуществления пациенты в когорте получали или получают одно или несколько других средств терапии для снижения содержания холестерина LDL (например, средство терапии для снижения содержания LDL, которое не является средством терапии на основе ингибитора PCSK9, такое как средство терапии на основе статина). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50%,



приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 95% или больше или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, пациентов в когорте принимают статин. В некоторых вариантах осуществления все пациенты в когорте принимают статин. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35% или больше или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, пациентов в когорте получают средство терапии на основе статина высокой интенсивности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или больше или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, пациентов в когорте получают средство терапии на основе статина умеренной интенсивности. В некоторых вариантах осуществления все пациенты в когорте принимают статин. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35% или больше или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, пациентов в когорте получают средство терапии на основе статина низкой интенсивности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35% или больше или процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений, пациентов в когорте получают эзетимиб.

**[0115]** В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент, которому вводят ингибитор PCSK9 в соответствии со способами по настоящему изобретению, является субъектом-ребенком или пациентом-ребенком. Возраст субъекта-ребенка обычно составляет менее 18 лет (или 17 лет или младше). В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта-ребенка составляет от 8 до 17 лет, например, от 9 до 17 лет, от 10 до 17 лет, от 11 до 17 лет, включая от 12 до 17 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта-ребенка составляет от 10 до 17 лет. Используемый в данном документе термин "от... до" включает число лет, определяющих диапазон. Таким образом, субъект "в возрасте от 10 до 17 лет" включает субъектов в возрасте 10 лет или старше и младше 18 лет и включает, например, субъекта в возрасте 17 лет и 11 месяцев.

**[0116]** Субъект для введения ингибитора PCSK9 в соответствии со способами по настоящему изобретению может быть идентифицирован на основании одного или нескольких из ряда критериев. В некоторых вариантах осуществления у субъекта

диагностирована HeFH на основании одного или нескольких клинических показателей. Подходящие клинические показатели включают без ограничения уровни биомаркеров в крови (например, общий холестерин, холестерин LDL и уровни других липидов), физикальные симптомы HeFH (например, дугообразная роговица, ксантелазма, ксантомы сухожилий или туберозные ксантомы), ишемическую болезнь сердца в анамнезе (CHD) и семейный анамнез. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется одна или несколько генетических мутаций, ассоциированных с HeFH, или он идентифицирован как имеющий их. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется мутация, ассоциированная с HeFH, без ограничения в LDLR, APOB и/или PCSK9, или он идентифицирован как имеющий ее. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется одна, две, три или более мутаций, ассоциированных с HeFH, или он ассоциирован как имеющий их. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется по меньшей мере одна мутация, ассоциированная с HeFH, в одном, двух, трех или более генах, отвечающих за HeFH (например, LDLR, APOB, PCSK9), или он идентифицирован как имеющий ее. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется сложная форма HeFH, или он идентифицирован как имеющий ее. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают диагностику и/или генотипирование субъекта для определения того, что у субъекта-ребенка имеется HeFH, включая без ограничения сложная форма HeFH.

**[0117]** В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают измерение исходного содержания LDL-C у субъекта-ребенка.

**[0118]** В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9 или ингибирующую нуклеиновую кислоту), характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C, которое находится на уровне или выше верхнего квартиля исходных уровней LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C, составляющим 200 мг/дл или больше, например, приблизительно 210 мг/дл или больше, приблизительно 220 мг/дл или больше, приблизительно 230 мг/дл или больше, приблизительно 240 мг/дл или больше, приблизительно 250 мг/дл или больше, приблизительно 260 мг/дл или больше, приблизительно 270 мг/дл или больше, приблизительно 280 мг/дл или больше, приблизительно 290 мг/дл или больше, включая приблизительно 300 мг/дл или больше. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C в диапазоне, составляющем от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 550 мг/дл, например, от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 550 мг/дл, от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 500 мг/дл, от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 450 мг/дл, от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 400 мг/дл, от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 350 мг/дл, от приблизительно 200 мг /дл до приблизительно 300 мг/дл, от приблизительно 200

мг/дл до приблизительно 230 мг/дл, включая от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 275 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C, составляющим 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230 мг/дл, или исходным содержанием LDL-C, превышающим любое из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления субъекта характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C, составляющим 208 мг/дл или больше.

**[0119]** В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9 или ингибирующую нуклеиновую кислоту), характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C, которое находится на уровне или ниже верхнего квартиля, например, ниже медианы исходных уровней LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C, составляющее приблизительно 210 мг/дл или меньше, например, приблизительно 200 мг/дл или меньше, приблизительно 190 мг/дл или меньше, приблизительно 180 мг/дл или меньше, приблизительно 170 мг/дл или меньше, приблизительно 160 мг/дл или меньше, приблизительно 150 мг/дл или меньше, приблизительно 140 мг/дл или меньше, приблизительно 130 мг/дл или меньше, приблизительно 120 мг/дл или меньше, включая приблизительно 110 мг/дл или меньше. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C, составляющим 208 мг/дл или меньше. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C, составляющим 173 мг/дл или меньше. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C в диапазоне, составляющем от приблизительно 80 мг/дл до приблизительно 210 мг/дл, например, от приблизительно 90 мг/дл до приблизительно 210 мг/дл, от приблизительно 100 мг/дл до приблизительно 210 мг/дл, от приблизительно 110 мг/дл до приблизительно 210 мг/дл, от приблизительно 120 мг/дл до приблизительно 210 мг/дл, от приблизительно 130 мг/дл до приблизительно 210 мг/дл, от приблизительно 130 мг/дл до приблизительно 200 мг/дл, от приблизительно 130 мг/дл до приблизительно 190 мг/дл, от приблизительно 130 мг/дл до приблизительно 180 мг/дл, включая от приблизительно 130 мг/дл до 173 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C от 130 мг/дл до 173 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C от 130 мг/дл до 208 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием

LDL-C, составляющим 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208 мг/дл, или исходным содержанием LDL-C, меньшим, чем любое из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется или идентифицирован как характеризующийся исходным содержанием LDL-C, составляющим 208 мг/дл или меньше. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают измерение исходного содержания LDL-C у субъекта-ребенка.

**[0120]** В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают снижение содержания LDL-C у субъекта на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на от приблизительно 30% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или больше или на процентное значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, от приблизительно 30% до приблизительно 50%, от приблизительно 20% до приблизительно 50%, от приблизительно 20% до приблизительно 80%, от приблизительно 30% до приблизительно 50% или от приблизительно 30% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше, при этом ингибитор PCSK9, например антитело к PCSK9, вводят каждые четыре недели, и где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 20%. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше, ингибитор PCSK9, например, антитело к PCSK9, вводят каждые две недели, и где LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%.

**[0121]** В некоторых вариантах осуществления субъект-ребенок характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 210 мг/дл или меньше, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, от приблизительно 40% до приблизительно 60%, от приблизительно 40% до приблизительно 80%, от приблизительно 50% до приблизительно 60% или от приблизительно 50% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления субъект-ребенок характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 210 мг/дл или меньше, и LDL-C у субъекта снижается

на по меньшей мере 45%. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 210 мг/дл или меньше, при этом ингибитор PCSK9, например антитело к PCSK9, вводят каждые четыре недели, и содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 40%. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 210 мг/дл или меньше, при этом ингибитор PCSK9, например антитело к PCSK9, вводят каждые две недели, и LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 50%.

**[0122]** В некоторых вариантах осуществления снижение содержания LDL-C у субъекта-ребенка составляет по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или приблизительно 100% или процентное значение в пределах диапазонов, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, от снижения содержания LDL-C, достигнутого в эталонной популяции пациентов (например, пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным содержанием LDL-C, которое меньше верхнего квартиля или медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; взрослых пациентов с HeFH), которым вводят средство терапии, представляющее собой ингибитор PCSK9, в эталонной схеме дозирования ингибитора PCSK9 (например, схеме дозирования для пациентов-детей с HeFH в эталонной популяции пациентов; схеме дозирования стандарта лечения для эталонной популяции пациентов; схеме дозирования в соответствии с одобренной государственным регулирующим органом этикеткой и т. д.). В некоторых вариантах осуществления снижение содержания LDL-C у субъекта-ребенка составляет по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или приблизительно 100%, или процентное значение в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, от снижения содержания LDL-C, достигнутого в эталонной популяции пациентов (например, пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным содержанием LDL-C, которое меньше верхнего квартиля или медианы исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; взрослых пациентов с HeFH), которым вводят ингибитор PCSK9 с эталонной частотой введения дозы (например, средней частотой введения дозы для пациентов-детей с HeFH в эталонной популяции пациентов; средней частотой введения дозы стандарта лечения для эталонной популяции пациентов; средней частотой введения дозы в соответствии с одобренной государственным регулирующим органом этикеткой и т. д.). В некоторых вариантах осуществления снижение содержания LDL-C у субъекта-ребенка составляет по меньшей мере 70% от снижения содержания LDL-C, достигнутого в эталонной популяции пациентов, которым вводят ингибитор PCSK9 с эталонной частотой введения дозы. В некоторых вариантах

осуществления снижение содержания LDL-C у субъекта-ребенка по сути такое же, как снижение содержания LDL-C, достигнутое в контрольной популяции пациентов после получения средства терапии, представляющего собой ингибитор PCSK9, в соответствии с эталонной схемой дозирования. В некоторых вариантах осуществления усиленная схема дозирования вводится субъекту-ребенку до тех пор, пока не будет достигнута терапевтически приемлемая конечная точка для HeFH.

**[0123]** Снижение содержания LDL-C может представлять собой процентное отличие между исходным содержанием LDL-C и содержанием LDL-C после введения ингибитора PCSK9 (например, антитела к PCSK9 и/или ингибирующей нуклеиновой кислоты).. В некоторых вариантах осуществления процентное снижение LDL-C достигается на по меньшей мере неделе 12, по меньшей мере неделе 13, по меньшей мере неделе 14, по меньшей мере неделе 15, по меньшей мере неделе 16, по меньшей мере неделе 17, по меньшей мере неделе 18, по меньшей мере неделе 19, по меньшей мере неделе 20, по меньшей мере неделе 21, по меньшей мере неделе 22, по меньшей мере неделе 23, по меньшей мере неделе 24, по меньшей мере неделе 25, по меньшей мере неделе 26, по меньшей мере неделе 27, по меньшей мере неделе 28, по меньшей мере неделе 29 или по меньшей мере неделе 30 или позже или к по меньшей мере временному интервалу в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, введения ингибитора PCSK9 (например, антитела к PCSK9 и/или ингибирующей нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления процентное снижение LDL-C достигается на по меньшей мере неделе 20 введения ингибитора PCSK9. В некоторых вариантах осуществления процентное снижение LDL-C достигается на по меньшей мере неделе 24 введения ингибитора PCSK9.

**[0124]** Фармацевтические композиции, содержащие ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9, ингибирующую нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный ингибитор), вводят субъекту способом, соответствующим показанию и композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат антитело к PCSK9. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат ингибирующие нуклеиновые кислоты (например, интерферирующую РНК, такую как siRNA). Фармацевтические композиции можно вводить посредством любой подходящей методики, в том числе без ограничения парентерально, местно или с помощью ингаляции. В случае инъекции фармацевтическую композицию можно вводить, например, внутрисуставным, внутривенным, внутримышечным, внутриочаговым, внутрибрюшинным или подкожным путями, с помощью болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Доставка путем ингаляции включает, например, назальную или пероральную ингаляцию, применение небулайзера, ингаляцию антитела в аэрозольной форме и т. п. Другие альтернативы включают пероральные препараты, включая таблетки, сиропы или пастилки.

**[0125]** Ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9 и/или ингибирующую нуклеиновую кислоту) можно вводить в подходящей форме композиции, содержащей

один или несколько дополнительных компонентов, таких как физиологически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель. Необязательно композиция дополнительно содержит один или несколько физиологически активных средств. В различных конкретных вариантах осуществления композиция содержит один, два, три, четыре, пять или шесть физиологически активных средств в дополнение к одному или нескольким ингибиторам PCSK9 (например, антителам к PCSK9, ингибирующим нуклеиновым кислотам или низкомолекулярным ингибиторам).

**[0126]** Дозировки и частота введения могут варьироваться в зависимости от таких факторов, как путь введения, используемый конкретный ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9, ингибирующая нуклеиновая кислота или низкомолекулярный ингибитор), характер и тяжесть заболевания, подлежащего лечению, является ли состояние острым или хроническим и размера и общего состояния субъекта.

#### Средства комбинированной терапии

**[0127]** Конкретные варианты осуществления способов и композиций по настоящему изобретению предусматривают применение по меньшей мере одного ингибитора PCSK9 (например, антитела к PCSK9 и/или ингибирующей нуклеиновой кислоты) и одного или нескольких других терапевтических средств, например, применимых для снижения содержания LDL-C. В одном варианте осуществления ингибиторы PCSK9 (например, антитела к PCSK9 и/или ингибирующие нуклеиновые кислоты) вводят отдельно или в комбинации с другими средствами, применимыми для лечения состояния, которым поражен субъект. Примеры таких средств включают как белковые, так и небелковые лекарственные средства. При совместном введении нескольких терапевтических средств дозировки могут быть скорректированы соответствующим образом, как признается в соответствующей области техники. "Совместное введение" и комбинированная терапия не ограничиваются одновременным введением, но также включают схемы лечения, в которых ингибитор PCSK9 вводят по меньшей мере один раз в течение курса лечения, который предусматривает введение субъекту по меньшей мере одного другого терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9 и/или ингибирующую нуклеиновую кислоту) вводят до введения по меньшей мере одного другого терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9, ингибирующую нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный ингибитор) вводят одновременно с введением по меньшей мере одного другого терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9, ингибирующую нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный ингибитор) вводят после введения по меньшей мере одного другого терапевтического средства.

**[0128]** В одном варианте осуществления антитело и/или ингибирующую нуклеиновую кислоту (например, интерферирующую РНК) вводят субъекту в комбинации со статином и антителом к PCSK9 (например, препаратом Repatha<sup>®</sup>, препаратом Praluent<sup>®</sup>,

бокоцизумабом). В другом варианте осуществления антитело и/или ингибирующую нуклеиновую кислоту (например, интерферирующую РНК) вводят субъекту в комбинации со статином и по меньшей мере одним другим средством для снижения содержания холестерина (сывороточного и/или общего холестерина в организме). В некоторых вариантах осуществления наблюдалось, что средства, которые повышают экспрессию LDLR, приводят к повышению уровней HDL в сыворотке крови, снижению уровней LDL или снижению уровней триглицеридов.

**[0129]** В данном документе предусмотрен способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта, неограничивающий пример которого изображен на фиг. 7. Способ **700** может включать введение **710** субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH, где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше, антитела к PCSK9 с частотой введения дозы, составляющей приблизительно один раз в месяц, и в количестве от приблизительно 400 мг до приблизительно 450 мг; по меньшей мере одного статина и по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которое отличается от антитела к PCSK9 и по меньшей мере одного статина, за счет чего содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволокумаба; аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VH эволокумаба; переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволокумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VL эволокумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 представляет собой эволокумаб.

**[0130]** Также предусмотрен способ лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, неограничивающий пример которого изображен на фиг. 8. Способ **800** может включать введение **810** субъекту-ребенку с HeFH, характеризующемуся исходным содержанием холестерина LDL в сыворотке крови (LDL-C) на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, как описано в данном документе, ингибитора PCSK9; по меньшей мере одного статина и по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которое отличается от ингибитора PCSK9 и по меньшей мере одного статина, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов, где ингибитор PCSK9 вводят в соответствии со схемой дозирования ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше, чем медиана исходных значений LDL-C среди когорты.

**[0131]** Со ссылкой на фиг. 9 описывается неограничивающий пример способа лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или



ее симптомов. Способ **900** может включать введение **910** субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH, ингибитора PCSK9, где ингибитор PCSK9 вводят в соответствии со схемой введения дозы стандарта лечения (например, одобренного государственным регулирующим органом) для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у взрослого пациента; по меньшей мере одного статина и по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которое отличается от ингибитора PCSK9 и по меньшей мере одного статина, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов.

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL вводят в соответствии с усиленной схемой дозирования, предусматривающей среднюю дозу по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которая на приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, приблизительно 120%, приблизительно 140%, приблизительно 160%, приблизительно 180%, приблизительно 200%, приблизительно 250%, приблизительно 300%, приблизительно 350%, приблизительно 400%, приблизительно 450%, приблизительно 500% или больше или процентное значение в пределах диапазона, определяемого любыми двумя из предыдущих значений, превышает среднюю дозу стандарта лечения (например, одобренной государственным регулирующим органом) по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у пациента-ребенка.

**[0133]** В некоторых вариантах осуществления статины включают без ограничения аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин или симвастатин. В некоторых вариантах осуществления другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL включает без ограничения статины, фибрат, секвестрант желчных кислот, ниацин, антиагрегант, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, антагонист рецептора ангиотензина II, ингибитор ацил-КоА-холестерин-ацетилтрансферазы (ACAT), ингибитор всасывания холестерина, ингибитор белка-переносчика сложного эфира холестерина (СЕТР), ингибитор микросомального белка-переносчика триглицеридов (МТТР), модулятор холестерина, модулятор желчных кислот, агонист рецептора активации пролиферации пероксисом (PPAR), средство на основе генной терапии, составное средство для защиты сосудов, ингибитор гликопротеина IIb/IIIa, аспирин или аспириноподобное соединение, ингибитор IB АТ, ингибитор скваленсинтазы или ингибитор хемоаттрактантного белка моноцитов (MCP)-I. Иллюстративные средства включают без ограничения статины (например, аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин, симвастатин), никотиновую кислоту (ниацин) (NIACOR, NIASPAN (ниацин с медленным высвобождением), SLO-NIACIN (ниацин с медленным высвобождением)), фиброевую кислоту (LOPID (гемфиброзил), TRICOR

(фенофибрат), секвестранты желчных кислот (QUESTRAN (холестирамин), колесевелам (WELCHOL), COLESTID (колестипол)), ингибиторы всасывания холестерина (ZETIA (эзетимиб)), комбинирование никотиновой кислоты со статином ADVICOR (LOVASTATIN и NIASPAN), комбинирование статина с ингибитором поглощения (VYTORIN (ZOCOR и ZETIA)) и/или модифицирующие липиды средства. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9, ингибирующую нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный ингибитор) комбинируют с агонистами PPAR-гамма, агонистами PPAR-альфа/гамма, ингибиторами скваленсинтазы, ингибиторами CETP, антигипертензивными средствами, антидиабетическими средствами (такими как сульфонилмочевины, инсулин, аналоги GLP-1, ингибиторы DDPIV), модуляторами ApoB, ингибиторами MTP и/или средствами для лечения облитерирующего атеросклероза. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 (например, антитело к PCSK9, ингибирующую нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный ингибитор) комбинируют со средством, которое приводит к повышению уровня белка LDLR у субъекта, таким как статины, определенные цитокины, такие как онкостатин М, эстроген и/или некоторые растительные ингредиенты, такие как берберин.

#### ИНГИБИТОРЫ PCSK9

**[0134]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 по настоящему изобретению представляет собой антитело, ингибирующую нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный ингибитор. В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 представляет собой моноклональное антитело. В другом варианте осуществления антитело к PCSK9 представляет собой человеческое антитело. В другом варианте осуществления антитела представляют собой гуманизированные антитела. В другом варианте осуществления в способах по настоящему изобретению вводят ингибирующую нуклеиновую кислоту (например, siRNA или shRNA). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 включает без ограничения эволокумаб, алирокумаб, бокоцизумаб, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, REGN728, LY3015014, 1B20, инклизирин, ISIS 394814, SX-PCSK9 и BMS-962476.

**[0135]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 одобрен государственным регулирующим органом (например, одобрен FDA) для снижения уровней холестерина LDL в сыворотке крови у пациента-человека, например взрослого пациента.

**[0136]** В данном документе также рассматриваются связанные с PCSK9 средства для снижения содержания липидов, которые могут снижать содержание других липидов (помимо LDL-C).

#### Антитела к PCSK9

**[0137]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой любое подходящее антитело, которое приводит к снижению уровней LDL-C посредством PCSK9. Такие ингибиторы PCSK9 могут включать антитела эволокумаб (рег.

№ в CAS 1256937-27-5; № в BO3 9643, № в IND 105188) (REPATHA®), алирокумаб (PRALUENT®), бокоцизумаб, REGN728, RG7652, LY3015014, LGT209, 1D05 (US8188234), 1B20 (US8188233), SX-PCSK9 и BMS-962476. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой нейтрализующее антитело. Для краткости "антитело против PCSK9" также может обозначаться в данном документе как "антитело к PCSK9", и следует понимать, что в данном документе эти два термина являются взаимозаменяемыми.

**[0138]** В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит: переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи эволокумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи эволокумаба, как показано на фиг. 14. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи эволокумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одной или нескольких из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи эволокумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одной или нескольких из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи эволокумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в каждой из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи эволокумаба с не более чем 3 аминокислотными заменами (например, консервативными заменами) в каждой из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи эволокумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи эволокумаба, как показано на фиг. 14. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую каркасную область (FR) 1, FR2, FR3 и FR4 из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно тяжелой цепи эволокумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одном или нескольких из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую

FR1, FR2, FR3 и FR4 из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно легкой цепи эволюкумаба с не более чем 3, 2, 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одном или нескольких из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно тяжелой цепи эволюкумаба; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно легкой цепи эволюкумаба, как показано на фиг. 14. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VH эволюкумаба; и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VL эволюкумаба, как показано на фиг. 14. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит VH, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VH эволюкумаба; и VL, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит VH из VH эволюкумаба; и VL из VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VH эволюкумаба; вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VL эволюкумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 представляет собой эволюкумаб.

**[0139]** В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит: вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи алирокумаба; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи алирокумаба, как показано на фиг. 15A. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи алирокумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной

заменой (например, консервативными заменами) в одной или нескольких из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи алирокумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одной или нескольких из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи алирокумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи алирокумаба, как показано на фиг. 15A. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4 из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно тяжелой цепи алирокумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одном или нескольких из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4 из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно легкой цепи алирокумаба с не более чем 3, 2, 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одном или нескольких из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно тяжелой цепи алирокумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно легкой цепи алирокумаба, как показано на фиг. 15A. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VH алирокумаба; и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VL алирокумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит VH, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH алирокумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VH алирокумаба; и VL, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL алирокумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VL алирокумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9

представляет собой алирокумаб.

**[0140]** В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит: переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи бокоцизумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи бокоцизумаба, как показано на фиг. 15B. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи бокоцизумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одной или нескольких из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи бокоцизумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одной или нескольких из CDRL1, CDRL2 и CDRL3. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно тяжелой цепи бокоцизумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно легкой цепи бокоцизумаба, как показано на фиг. 15B. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4 из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно тяжелой цепи бокоцизумаба с не более чем 3, 2 или 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одном или нескольких из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4 из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно легкой цепи бокоцизумаба с не более чем 3, 2, 1 аминокислотной заменой (например, консервативными заменами) в одном или нескольких из FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно тяжелой цепи бокоцизумаба; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую FR1, FR2, FR3 и FR4, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или 100% идентична FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно легкой цепи бокоцизумаба, как показано на фиг. 15B. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VH бокоцизумаба; и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере

98% или больше идентична VL бокоцизумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит VH, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH бокоцизумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VH бокоцизумаба; и VL, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL бокоцизумаба; и аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше идентична VL бокоцизумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 представляет собой бокоцизумаб.

**[0141]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой антитело к PCSK9, которое содержит одну или несколько (в том числе все 6) CDR из конструкций антител, показанных на любой одной или нескольких из фиг. 14, 15A, 15B, 16, 17, 18 и 19. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой антитело к PCSK9, которое содержит одну или несколько из аминокислотных тяжелых и/или легких цепей, показанных на фиг. 14, 15A, 15B, 16, 17, 18 и 19. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой антитело к PCSK9, которое содержит одну или несколько из аминокислотных тяжелых цепей, переменных областей и/или CDR, показанных на фиг. 14, 15A, 15B, 16, 17, и соответствующих аминокислотных легких цепей, переменных областей и/или CDR, показанных на фиг. 14, 15A, 15B, 18 и 19. В некоторых вариантах осуществления можно использовать антитела, которые включают любую одну или несколько из CDR антител, отмеченных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления можно использовать антитела, которые содержат переменные области тяжелой и легкой цепей антител, отмеченных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентично по аминокислотной последовательности антителу, указанному в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 выбрано из антител, представленных в US8062640 (например, HCVR/LCVR=SEQ ID NO:90/92), US8501184 (например, REGN728, HCVR/LCVR=SEQ ID NO:218/226), US8080243 (например, бокоцизумаб, HCVR/LCVR=SEQ ID NO:54/53), US8188234 (например, 1D05, HCVR/LCVR=SEQ ID NO:11/27), US8188233 (например, 1B20, HCVR/LCVR=SEQ ID NO:11/27), LGT209, представленного в US8710192, US2011/0142849 и US2013/0315927, и RG7652, представленного в US2012/0195910, LY3015014, представленного в US8530414 (HCVR/LCVR=SEQ ID NO:7/8), полное содержание каждого из которых настоящим включено посредством ссылки, включая раскрытие конкретно указанных ингибиторов PCSK9.

**[0142]** В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных мутаций в одной или нескольких CDR (включая HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3) и/или любой из каркасных

областей любой из легких цепей или тяжелых цепей, показанных на фиг. 14, 15A, 15B, 16, 17, 18 и 19. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит любую из легких цепей или тяжелых цепей, показанных на фиг. 14, 15A, 15B, 16, 17, 18 и 19, но где любая из CDR (включая HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3) представляет собой варианты раскрытых последовательностей, так что каждая из CDR независимо на по меньшей мере 80, 85 или 90% идентична соответствующей последовательности, представленной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в любом содержащем мутацию положении находится консервативная замена. В некоторых вариантах осуществления консервативная мутация представляет собой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 1.0.

**[0143]** В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит не более чем 3, 2 или 1 мутацию в одной или нескольких CDR (включая HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3) и/или одной или нескольких каркасных областях относительно аминокислотной последовательности, кодируемой вариабельной областью последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит CDR (включая HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3), каждая из которых независимо на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или более идентична соответствующей CDR, кодируемой последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит FR легкой цепи (включая FR1, FR2, FR3 и/или FR4) и/или FR тяжелой цепи (включая FR1, FR2, FR3 и/или FR4), каждая из которых независимо на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или приблизительно 100% идентична соответствующей FR, кодируемой последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит: (i) вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую зародышевой линией человека VH1-18 и JH6B, с не более чем 3, 2 или 1 мутацией в одной или нескольких CDR (включая HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3) и/или одной или нескольких каркасных областях относительно аминокислотной последовательности, кодируемой зародышевой линией человека VH1-18 и JH6B; и (ii) вариабельную область легкой цепи, кодируемую зародышевой линией человека V1-4 и J12, с не более чем 3, 2 или 1 мутацией в одном или нескольких CDR (включая LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3) и/или одной или нескольких каркасных областях относительно аминокислотной последовательности, кодируемой зародышевой линией человека V1-4 и J12. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую зародышевой линией человека VH1-18 и JH6B, с не более чем 3, 2 или 1 мутацией в одной или нескольких CDR (включая HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3) и/или одной или нескольких каркасных областях относительно аминокислотной последовательности, кодируемой зародышевой линией человека VH1-18 и JH6B. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую зародышевой линией человека VH1-18 и JH6B, где каждая



CDR (включая HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3) независимо на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или больше идентична соответствующей CDR, кодируемой зародышевой линией человека VH1-18 и JH6B. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область тяжелой цепи, кодируемую зародышевой линией человека VH1-18 и JH6B, где каждая FR (включая FR1, FR2, FR3 и/или FR4) независимо на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или больше идентична соответствующей FR, кодируемой зародышевой линией человека VH1-18 и JH6B. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область легкой цепи, кодируемую зародышевой линией человека V1-4 и JL2, с не более чем 3, 2 или 1 мутацией в одной или нескольких CDR (включая LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3) и/или одной или нескольких каркасных областях относительно аминокислотной последовательности, кодируемой зародышевой линией человека V1-4 и JL2. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область легкой цепи, кодируемую зародышевой линией человека V1-4 и JL2, где каждая CDR (включая LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3) независимо на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или больше идентична соответствующей CDR, кодируемой зародышевой линией человека V1-4 и JL2. В некоторых вариантах осуществления антитело к PCSK9 содержит переменную область легкой цепи, кодируемую зародышевой линией человека V1-4 и JL2, где каждая FR (включая FR1, FR2, FR3 и/или FR4) независимо на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или больше идентична соответствующей FR, кодируемой зародышевой линией человека V1-4 и JL2. В некоторых вариантах осуществления любая мутация представляет собой консервативную замену. В некоторых вариантах осуществления консервативная мутация представляет собой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 1.0.

**[0144]** В некоторых вариантах осуществления мутации в CDR и/или каркасных областях сохраняют остатки, которые образуют поверхность контакта для взаимодействия со связанным белком PCSK9 в исходном антителе. Остатки переменной области антитела к PCSK9, которые образуют поверхность контакта для взаимодействия со связанным белком PCSK9, известны и раскрыты, например, в примере 30 публикации заявки на патент США № 2009/0142352, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0145]** Антитела к PCSK9 по настоящему изобретению могут содержать любую подходящую константную область, известную из уровня техники. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, человеческую константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, человеческую константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа.

**[0146]** Известны методики получения антитела другого подкласса или изотипа из

представляющего интерес антитела, т. е. переключения подкласса. Таким образом, антитела изотипа IgG могут быть получены, например, из антитела изотипа IgM, и наоборот. Такие методики позволяют получать новые антитела, которые обладают антигенсвязывающими свойствами данного антитела (исходного антитела), но также проявляют биологические свойства, ассоциированными с изотипом или подклассом антитела, отличным от такового исходного антитела. Можно использовать методики на основе рекомбинантной ДНК. В таких процедурах можно использовать клонированную ДНК, кодирующую конкретные полипептиды антител, например, ДНК, кодирующую константный домен антитела требуемого изотипа. См., например, Lanitto et al., *Methods Mol. Biol.* 178:303-16 (2002).

**[0147]** В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 по настоящему изобретению дополнительно содержит константные домены легкой каппа- или лямбда-цепи или их фрагмент. Иллюстративные последовательности константных областей легкой цепи представлены на фиг. 20 и в целом общеизвестны из уровня техники. В другом варианте осуществления антитело к PCSK9 по настоящему изобретению дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи или его фрагмент, такой как константная область тяжелой цепи изотипа IgG1 или IgG2. В другом варианте осуществления антитело к PCSK9 по настоящему изобретению дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи или его фрагмент, такой как константные области тяжелой цепи изотипа IgG2 или IgG4, примеры аминокислотных последовательностей которых представлены на фиг. 20.

**[0148]** Антитела к PCSK9 по настоящему изобретению предусматривают антитела, характеризующиеся требуемым изотипом (например, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE и IgD), а также их фрагменты Fab или F(ab')<sub>2</sub>. Кроме того, если требуется IgG4, также может потребоваться введение точечной мутации в шарнирную область, как описано в Bloom et al., 1997, *Protein Science* 6:407 (включена в данный документ посредством ссылки), для уменьшения тенденции к образованию дисульфидных связей внутри H-цепи, которые могут приводить к гетерогенности антител изотипа IgG4.

#### Получение антител

**[0149]** Антитела по настоящему изобретению могут быть получены с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, путем иммунизации животного (например, мыши, или крысы или кролика), а затем путем иммортализации клеток селезенки, собранных от животного после завершения протокола иммунизации. Клетки селезенки могут быть иммортализованы с применением любой методики, известной из уровня техники, например, путем их слияния с клетками миеломы с получением гибридом. См., например, *Antibodies*; Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, например, 1<sup>е</sup> издание, 1988 г., или, например, 2<sup>е</sup> издание, 2014 г.).

**[0150]** В одном варианте осуществления гуманизованное моноклональное антитело содержит переменный домен мышинового антитела (или весь антигенсвязывающий сайт, или его часть) и константный домен, полученный из

человеческого антитела. В качестве альтернативы фрагмент гуманизированного антитела может содержать антигенсвязывающий сайт мышиногo моноклонального антитела и фрагмент вариабельного домена (без антигенсвязывающего сайта), полученный из человеческого антитела. Процедуры получения сконструированных моноклональных антител включают процедуры, описанные в Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323, Liu et al., 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:3439, Larrick et al., 1989, *Bio/Technology* 7:934, и Winter et al., 1993, *TIPS* 14:139. В одном варианте осуществления химерное антитело представляет собой CDR-привитое антитело. Методики гуманизации антител обсуждаются, например, в патентах США №№ 5869619; 5225539; 5821337; 5859205; 6881557, Padlan et al., 1995, *FASEB J.* 9:133-39, Tamura et al., 2000, *J. Immunol.* 164:1432-41, Zhang, W., et al., *Molecular Immunology.* 42(12):1445-1451, 2005; Hwang W. et al., *Methods.* 36(1):35-42, 2005; Dall'Acqua WF, et al., *Methods* 36(1):43-60, 2005; и Clark, M., *Immunology Today.* 21(8):397-402, 2000.

**[0151]** Антитело по настоящему изобретению также может представлять собой полностью человеческое моноклональное антитело. Полностью человеческие моноклональные антитела могут быть получены с помощью множества методик, с которыми будут знакомы специалисты средней квалификации в данной области техники. Такие способы включают без ограничения трансформацию вирусом Эпштейна-Барр (EBV) клеток периферической крови человека (например, содержащих В-лимфоциты), *in vitro* иммунизацию В-клеток человека, слияние клеток селезенки от иммунизированных трансгенных мышей, несущих введенные гены иммуноглобулинов человека, выделение из фаговых библиотек V-области иммуноглобулинов человека или другие процедуры, известные из уровня техники и основанные на раскрытии в данном документе.

**[0152]** Были разработаны процедуры для получения человеческих моноклональных антител у отличных от человека животных. Например, были получены мыши, у которых один или несколько эндогенных генов иммуноглобулинов были инактивированы различными способами. Гены иммуноглобулина человека были введены в мышей для замены инактивированных мышинных генов. В этой методике элементы локуса тяжелой и легкой цепи человека вводят в линии мышей, полученных за счет линий эмбриональных стволовых клеток, которые содержат целенаправленные нарушения эндогенных локусов тяжелой цепи и легкой цепи (см. также Bruggemann et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-58 (1997)). Например, трансгены иммуноглобулина человека могут представлять собой минигенные конструкции или транслокусы на искусственных хромосомах дрожжей, которые подвергаются специфической для В-клеток реаранжировке ДНК и гипермутации в лимфоидной ткани мыши.

**[0153]** Антитела, продуцируемые в животном, включают полипептидные цепи иммуноглобулина человека, кодируемые генетическим материалом человека, введенным в животное. В одном варианте осуществления отличное от человека животное, такое как трансгенная мышь, иммунизируют с помощью подходящего иммуногена.

**[0154]** Примеры методик получения и применения трансгенных животных для

получения человеческих или частично человеческих антител описаны в патентах США №№ 5814318, 5569825 и 5545806, Davis et al., Production of human antibodies from transgenic mice в Lo, ed. *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Humana Press, NJ:191-200 (2003), Kellermann et al., 2002, *Curr Opin Biotechnol.* 13:593-97, Russel et al., 2000, *Infect Immun.* 68:1820-26, Gallo et al., 2000, *Eur J Immun.* 30:534-40, Davis et al., 1999, *Cancer Metastasis Rev.* 18:421-25, Green, 1999, *J Immunol Methods.* 231:11-23, Jakobovits, 1998, *Advanced Drug Delivery Reviews* 31:33-42, Green et al., 1998, *J Exp Med.* 188:483-95, Jakobovits A, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 7:607-14, Tsuda et al., 1997, *Genomics.* 42:413-21, Mendez et al., 1997, *Nat Genet.* 15:146-56, Jakobovits, 1994, *Curr Biol.* 4:761-63, Arbones et al., 1994, *Immunity.* 1:247-60, Green et al., 1994, *Nat Genet.* 7:13-21, Jakobovits et al., 1993, *Nature.* 362:255-58, Jakobovits et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2551-55. Chen, J., M. Trounstine, F. W. Alt, F. Young, C. Kurahara, J. Loring, D. Huszar. "Immunoglobulin gene rearrangement in B-cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus." *International Immunology* 5 (1993): 647-656, Choi et al., 1993, *Nature Genetics* 4: 117-23, Fishwild et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-51, Harding et al., 1995, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-59, Lonberg, 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies* в *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101, Lonberg et al., 1995, *Internal Review of Immunology* 13: 65-93, Neuberger, 1996, *Nature Biotechnology* 14: 826, Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Research* 20: 6287-95, Taylor et al., 1994, *International Immunology* 6: 579-91, Tomizuka et al., 1997, *Nature Genetics* 16: 133-43, Tomizuka et al., 2000, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 722-27, Tuaille et al., 1993, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 3720-24, и Tuaille et al., 1994, *Journal of Immunology* 152: 2912-20.; Lonberg et al., *Nature* 368:856, 1994; Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579, 1994; патенте США № 5877397; Bruggemann et al., 1997 *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-58; Jakobovits et al., 1995 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:525-35. Кроме того, протоколы с использованием XenoMouse® (Abgenix, в настоящее время Amgen, Inc.) описаны, например, в US 05/0118643 и WO 05/694879, WO 98/24838, WO 00/76310 и патенте США 7064244.

**[0155]** Лимфоидные клетки от иммунизированных трансгенных мышей сливают с клетками миеломы, например, с получением гибридом. Клетки миеломы для применения в процедурах слияния для получения гибридомы предпочтительно представляют собой клетки, которые не продуцируют антитела, обладают высокой эффективностью слияния и характеризуются дефицитами ферментов, что делает их неспособными к росту в определенных селективных средах, которые поддерживают рост только требуемых слитых клеток (гибридом). Примеры подходящих линий клеток для применения в таких процедурах слияния включают Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 и S194/5XX0 Bul; примеры линий клеток, используемых в продуктах слияния с клетками крыс, включают R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 4B210. Другие линии клеток, применяемые для процедур слияния клеток, представляют собой U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6.

**[0156]** Лимфоидные клетки (например, клетки селезенки) и клетки миеломы могут быть объединены на несколько минут со средством, способствующим слиянию мембран, таким как полиэтиленгликоль или неионогенный детергент, а затем высеяны при низкой плотности на селективную среду, которая поддерживает рост клеток гибридомы, но не поддерживает рост неслитых клеток миеломы. Одна селективная среда представляет собой НАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин). После достаточного количества времени, обычно приблизительно одну-две недели, наблюдаются колонии клеток. Отдельные колонии выделяют и антитела, продуцируемые клетками, могут тестировать в отношении активности связывания, например, с PCSK9 человека с использованием любого из множества иммуноанализов, известных из уровня техники и описанных в данном документе. Гибридомы клонируют (например, путем клонирования с ограниченным разведением или путем выделения бляшек из мягкого агара) и отбирают и культивируют положительные клоны, которые продуцируют антитело, специфическое, например, для PCSK9 человека. Моноклональные антитела из культур гибридомы могут быть выделены из супернатантов культур гибридомы. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены гибридомы, которые содержат полинуклеотиды, кодирующие ингибиторы PCSK9 по настоящему изобретению в хромосомах клетки. Эти гибридомы можно культивировать в соответствии со способами, описанными в данном документе и известными из уровня техники.

**[0157]** Другой способ получения человеческих антител по настоящему изобретению включает иммортализацию клеток периферической крови человека путем трансформации EBV. См., например, патент США № 4464456. Такая иммортализованная линия В-клеток (или линия лимфобластоидных клеток), продуцирующая моноклональное антитело, которое специфически связывается, например, с PCSK9 человека, может быть идентифицирована с помощью способов иммунодетекции, представленных в данном документе, например ELISA, а затем выделена с помощью стандартных методик клонирования. Стабильность линий лимфобластоидных клеток, продуцирующих антитело, может быть улучшена путем слияния линии трансформированных клеток с клетками мышины миеломы с получением линии гибридных клеток мыш-человек в соответствии со способами, известными из уровня техники (см., например, Glasky et al., *Hybridoma* 8:377-89 (1989)). Еще одним способом получения человеческих моноклональных антител является *in vitro* иммунизация, которая включает примирование В-клеток селезенки человека с помощью антигена с последующим слиянием примированных В-клеток с гетерогибридным партнером по слиянию. См., например, Voerner et al., 1991 *J. Immunol.* 147:86-95.

**[0158]** В определенных вариантах осуществления отбирают В-клетку, которая продуцирует требуемое антитело, и переменные области легкой цепи и тяжелой цепи клонируют из В-клетки в соответствии с методиками молекулярной биологии, известными из уровня техники (WO 92/02551; патент США № 5627052); Babcook et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-48 (1996)) и описанными в данном документе. В-клетки

от иммунизированного животного могут быть выделены из селезенки, лимфатического узла или образца периферической крови путем отбора клетки, которая продуцирует требуемое антитело. В-клетки также могут быть выделены у человека, например, из образца периферической крови. Способы обнаружения отдельных В-клеток, которые продуцируют антитело с требуемой специфичностью, хорошо известны из уровня техники, например, посредством образования бляшек, сортировки клеток с активацией флуоресценции, стимуляции *in vitro* с последующим обнаружением специфического антитела и т. п. Способы отбора В-клеток, продуцирующих специфические антитела, включают, например, приготовление суспензии отдельных клеток из В-клеток в мягком агаре, который содержит антиген. Связывание специфического антитела, продуцируемого В-клеткой, с антигеном приводит к образованию комплекса, который может быть визуализирован в виде иммунопреципитата. После отбора В-клеток, продуцирующих требуемое антитело, гены специфического антитела можно клонировать путем выделения и амплификации ДНК или мРНК в соответствии со способами, известными из уровня техники и описанными в данном документе.

**[0159]** Дополнительным способом получения антител по настоящему изобретению является фаговый дисплей. См., например, Winter et al., 1994 *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-55; Burton et al., 1994 *Adv. Immunol.* 57:191-280. Комбинаторные библиотеки генов варибельной области иммуноглобулина человека или мыши могут быть созданы в фаговых векторах, которые можно подвергать скринингу для отбора фрагментов Ig (Fab, Fv, sFv или их мультимеров), которые специфически связываются с PCSK9 или его вариантом или фрагментом. См., например, патент США № 5223409; Huse et al., 1989 *Science* 246:1275-81; Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728-32 (1989); Alting-Mees et al., *Strategies in Molecular Biology* 3:1-9 (1990); Kang et al., 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363-66; Hoogenboom et al., 1992 *J. Molec. Biol.* 227:381-388; Schlebusch et al., 1997 *Hybridoma* 16:47-52, и литературные источники, цитируемые в них. Например, библиотека, содержащая множество полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты варибельной области Ig, может быть встроена в геном нитчатого бактериофага, такого как M13 или его вариант, в рамке считывания с последовательностью, кодирующей белок оболочки фага. Слитый белок может представлять собой слитый продукт белка оболочки с доменом варибельной области легкой цепи и/или с доменом варибельной области тяжелой цепи. В соответствии с определенными вариантами осуществления фрагменты Fab иммуноглобулина также могут быть представлены на фаговой частице (см., например, патент США № 5698426).

**[0160]** Библиотеки экспрессии кДНК тяжелых и легких цепей иммуноглобулина также могут быть получены в фаге лямбда, например, с использованием векторов  $\lambda$ ImmunoZap<sup>TM</sup>(H) и  $\lambda$ ImmunoZap<sup>TM</sup>(L) (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния, США). Вкратце, мРНК выделяют из популяции В-клеток и используют для создания библиотек экспрессии кДНК тяжелых и легких цепей иммуноглобулина в векторах  $\lambda$ ImmunoZap(H) и  $\lambda$ ImmunoZap(L). Эти векторы можно подвергать скринингу по отдельности или

экспрессировать совместно для образования фрагментов Fab или антител (см. Huse et al., выше; см. также Sastry et al., выше). Впоследствии положительные бляшки можно преобразовать в нелитическую плазмиду, которая обеспечивает высокий уровень экспрессии фрагментов моноклонального антитела в *E. coli*.

**[0161]** В одном варианте осуществления в гибридоме переменные области гена, экспрессирующего представляющее интерес моноклональное антитело, амплифицируют с использованием нуклеотидных праймеров. Эти праймеры могут быть синтезированы специалистом средней квалификации в данной области техники или могут быть приобретены из коммерчески доступных источников. (См., например, Stratagene (Ла-Хойя, Калифорния, США), которая продает праймеры для мышинных и человеческих переменных областей, включая, среди прочего, праймеры для областей  $V_{H\alpha}$ ,  $V_{H\beta}$ ,  $V_{H\gamma}$ ,  $V_{H\delta}$ ,  $C_{H1}$ ,  $V_L$  и  $C_L$ ). Эти праймеры можно применять для амплификации переменных областей тяжелой или легкой цепи, которые затем можно встраивать в векторы, такие как ImmunoZAP<sup>TM</sup>H или ImmunoZAP<sup>TM</sup>L (Stratagene) соответственно. Затем эти векторы можно вводить в системы на основе *E. coli*, дрожжей или клеток млекопитающих для экспрессии. С использованием этих способов можно получить большие количества одноцепочечного белка, содержащего слитый продукт из доменов  $V_H$  и  $V_L$  (см. Bird et al., Science 242:423-426, 1988).

**[0162]** В определенных вариантах осуществления ингибиторы PCSK9 (например, антитела к PCSK9) по настоящему изобретению получают от трансгенных животных (например, мышей), которые продуцируют антитела "только с тяжелой цепью" или "НСАб". НСАб аналогичны встречающимся в природе одноцепочечным антителам VHH верблюда и ламы.

**[0163]** См., например, патенты США №№ 8507748 и 8502014 и публикации заявки на патент США №№ US2009/0285805A1, US2009/0169548A1, US2009/0307787A1, US2011/0314563A1, US2012/0151610A1, WO2008/122886A2 и WO2009/013620A2.

**[0164]** После того как клетки, продуцирующие антитела в соответствии с настоящим изобретением, были получены с использованием любой из описанных выше методик иммунизации и других методик, гены специфических антител могут быть клонированы путем выделения и амплификации ДНК или мРНК из них в соответствии со стандартными процедурами, описанными в данном документе. Антитела, полученные из них, могут быть секвенированы, а CDR идентифицированы и ДНК, кодирующую CDR, можно обрабатывать, как описано ранее, с получением других антител в соответствии с настоящим изобретением.

**[0165]** В определенных вариантах осуществления антитела получают вначале с помощью идентификации антител, которые связываются с клетками, экспрессирующими, например, PCSK9 человека, и/или конкурируют за связывание с антителами, описанными в настоящей заявке.

**[0166]** Специалисту в данной области техники будет понятно, что некоторые белки, такие как антитела, могут подвергаться множеству посттрансляционных модификаций.

Тип и степень этих модификаций зачастую зависят от линии клетки-хозяина, используемой для экспрессии белка, а также условий культивирования. Такие модификации могут включать вариации в гликозилировании, окислении метионина, образовании дикетопиперазина, изомеризации аспартата и дезамидировании аспарагина. Частой модификацией является потеря карбоксиконцевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) вследствие действия карбоксипептидаз (как описано в Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995).

**[0167]** Альтернативным способом получения мышинового моноклонального антитела является инъекция клеток гибридомы в брюшную полость сингенной мыши, например, мыши, которая была обработана (например, примирована пристаном) для стимуляции образования асцитной жидкости, содержащей моноклональное антитело. Моноклональные антитела можно выделять и очищать с помощью множества хорошо известных методик. Такие методики выделения включают аффинную хроматографию с белком А-сефарозой, эксклюзионную хроматографию и ионообменную хроматографию (см., например, Coligan, на стр. 2.7.1-2.7.12 и стр. 2.9.1-2.9.3; Vaines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", в *Methods in Molecular Biology*, т. 10, стр. 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)). Моноклональные антитела могут быть очищены посредством аффинной хроматографии с использованием подходящего лиганда, выбранного на основании конкретных свойств антитела (например, изотипа тяжелой или легкой цепи, специфичности связывания и т. д.). Примеры подходящего лиганда, иммобилизованного на твердой подложке, включают белок А, белок G, антитело к константной области (легкой цепи или тяжелой цепи), антиидиотипическое антитело и белок, связывающий TGF-бета, или его фрагмент или вариант.

**[0168]** Молекулярную эволюцию определяющих комплементарность областей (CDR) в центре сайта связывания антитела также использовалась для выделения антител с повышенной аффинностью, например, антител, описанных в Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551. Соответственно, такие методики применимы при получении антител по настоящему изобретению.

**[0169]** Хотя человеческие, частично человеческие или гуманизированные антитела будут подходить для многих вариантов применения, в частности тех, в которых предусматривается введение антитела субъекту-человеку, для определенных вариантов применения будут подходить другие типы антител. Отличные от человеческих антитела по настоящему изобретению, например, могут быть получены от любого животного, продуцирующего антитела, такого как мышь, крыса, кролик, коза, осел или отличный от человека примат (например, обезьяна, такая как яванский макак или макак-резус, или человекообразная обезьяна (например, шимпанзе)). Отличные от человеческих антитела по настоящему изобретению можно применять, например, в вариантах применения *in vitro* и на основе культур клеток, или в любом другом варианте применения, где иммунный ответ на антитело по настоящему изобретению не возникает, является незначительным, может быть предупрежден, не является проблемой или требуется. Антитело от



конкретного вида может быть получено, например, путем иммунизации животного этого вида с помощью требуемого иммуногена или с использованием искусственной системы для получения антител этого вида (например, системы на основе бактериального или фагового дисплея для получения антител конкретного вида), или путем превращения антитела от одного вида в антитело от другого вида путем замены, например, константной области антитела константной областью от другого вида, или путем замены одного или нескольких аминокислотных остатков антитела, чтобы оно больше напоминало последовательность антитела от другого вида. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело, содержащее аминокислотные последовательности, полученные из антител от двух или более различных видов.

**[0170]** Антитела также могут быть получены с помощью любой из ряда других общепринятых методик. Например, они могут быть очищены из клеток, которые естественным образом их экспрессируют (например, антитело может быть очищено из гибридомы, которая его продуцирует), или получены в рекомбинантных системах экспрессии с использованием любой методики, известной из уровня техники. См., например, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kenneth et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); и *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

**[0171]** Если требуется улучшить аффинность антител в соответствии с настоящим изобретением, содержащих одну или несколько из вышеупомянутых CDR, их можно получить с помощью ряда протоколов созревания аффинности, включая поддержание CDR (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), шаффлинг цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), использование мутационных штаммов *E. coli*. (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 350-368, 1996), шаффлинг ДНК (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 7-88, 1996) и дополнительные методики ПЦР (Cramer, et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Все эти способы созревания аффинности обсуждаются в Vaughan et al. (*Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998).

**[0172]** Одноцепочечные антитела могут быть образованы путем связывания фрагментов переменного домена тяжелой и легкой цепей (области Fv) посредством аминокислотного мостика (короткого пептидного линкера), в результате чего образуется единая полипептидная цепь. Такие одноцепочечные Fv (scFv) были получены путем слияния ДНК, кодирующей пептидный линкер между ДНК, кодирующими полипептиды двух переменных доменов ( $V_L$  и  $V_H$ ). Полученные полипептиды могут заворачиваться сами на себя с образованием антигенсвязывающих мономеров, или они могут образовывать мультимеры (например, димеры, тримеры или тетрамеры) в зависимости от длины гибкого линкера между двумя переменными доменами (Kortt et al., 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108). Посредством комбинирования различных полипептидов, содержащих  $V_L$  и  $V_H$ , можно образовать мультимерные scFv, которые связываются с разными эпитопами (Kriangkum et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40).

Методики, разработанные для получения одноцепочечных антител, включают методики, описанные в патенте США № 4946778; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879; Ward et al., 1989, *Nature* 334:544, de Graaf et al., 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-87.

**[0173]** Антигенсвязывающие фрагменты, получаемые из антитела, также можно получать, например, посредством протеолитического гидролиза антитела, например, расщепления пепсином или папаином целых антител в соответствии с общепринятыми способами. Например, фрагменты антител могут быть получены посредством ферментативного расщепления антител пепсином с получением 5S-фрагмента, называемого F(ab')<sub>2</sub>. Этот фрагмент можно дополнительно расщепить с использованием тиол-восстанавливающего средства с получением моновалентных фрагментов 3.5S Fab'. Необязательно реакцию расщепления можно проводить с использованием блокирующей группы для сульфгидрильных групп, которые образуются в результате расщепления дисульфидных связей. В качестве альтернативы ферментативное расщепление с использованием папаина напрямую приводит к двум моновалентным фрагментам Fab и фрагменту Fc. Эти способы описаны, например, в Goldenberg, патент США № 4331647, Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman et al., в *Methods in Enzymology* 1:422 (Academic Press 1967); и Andrews, S.M. and Titus, J.A. В *Current Protocols in Immunology* (Coligan J.E., et al., eds), John Wiley & Sons, New York (2003), стр. 2.8.1-2.8.10 и 2.10A.1-2.10A.5. Также можно использовать другие способы расщепления антител, такие как разделение тяжелых цепей с образованием моновалентных фрагментов легкая-тяжелая цепь (Fd), дополнительное расщепление фрагментов или другие ферментативные, химические или генетические методики, при условии, что фрагменты связываются с антигеном, который распознается интактным антителом.

**[0174]** Другой иллюстративной формой антитела является пептид, содержащий одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) антитела. CDR можно получить путем конструирования полинуклеотидов, которые кодируют представляющую интерес CDR. Такие полинуклеотиды получают, например, с использованием полимеразной цепной реакции для синтеза вариабельной области с использованием мРНК клеток продуцирующих антитела, в качестве матрицы (см., например, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," в *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), стр. 166 (Cambridge University Press 1995); и Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," в *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (eds.), стр. 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)). Фрагмент антитела может дополнительно содержать по меньшей мере один домен вариабельной области антитела, описанного в данном документе. Так, например, домен V-области может быть мономерным и представлять собой домен V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>, который способен независимо связывать требуемую мишень (например, PCSK9 человека)

с аффинностью, по меньшей мере равной  $10^{-7}$  М или меньше, как описано в данном документе.

**[0175]** Вариабельная область может представлять собой любой встречающийся в природе вариабельный домен или его сконструированную версию. Под сконструированной версией подразумевается вариабельная область, которая была создана с использованием методик конструирования рекомбинантной ДНК. Такие сконструированные версии включают те, которые созданы, например, из вариабельной области специфического антитела с помощью вставок, делеций или изменений в аминокислотных последовательностях специфического антитела или в отношении них. Специалист средней квалификации в данной области техники может использовать любые известные способы для идентификации аминокислотных остатков, подходящих для конструирования. Дополнительные примеры включают сконструированные вариабельные области, содержащие по меньшей мере одну CDR и необязательно одну или несколько каркасных аминокислот из первого антитела и остальную часть домена вариабельной области из второго антитела. Сконструированные версии вариабельных доменов антител могут быть сконструированы с помощью любого количества методик, которые хорошо знакомы специалистам средней квалификации в данной области техники.

**[0176]** Вариабельная область может быть ковалентно присоединена С-концевой аминокислотой к по меньшей мере одному другому домену антитела или его фрагменту. Так, например,  $V_H$ , который присутствует в вариабельной области, может быть связан с доменом  $CH1$  иммуноглобулина. Аналогично домен  $V_L$  может быть связан с доменом  $C_K$ . Таким образом, например, антитело может представлять собой фрагмент Fab, где антигенсвязывающий домен содержит ассоциированные домены  $V_H$  и  $V_L$ , ковалентно связанные на своих С-концах с доменами  $CH1$  и  $C_K$  соответственно. Домен  $CH1$  может быть расширен с помощью дополнительных аминокислот, например, с получением шарнирной области или части домена шарнирной области, встречающейся в фрагменте Fab', или с получением дополнительных доменов, таких как домены  $CH2$  и  $CH3$  антитела.

#### Производные и варианты

**[0177]** Нуклеотидные последовательности антител к PCSK9 по настоящему изобретению, кодирующие соответствующие аминокислотные последовательности антител по настоящему изобретению, могут быть изменены, например, посредством случайного мутагенеза или посредством сайт-направленного мутагенеза (например, олигонуклеотид-направленного сайт-специфического мутагенеза) для создания измененного полинуклеотида, содержащего одну или несколько конкретных нуклеотидных замен, делеций или вставок по сравнению с не содержащим мутацию полинуклеотидом. Примеры методик для создания таких изменений описаны в Walder et al., 1986, Gene 42:133; Bauer et al. 1985, Gene 37:73; Craik, BioTechniques, January 1985, 12-19; Smith et al., 1981, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press; и патентах США №№ 4518584 и 4737462. Эти и другие способы можно использовать для получения, например, производных антител, которые характеризуются требуемым свойством,

например, повышенной аффинностью, авидностью или специфичностью в отношении требуемой мишени, повышенной активностью или стабильностью *in vivo* или *in vitro* или сниженными побочными эффектами *in vivo* по сравнению с недериватизированным антителом.

**[0178]** Другие производные антител, попадающие в объем настоящего изобретения, включают ковалентные или агрегированные конъюгаты антител с другими белками или полипептидами, такими как полученные при экспрессии рекомбинантных слитых белков, содержащих гетерологичные полипептиды, слитые с N-концом или C-концом полипептида. Например, конъюгированный пептид может представлять собой гетерологичный сигнальный (или лидерный) полипептид, например, лидерную последовательность альфа-фактора дрожжей, или пептид, такой как эпитопная метка. Содержащие антитело слитые белки могут содержать пептиды, добавленные для облегчения очистки или идентификации антитела (например, поли-His). Антитело также может быть связано с пептидом FLAG, как описано в Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988, и в патенте США № 5011912. Пептид FLAG является высокоантигенным и обеспечивает эпитоп, обратимо связываемый специфическим моноклональным антителом (mAb), что позволяет быстро проводить анализ и облегчать очистку экспрессированного рекомбинантного белка. Реагенты, применимые для получения слитых белков, в которых пептид FLAG слит с данным полипептидом, являются коммерчески доступными (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США).

**[0179]** В другом варианте осуществления олигомеры, которые содержат одно или несколько антител, можно использовать в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения. Олигомеры могут находиться в форме ковалентно связанных или нековалентно связанных димеров, тримеров или высших олигомеров. Предусматриваются для применения олигомеры, содержащие два или более антител, при этом одним примером является гомодимер. Другие олигомеры включают гетеродимеры, гомотримеры, гетеротримеры, гомотетрамеры, гетеротетрамеры и т. д.

**[0180]** Один вариант осуществления направлен на олигомеры, содержащие несколько антител, соединенных посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий между пептидными фрагментами, слитыми с антителами. Такие пептиды могут представлять собой пептидные линкеры (спейсеры) или пептиды, которые характеризуются свойством стимуляции олигомеризации. Лейциновые застёжки и определенные полипептиды, полученные из антител, входят в число пептидов, которые могут стимулировать олигомеризацию антител, присоединенных к ним, как более подробно описано ниже.

**[0181]** В конкретных вариантах осуществления олигомеры содержат от двух до четырех антител. Антитела олигомера могут находиться в любой форме, такой как любая из форм, описанных выше, например, вариантов.

**[0182]** В одном варианте осуществления олигомер получают с применением полипептидов, полученных из иммуноглобулинов. Получение слитых белков,

содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (в том числе Fc-доменом), было описано, например, Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; и Hollenbaugh et al., 1992, "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в Current Protocols in Immunology, Прил. 4, стр. 10.19.1-10.19.11.

**[0183]** Один вариант осуществления настоящего изобретения направлен на димер, содержащий два слитых белка, созданных путем слияния антигенсвязывающего фрагмента антитела к PCSK9 с Fc-областью антитела. Димер можно получить, например, путем вставки слитого гена, кодирующего слитый белок, в соответствующий вектор экспрессии, экспрессии слитого гена в клетках-хозяевах, трансформированных с помощью рекомбинантного вектора экспрессии, и обеспечения для экспрессированного слитого белка сборки подобно молекулам антител, после чего между фрагментами Fc образуются межцепочечные дисульфидные связи с образованием димера.

**[0184]** Применяемый в данном документе термин "Fc-полипептид" включает нативные и мутантные формы полипептидов, полученных из Fc-области антитела. Также включены усеченные формы таких полипептидов, содержащие шарнирную область, которая способствует димеризации. Слитые белки, содержащие фрагменты Fc (и олигомеры, образованные из них), обеспечивают преимущество, заключающееся в легкой очистке с помощью аффинной хроматографии на колонках с белком А или белком G.

**[0185]** Один подходящий полипептид Fc, описанный в заявке согласно PCT WO 93/10151 (включенной в данный документ посредством ссылки), представляет собой одноцепочечный полипептид, тянущийся от N-конца шарнирной области до нативного C-конца Fc-области человеческого антитела изотипа IgG1. Другим применимым полипептидом Fc является Fc-мутеин, описанный в патенте США № 5457035 и в Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. Аминокислотная последовательность этого мутеина идентична последовательности нативной Fc, представленной в WO 93/10151, за исключением того, что аминокислота 19 была изменена с Leu на Ala, аминокислота 20 была изменена с Leu на Glu, а аминокислота 22 была изменена с Gly на Ala. Мутеин проявляет сниженную аффинность в отношении рецепторов Fc.

**[0186]** В некоторых вариантах осуществления переменная часть тяжелой и/или легкой цепей требуемого антитела может быть заменена переменной частью тяжелой и/или легкой цепи антитела.

**[0187]** В качестве альтернативы олигомер представляет собой слитый белок, содержащий несколько антител, с пептидными линкерами (спейсерными пептидами) или без них. К подходящим пептидным линкерам относятся описанные в патентах США №№ 4751180 и 4935233.

**[0188]** Другой способ получения олигомерных антител предусматривает применение лейциновой застежки. Домены лейциновой застежки представляют собой пептиды, которые способствуют олигомеризации белков, в которых они находятся. Лейциновые застежки были первоначально идентифицированы в нескольких ДНК-

связывающих белках (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759) и с тех пор были обнаружены во множестве различных белков. К известным лейциновым застежкам относятся встречающиеся в природе пептиды и их производные, которые димеризуются или тримеризуются. Примеры доменов лейциновой застежки, подходящих для получения растворимых олигомерных белков, описаны в заявке согласно РСТ WO 94/10308, а лейциновая застежка, полученная из легочного сурфактантного белка D (SPD), описанная в Horpe et al., 1994, FEBS Letters 344:191, настоящим включенной посредством ссылки. Применение модифицированной лейциновой застежки, которая способствует стабильной тримеризации слитого с ней гетерологичного белка, описано в Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. В одном подходе рекомбинантные слитые белки, содержащие фрагмент или производное требуемого антитела, слитые с пептидом лейциновой застежки, экспрессируют в подходящих клетках-хозяевах, а растворимые олигомерные фрагменты или производные антител, которые образуются, извлекают из культурального супернатанта.

**[0189]** В другом варианте осуществления антитела могут быть конъюгированы с подходящим носителем для повышения их периода полужизни. Подходящие носители включают без ограничения Fc, альбумин, трансферрин и т. п. Эти и другие подходящие носители известны из уровня техники. Такие конъюгированные носители могут находиться в мономерной, димерной, тетрамерной или другой форме. В одном варианте осуществления один или несколько водорастворимых полимеров связаны в одном или нескольких конкретных положениях, например на аминоконце, связывающего средства. В одном примере производное антитела содержит одно или несколько добавлений на основе водорастворимых полимеров, включая без ограничения, полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль. См., например, патенты США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337. В определенных вариантах осуществления производное содержит одно или несколько из монометоксиполиэтиленгликоля, декстрана, целлюлозы или других полимеров на основе углеводов, поли-(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоля, гомополимеров пропиленгликоля, сополимера полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированных полиолов (например, глицерин) и поливинилового спирта, а также смесей таких полимеров. В определенных вариантах осуществления один или несколько водорастворимых полимеров случайным образом присоединены к одной или нескольким боковым цепям. В определенных вариантах осуществления действие PEG может заключаться в улучшении терапевтической активности связывающего средства, такого как антитело. Такие конкретные способы обсуждаются, например, в патенте США № 6133426, который настоящим включен посредством ссылки для любых целей. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть химически связаны с полимерами, липидами или другими фрагментами.

Получение антител

**[0190]** Антитела по настоящему изобретению могут быть получены посредством

любого подходящего варианта для синтеза белков (например, антител), в частности, посредством химического синтеза или предпочтительно посредством методик рекомбинантной экспрессии.

**[0191]** Для рекомбинантной экспрессии антител требуется конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитела. После того как был получен полинуклеотид, кодирующий молекулу антитела, посредством технологии рекомбинантной ДНК можно получить вектор для продуцирования антител. Конструируют вектор экспрессии, содержащий последовательности, кодирующие антитело, и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, *in vitro* методики рекомбинантной ДНК, методики синтеза и *in vivo* генетическую рекомбинацию.

**[0192]** Вектор экспрессии переносят в клетку-хозяина посредством стандартных методик, а затем трансфицированные клетки культивируют посредством стандартных методик получения антител по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи антитела, могут совместно экспрессироваться в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы иммуноглобулина, как подробно описано ниже.

**[0193]** Для экспрессии антител по настоящему изобретению можно использовать различные системы хозяин-вектор экспрессии. В таких системах хозяин-вектор экспрессии представлены носители, с помощью которых могут быть получены и впоследствии очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, но также представлены клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями могут экспрессировать молекулу антитела по настоящему изобретению *in situ*. Бактериальные клетки, такие как *E. coli*, и эукариотические клетки обычно применяют для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела, в частности, для экспрессии полной молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (СНО), в сочетании с вектором, таким как главный промежуточный промоторный элемент раннего гена из цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии для антител (Foecking et al., *Gene* 45:101 (1986); Cockett et al., *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

**[0194]** Кроме того, может быть выбран штамм клеток-хозяев, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт определенным требуемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов может быть важным для функции белка. Для разных клеток-хозяев характерны собственные и специфические механизмы для посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Для обеспечения надлежащей модификации и процессинга чужеродного экспрессируемого белка могут быть выбраны подходящие линии клеток или системы-хозяева. В связи с этим, можно применять эукариотические клетки-хозяева,

которые обладают клеточным аппаратом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева, представляющие собой клетки млекопитающих, включают без ограничения клетки CHO, COS, 293, 3T3 или клетки миеломы.

**[0195]** Для длительного высокопродуктивного получения рекомбинантных белков предпочтительна стабильная экспрессия. Например, можно сконструировать линии клеток, которые стабильно экспрессируют молекулу антитела. Вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы с помощью ДНК, контролируемой соответствующими элементами контроля экспрессии (например, промоторными, энхансерными последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т. д.) и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК для сконструированных клеток может быть обеспечен рост в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем их переводят на селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость отбору и обеспечивает стабильную интеграцию плазмиды в хромосомы клеток и их рост с образованием фокусов, которые, в свою очередь, можно клонировать и размножить в линии клеток. Этот способ можно успешно применять для создания линий клеток, которые экспрессируют молекулу антитела. Такие сконструированные линии клеток могут быть особенно применимы для скрининга и оценки соединений, которые непосредственно или опосредованно взаимодействуют с молекулой антитела.

**[0196]** Можно использовать ряд систем селекции, включая без ограничения гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., *Cell* 11:223 (1977)), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202 (1992)) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., *Cell* 22:817 (1980)), которые можно использовать в клетках tk, hprt или aprt соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам может применяться в качестве основы для селекции следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:357 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu and Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991)); и hygR, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre et al., *Gene* 30:147 (1984)). Для выбора требуемого рекомбинантного клона зачастую можно применять способы, широко известные в области технологии рекомбинантной ДНК, и такие способы описаны, например, в Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); и в главе 12 и 13, Dracopoli et al. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981), которые включены в данной документ посредством ссылки во всей своей полноте.



**[0197]** Уровни экспрессии молекулы антитела можно повысить за счет амплификации вектора (обзор см. в Bebbington and Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" (DNA Cloning, Vol. 3. Academic Press, New York, 1987)). Если маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, является амплифицируемым, то повышение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клеток-хозяев, будет приводить к повышению числа копий маркерного гена. Поскольку амплифицируемая область ассоциирована с геном антитела, продуцирование антитела также будет повышаться (Crouse GF et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

**[0198]** Клетку-хозяина можно трансфицировать совместно двумя векторами экспрессии, например, первым вектором, кодирующим полипептид, полученный из тяжелой цепи антитела, и вторым вектором, кодирующим полипептид, полученный из легкой цепи антитела. Два вектора могут содержать идентичные селективируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепи. В качестве альтернативы можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать, например, полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи антитела. В таких ситуациях легкая цепь должна быть помещена перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). Кодирующие последовательности тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

**[0199]** После того как молекула антитела по настоящему изобретению была продуцирована в животном, синтезирована химически или рекомбинантно экспрессирована, ее можно очистить с помощью любого способа, известного из уровня техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, аффинности в отношении специфического антигена с использованием белка А, и эксклюзионной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любой другой стандартной методики очистки белков. Кроме того, для облегчения очистки антитела по настоящему изобретению или их фрагменты могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе или иным образом известными из уровня техники.

**[0200]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает антитела, рекомбинантно слитые или химически конъюгированные (включая как ковалентные, так и нековалентные конъюгации) с полипептидом. Слитые или конъюгированные антитела по настоящему изобретению можно применять для облегчения очистки. См., например, Harbour et al., выше, и публикацию согласно PCT WO 93/21232; EP 439095; Naramura et al., Immunol. Lett. 39:91-99 (1994); патент США № 5474981; Gillies et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:1428-1432 (1992); Fell et al., J. Immunol. 146:2446-2452 (1991).

**[0201]** Более того, для облегчения очистки антитела или их фрагменты по

настоящему изобретению могут быть слиты с маркерными последовательностями, такими как пептид. В предпочтительных вариантах осуществления маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гексагистиридиновый пептид, такой как метка, обеспеченная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Чатсуорт, Калифорния, США, 91311), среди прочего, многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано в Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), например, гексагистидин обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пептидные метки, применимые для очистки, включают без ограничения метку "HA", которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинаина вируса гриппа (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)), и метку "flag".

#### Эффекторная функция антител

**[0202]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела с измененной эффекторной функцией (например, сниженной или повышенной эффекторной функцией). Неограничивающие примеры способов повышения эффекторной функции можно найти в патентах США №№ 5624821, 6602684, 7029872, публикациях заявок на патент США №№ 2006/0067930A1, 2005/0272128A1, 2005/0079605A1, 2005/0123546A1, 2004/0072290A1, 2006/0257399A1, 2004/0261148A1, 2007/0092521, 2006/0040325A1 и 2006/0039904A1, и публикациях международных патентных заявок №№ WO 04/029207, WO 03011878, WO 05044859, WO 06071856 и WO 06071280.

**[0203]** Способы конструирования Fc-областей антител для изменения эффекторных функций известны из уровня техники (например, публикация заявки на патент США № 20040185045 и публикация согласно PCT № WO 2004/016750, обе под авторством Koenig et al., в которых описано изменение Fc-области для повышения аффинности связывания с Fc-гамма R11B по сравнению с аффинностью связывания с Fc-гамма R11A, см. также публикации согласно PCT №№ WO 99/58572 под авторством Armor et al., WO 99/51642 под авторством Idusogie et al. и патент США № 6395272 под авторством Deo et al.). Способы модификации Fc-области для снижения аффинности связывания с Fc-гамма R11B также известны из уровня техники (например, публикация заявки на патент США № 20010036459 и публикация согласно PCT № WO 01/79299, обе под авторством Ravetch et al.). Также были описаны модифицированные антитела, содержащие варианты Fc-области с повышенной аффинностью связывания с Fc-гамма R11A и/или Fc-гамма R11A по сравнению с Fc-областью дикого типа (например, публикация согласно PCT № WO 2004/063351, Stavenhagen et al., раскрытие которой включено в данный документ во всей своей полноте).

**[0204]** Эффекторная функция антител также может быть модифицирована благодаря образованию антител с измененными паттернами гликозилирования. Было продемонстрировано, что, при необходимости, такие измененные паттерны гликозилирования приводят к повышению или снижению способности антител к ADCC. Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, посредством экспрессии

антитела в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования были описаны в данной области техники, и их можно применять в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела по настоящему изобретению, вследствие чего осуществляется получение антитела с измененным гликозилированием.

Изменение периода полужизни

**[0205]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые характеризуются повышенным периодом полужизни *in vivo*. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые характеризуются периодом полужизни у млекопитающего (например, без ограничения человека), превышающим 3 дня, превышающим 7 дней, превышающим 10 дней, превышающим 15 дней, превышающим 25 дней, превышающим 30 дней, превышающим 35 дней, превышающим 40 дней, превышающим 45 дней, превышающим 2 месяца, превышающим 3 месяца, превышающим 4 месяца или превышающим 5 месяцев.

**[0206]** Для продления циркуляции антител (например, моноклональных антител) или фрагментов антител (например, фрагментов Fab) в сыворотке крови *in vivo*, например, инертные полимерные молекулы, такие как высокомолекулярный полиэтиленгликоль (PEG), могут быть присоединены к антителам (включая фрагменты антител) с помощью многофункционального линкера или без него либо за счет сайт-специфической конъюгации PEG с N- или C-концом антител или посредством эpsilon-аминогрупп, присутствующих на остатках лизина. Будет применяться дериватизация с помощью линейного или разветвленного полимера, которая приводит к минимальной потере биологической активности. Чтобы гарантировать надлежащую конъюгацию молекул PEG с антителами, степень конъюгации можно тщательно отслеживать с помощью SDS-PAGE и масс-спектрометрии. Непрореагировавший PEG можно отделить от конъюгатов антитело-PEG с помощью эксклюзионной или ионообменной хроматографии. PEG-дериватизированные антитела можно тестировать в отношении активности связывания, а также в отношении эффективности *in vivo* с применением способов, известных специалистам в данной области техники, например, с помощью иммунологических анализов, описанных в данном документе.

**[0207]** В определенных вариантах осуществления антитела, характеризующиеся увеличенным периодом полужизни *in vivo*, также могут быть получены путем введения одной или нескольких аминокислотных модификаций (т. е. замен, вставок или делеций) в константный домен IgG или его связывающий FcRn фрагмент (например, фрагмент Fc или шарнир-домен Fc). См., например, международную публикацию № WO 98/23289; международную публикацию № WO 97/34631 и патент США № 6277375, каждое из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0208]** В некоторых вариантах осуществления ковалентные модификации антител по настоящему изобретению включены в объем раскрытого предмета изобретения. Они могут быть получены с помощью химического синтеза или с помощью ферментативного

или химического расщепления антител, если они применимы. Другие типы ковалентных модификаций антител вводят в молекулу путем осуществления реакции намеченных аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим средством, которое способно вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками.

#### Ингибирующие нуклеиновые кислоты

**[0209]** Ингибиторы PCSK9 также могут включать средства терапии на основе RNAi, такие как siRNA, например инклизирин (ALN-PCSSc). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 включает специфическую двухнитевую последовательность ALN-PCSSc (из US7605251, US8809292, US9260718 и US8273869). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 включает полинуклеотидные композиции, которые нацелены на PCSK9 и применимы для способов лечения, терапии и профилактики заболевания, связанного с экспрессией PCSK9, при котором требуется снижение или ингибирование экспрессии или функции выбранной целевой полинуклеотидной последовательности. Примеры ингибирующих нуклеиновых кислот, которые можно применять для нацеливания на последовательности PCSK9 и снижения экспрессии PCSK9, включают без ограничения антисмысловые олигонуклеотиды и средства для РНК-интерференции (RNAi), включая короткую или малую интерферирующую РНК (siRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA) и микроРНК (miRNA). См., например, патенты США №№ 6506559; 8394628; 7056704; 7078196; 6107094; 5898031; 6573099 и Европейский патент № 1144623. См. также, например, публикации заявки на патент США №№ 2015/0259689; 2015/0197746; 2011/0092565; патенты США №№ 8877917; 8507455 и 7579451. См. также, например, международную публикацию № WO 2014/089313 и WO 2018/075658. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой инклизирин, описанный в международной публикации № WO 2014/089313.

**[0210]** В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, которая ингибирует функцию или экспрессию целевой полинуклеотидной последовательности (например, последовательности мРНК PCSK9) в клетке млекопитающего, в соответствии с настоящим изобретением предусматривает средство, которое обеспечивает по меньшей мере частично двухнитевую молекулу РНК (например, интерферирующую молекулу РНК) в клетке млекопитающего. Двухнитевая молекула РНК может включать химические модификации рибонуклеотидов, в том числе модификации компонентов рибонуклеотидов, представляющих собой рибозный сахар, основание или остов, таких как те, которые описаны в данном документе или известны из уровня техники. Любые такие модификации, которые используются в двухнитевой молекуле РНК (например, siRNA, shRNA или т. п.), охватываются термином "двухнитевая РНК" в целях настоящего изобретения. Таким образом, в целом термин "РНК" может также включать гибриды РНК-ДНК и полинуклеотиды, содержащие один или несколько модифицированных нуклеотидов (например, нуклеотиды с модификациями по 2'-

положению рибозного кольца), если не указано иное, например, где 2'-ОН группа рибозы требуется для конкретной связи.

**[0211]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10% частично двухнитевой молекулы РНК являются двухнитевыми. В качестве альтернативы двухнитевая часть этих молекул РНК может составлять по меньшей мере 30% длины молекулы. В другом варианте осуществления двухнитевая часть этих молекул может составлять по меньшей мере 50% длины молекулы. В еще одном варианте осуществления двухнитевая часть этих молекул может составлять по меньшей мере 70% длины молекулы. В другом варианте осуществления двухнитевая часть этих молекул может составлять по меньшей мере 90% длины молекулы. В другом варианте осуществления молекула может быть двухнитевой по всей своей длине. В качестве альтернативы двухнитевая часть этих молекул может находиться на одном или обоих концах или в некотором месте средней части молекулы, если молекула является линейной. Аналогично двухнитевая часть может находиться в любом месте, если молекула является кольцевой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая часть молекулы РНК становится двухнитевой только тогда, когда молекула находится в клетке млекопитающего. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения частично двухнитевая молекула представляет собой гибрид РНК/ДНК, например, одну нить, содержащую РНК и ДНК, полученную *in vitro*; или дуплекс из двух таких одиночных нитей или их частей. В еще одном варианте осуществления молекула РНК, полученная *in vivo* или *in vitro*, представляет собой дуплекс, состоящий из одной нити РНК и одной нити ДНК. В некоторых вариантах осуществления частично двухнитевая молекула РНК содержит полинуклеотидную последовательность, которая по сути гомологична целевой полинуклеотидной последовательности для осуществления эффективного снижения или ингибирования ее функции или экспрессии. Необходимая гомология может быть надлежащим образом определена с применением компьютерного алгоритма.

**[0212]** Как известно из уровня техники и обсуждается в данном документе, "гомология" или "идентичность" означает степень родства последовательностей между двумя полипептидными или двумя полинуклеотидными последовательностями, определяемую по идентичности совпадения между двумя длинами таких последовательностей. Как идентичность, так и гомологию можно легко рассчитать с помощью способов, известных из уровня техники [см. также, например, COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, (1988); BIOC COMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, (1993); COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, (1994); SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, (1987); и SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, (1991)]. Хотя существует ряд способов измерения идентичности и

гомологии между двумя полинуклеотидными последовательностями, термины "идентичность", "сходство" и гомология хорошо известны специалистам в данной области техники [H. Carillo and D. Lipton, SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)]. Способы, обычно используемые для определения идентичности или гомологии между двумя последовательностями, включают без ограничения способы, раскрытые в Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, и H. Carillo and D. Lipton, SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988). Предпочтительные способы определения идентичности или гомологии разработаны для получения наибольшего совпадения между двумя тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и сходства записаны в виде кода в компьютерных программах. Предпочтительная компьютерная программа для определения идентичности и гомологии между двумя последовательностями включает без ограничения алгоритм BESTFIT из пакета программ GCG [J. Devereux et al., Nucl. Acids Res., 12(1):387 (1984)], связанную программу MACVECTOR (Oxford) и программы FASTA (Pearson). Например, поиски сходства последовательностей в базах данных между значимыми встречающимися в природе полинуклеотидными последовательностями млекопитающих и целевыми полинуклеотидными последовательностями позволяет сконструировать подходящие молекулы РНК, требуемые для применения в настоящем изобретении. Алгоритм и/или степень гомологии, необходимые для любой конкретной молекулы РНК, могут быть выбраны специалистом в данной области техники в зависимости от идентичности мишени и/или близости гомологии целевой последовательности к любой встречающейся в природе последовательности млекопитающего, которую требуется оставить нормально функционирующей после применения способов по настоящему изобретению.

**[0213]** В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота для снижения экспрессии или функции последовательностей PCSK9 представляет собой средство для RNAi, содержащее двухнитевую молекулу РНК, которая содержит две антипараллельные нити смежных нуклеотидов, которые в достаточной степени комплементарны друг другу для гибридизации с образованием дуплексной области. Термины "гибридизовать" или "гибридизация" относятся к спариванию комплементарных полинуклеотидов, как правило, посредством водородных связей (например, связей Уотсона-Крика, Хугстина или обратной водородной связи Хугстина) между комплементарными основаниями в двух полинуклеотидах. Нить, содержащую область, имеющую последовательность, которая по сути комплементарна целевой последовательности (например, целевой мРНК), называют "антисмысловой нитью". "Смысловая нить" относится к нити, которая включает область, которая по сути комплементарна области антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить может содержать область, имеющую последовательность, которая по сути идентична целевой последовательности.

**[0214]** Как используется в данном документе, первая последовательность "комплементарна" второй последовательности, если полинуклеотид, содержащий первую

последовательность, может гибридизоваться с полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность, с образованием дуплексной области при определенных условиях, таких как физиологические условия. Другие такие условия могут включать умеренные или жесткие условия гибридизации, которые известны специалистам в данной области техники. Первая последовательность считается полностью комплементарной (комплементарной на 100%) второй последовательности, если полинуклеотид, содержащий первую последовательность, образует пары оснований с полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей без каких-либо ошибочно спаренных оснований. Последовательность является "по сути комплементарной" целевой последовательности, если эта последовательность на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% комплементарна целевой последовательности. Процент комплементарности может быть рассчитан путем деления числа оснований в первой последовательности, которые являются комплементарными основаниям в соответствующих положениях во второй или целевой последовательности, на общую длину первой последовательности. Можно также сказать, что последовательность является по сути комплементарной другой последовательности, если имеется не более 5, 4, 3 или 2 ошибочно спаренных оснований на протяжении дуплексной области из 30 пар оснований при гибридизации этих двух последовательностей. В общем, если присутствуют какие-либо нуклеотидные выступающие концы, определенные в данном документе, последовательность таких выступающих концов не учитывается при определении степени комплементарности между двумя последовательностями. Например, смысловая нить длиной 21 нуклеотид и антисмысловая нить длиной 21 нуклеотид, которые гибридизуются с образованием дуплексной области из 19 пар оснований с выступающим концом из 2 нуклеотидов на 3'-конце каждой нити, будут считаться полностью комплементарными в том смысле, как этот термин используется в данном документе.

**[0215]** В некоторых вариантах осуществления область антисмысловой нити содержит последовательность, которая полностью комплементарна области целевой последовательности РНК (например, мРНК PCSK9, такой как мРНК PCSK9 человека). В таких вариантах осуществления смысловая нить может содержать последовательность, которая полностью комплементарна последовательности антисмысловой нити. В других таких вариантах осуществления смысловая нить может содержать последовательность, которая по сути комплементарна последовательности антисмысловой нити, например, имеющей 1, 2, 3, 4 или 5 ошибочно спаренных оснований в дуплексной области, образованной смысловой и антисмысловой нитями. В определенных вариантах осуществления предпочтительно, чтобы любые ошибочно спаренные основания находились в пределах терминальных областей (например, в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'- и/или 3'-концов нитей). В одном варианте осуществления любые ошибочно спаренные основания в дуплексной области, образованной из смысловой и

антисмысловой нитей, находятся в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'-конца антисмысловой нити.

**[0216]** В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, которая нацелена на последовательности PCSK9 и приводит к снижению экспрессии PCSK9, включает без ограничения полинуклеотидную последовательность, которая полностью или по сути комплементарна по меньшей мере части последовательности мРНК PCSK9 человека. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, которая нацелена на последовательности PCSK9 и приводит к снижению экспрессии PCSK9, включает антисмысловую нить, которая полностью комплементарна по меньшей мере части последовательности РНК, кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 11 и 13 (SEQ ID NO: 3, 5). В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, которая нацелена на последовательности PCSK9 и приводит к снижению экспрессии PCSK9, включает антисмысловую нить, которая по сути комплементарна по меньшей мере части последовательности РНК, кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 11 и 13 (SEQ ID NO: 3, 5), например, имеющей 1, 2, 3, 4 или 5 ошибочно спаренных оснований в дуплексной области, образованной смысловой и антисмысловой нитями. Область полной или по сути полной комплементарности с целевой мРНК PCSK9 может иметь любую подходящую длину. В некоторых вариантах осуществления длина области полной или по сути полной комплементарности с целевой мРНК PCSK9 составляет 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 нуклеотидов.

**[0217]** В определенных вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевой РНК могут представлять собой две отдельные молекулы, которые гибридизуются с образованием дуплексной области, но в остальном не связаны. Такие двухнитевые молекулы РНК, образованные двумя отдельными нитями, называют "малыми интерферирующими РНК" или "короткими интерферирующими РНК" (siRNA).

Доставка ингибирующих нуклеиновых кислот

**[0218]** Ингибирующие нуклеиновые кислоты (например, интерферирующую РНК, такая как siRNA) можно вводить посредством любого способа, подходящего для введения средств на основе нуклеиновой кислоты, таких как ДНК-вакцина или векторы для генной терапии. Эти способы включают генные пушки, биоинъекторы и кожные пластыри, а также безыгольные способы, такие как технология ДНК-вакцины на основе микрочастиц, раскрытая в патенте США № 6194389, и чрескожная безыгольная вакцинация млекопитающих вакциной в форме порошка, как описано в патенте США № 6168587. Кроме того, возможна интраназальная доставка, как описано, среди прочего, в *Namajima et al. (1998), Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10*. Также могут использоваться липосомы (например, как описано в патенте США № 6472375) и микрокапсулирование. Также можно использовать биоразлагаемые нацеливаемые системы доставки микрочастиц (например, как описано в патенте США № 6471996).

**[0219]** В одном варианте осуществления активные соединения получают с



носителями, которые будут защищать соединение от быстрой элиминации из организма, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, включая импланты и микрокапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэферы и полимолочная кислота. Такие составы могут быть получены с использованием стандартных методик. Материалы также могут быть получены на коммерческой основе, например, от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также можно использовать липосомальные суспензии. Их можно получить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4522811.

**[0220]** Молекула интерферирующей РНК может быть конъюгирована с одним или несколькими углеводными фрагментами для оптимизации одного или нескольких свойств молекулы интерферирующей РНК. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице молекулы интерферирующей РНК или к 5'- или 3'-концу одной из нитей молекулы интерферирующей РНК. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц интерферирующей молекулы РНК может быть заменен другим фрагментом, например, неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный фрагмент. Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е. все атомы в кольце представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е. один или несколько атомов в кольце могут представлять собой гетероатом, например, атом азота, кислорода, серы. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему, или он может содержать одну или несколько двойных связей.

**[0221]** Углеводный фрагмент может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". Используемая в данном документе термин "точка присоединения к остову" относится к функциональной группе, например гидроксильной группе, или в целом к связи, доступной и подходящей для встраивания носителя в остов, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например серосодержащий, остов рибонуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления термин "связывающая точка присоединения" (TAP) относится к входящему в состав кольца атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличного от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид,

олигосахарид и полисахарид. Необязательно выбранный фрагмент соединен промежуточной связью с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель зачастую будет включать функциональную группу, например, аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, подходящую для включения или присоединения другого химического соединения, например лиганда, к образующему кольцу.

**[0222]** В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, например, молекула интерферирующей РНК, конъюгирована с углеводным фрагментом посредством носителя, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; в конкретных вариантах осуществления циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа выбрана из серинолового остова или диэтаноламинового остова.

Нацеливание ингибирующих нуклеиновых кислот

**[0223]** В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, например, молекулы интерферирующей РНК, нацелена на представляющие интерес ткани, например печень. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, например интерферирующая РНК, доставляется в печень. Соответственно, в определенных вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота специфически нацелена на клетки печени с использованием различных методик, известных из уровня техники и описанных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления антитела или другие нацеливающие компоненты, раскрытые в данном документе ниже, можно использовать для специфического нацеливания ингибирующей нуклеиновой кислоты на гепатоциты с использованием различных рецепторов, экспрессируемых на поверхности гепатоцитов.

**[0224]** Самые разные нацеливающие фрагменты могут быть связаны с олигонуклеотидами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления нацеливающие фрагменты связаны, например, ковалентно, непосредственно или опосредованно посредством промежуточной связи.

**[0225]** В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент приводит к изменению распределения, нацеливания или времени жизни молекулы, в которую он включен. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, рецептора, например, компартмента клетки или органа, ткани, органа или области тела, как, например, по сравнению с молекулой, у которой отсутствует такой нацеливающий фрагмент. Нацеливающие фрагменты, обеспечивающие повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, также называются нацеливающими фрагментами.

**[0226]** Некоторые нацеливающие компоненты могут характеризоваться

эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические нацеливающие фрагменты способствуют лизису эндосомы и/или транспорту композиции по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический нацеливающий фрагмент может представлять собой полианионный пептид или пептидомиметик, которые демонстрируют рН-зависимую мембранную активность и фузогенность. В одном варианте осуществления эндосомолитический нацеливающий фрагмент принимает свою активную конформацию при рН эндосомы. Под "активной" конформацией подразумевается такая конформация, при которой эндосомолитический нацеливающий фрагмент способствует лизису эндосомы и/или транспорту композиции по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические нацеливающие фрагменты включают пептид GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), пептид EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586) и их производные (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). В одном варианте осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая претерпевает изменение заряда или протонирование в ответ на изменение рН. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

**[0227]** В определенных вариантах осуществления нацеливающие фрагменты могут способствовать улучшению свойств транспорта, гибридизации и специфичности, а также могут повышать устойчивость к нуклеазам полученного природного или модифицированного олигорибонуклеотида или полимерной молекулы, содержащей любую комбинацию мономеров, описанных в данном документе, и/или природных или модифицированных рибонуклеотидов.

**[0228]** В некоторых вариантах осуществления нацеливающие фрагменты в целом могут включать терапевтические модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или репортерные группы, например, для мониторинга распределения; сшивающие средства и фрагменты, придающие устойчивость к нуклеазам. Общие примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и имитаторы пептидов.

**[0229]** Нацеливающие фрагменты могут включать встречающееся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (I), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту) или липид. Нацеливающий фрагмент также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическую полиаминокислоту, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактида и гликолида, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, N-(2-

гидроксипропил)метакриламидный сополимер (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, полиамин-пептидомиметик, полиамин-дендример, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамиона или альфа-спиральный пептид.

**[0230]** Нацеливающие фрагменты также могут включать другие нацеливающие группы, например, средство, нацеливающее на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающей группой могут быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, сурфактантный белок А, углевод муцина, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин В12, биотин, пептид RGD, миметик пептида RGD или аптамер.

**[0231]** Другие примеры нацеливающих фрагментов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелатор (например, EDTA), липофильные молекулы (например, холестерин, холевую кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеил)лиохолевую кислоту, О3-(олеил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и конъюгаты пептидов (например, пептид Antennapedia, пептид Tat), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, облегчающие транспорт/всасывание (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бис-имидазол, гистамин, имидазольные кластеры, акридин-имидазольные конъюгаты, Eu<sup>3+</sup>-комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

**[0232]** Нацеливающие фрагменты могут представлять собой белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, характеризующиеся специфической аффинностью в отношении совместного фрагмента, или антитела; например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как гепатоцит печени. Нацеливающие фрагменты могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные вещества, такие как липиды, лектины, углеводы,

витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу или аптамеры. Нацеливающий фрагмент может представлять собой, например, липополисахарид.

**[0233]** Нацеливающий фрагмент может представлять собой вещество, например, лекарственное средство, которое может повышать поглощение ингибирующей нуклеиновой кислоты, например, молекулы интерферирующей РНК, в клетку, например, за счет разрушения цитоскелета клетки, например, за счет разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джасплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинголид А, инданоцин или миосеверин.

**[0234]** Нацеливающий фрагмент может повышать поглощение ингибирующей нуклеиновой кислоты, например, молекулы интерферирующей РНК в клетку, например, за счет активации воспалительной реакции. Иллюстративные нацеливающие фрагменты, которые будут характеризоваться таким эффектом, включают фактор некроза опухоли альфа (TNF-альфа), интерлейкин-1 бета или гамма-интерферон.

#### Синтез интерферирующей РНК

**[0235]** Молекулы интерферирующей РНК, которые могут использоваться в способах по настоящему изобретению, могут быть легко получены с применением методик, известных из уровня техники, например, с применением стандартного твердофазного синтеза РНК. См., например, патент США № 8877917. Полинуклеотиды двухнитевых молекул РНК могут быть собраны на подходящем синтезаторе нуклеиновых кислот с использованием стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов (например, фосфорамидитов). Автоматизированные синтезаторы нуклеиновых кислот реализуются на коммерческой основе несколькими поставщиками, в том числе синтезаторы ДНК/РНК от Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния, США), синтезаторы MerMade от BioAutomation (Ирвинг, Техас, США) и синтезаторы OligoPilot от GE Healthcare Life Sciences (Питтсбург, Пенсильвания, США).

**[0236]** Для синтеза олигонуклеотидов посредством фосфорамидитной химии можно применять 2'-силильную защитную группу в сочетании с кислотолабильным диметокситритилом (DMT) в 5'-положении рибонуклеозидов. Известно, что конечные условия снятия защиты не приводят к значительной деградации РНК-продуктов. Все процессы синтеза можно проводить в любом автоматическом или ручном синтезаторе в большом, среднем или малом масштабе. Процессы синтеза также можно проводить в многолуночных планшетах или на предметных стеклах.

**[0237]** 2'-О-силильную группу можно удалить путем воздействия фторид-ионов, которые могут представлять собой любой источник фторид-иона, например, те соли, которые содержат фторид-ион в сочетании с неорганическими противоионами, например, фторид цезия и фторид калия, или те соли, которые содержат фторид-ион в паре с

органическим противоионом, например, фторид тетраалкиламмония. В реакции снятия защиты можно использовать краун-эфирный катализатор в комбинации с неорганическим фторидом. Предпочтительным источником фторид-иона являются фторид тетрабутиламмония или аминогидрофториды (например, объединение водного HF с триэтиламиноном в диполярном апротонном растворителе, например, диметилформамиде).

**[0238]** Выбор защитных групп для использования на сложных фосфитных триэфирах и сложных фосфотриэфирах может изменять стабильность сложных триэфиров в отношении фтора. Метильная защита сложного фосфотриэфира или сложного фосфитного триэфира может стабилизировать связь против фторид-ионов и увеличить технологический выход процесса.

**[0239]** Поскольку рибонуклеозиды имеют реакционноспособный 2'-гидроксильный заместитель, может потребоваться защита реакционноспособного 2'-положения в РНК защитной группой, которая будет ортогональна с 5'-О-диметокситритильной защитной группой, например, устойчива к обработке кислотой. Силильные защитные группы соответствуют этому критерию и могут быть легко удалены на конечной стадии снятия защиты с помощью фторида, что может привести к минимальной деградации РНК.

**[0240]** В стандартной реакции фосфорамидитного сочетания можно использовать тетраэольные катализаторы. Предпочтительные катализаторы включают, например, тетразол, S-этил-тетразол, п-нитрофенилтетразол.

**[0241]** См. также, например, Trufert et al., *Tetrahedron*, 52:3005, 1996; и Manoharan, "Oligonucleotide Conjugates in Antisense Technology" в *Antisense Drug Technology*, ed. S. T. Crooke, Marcel Dekker, Inc., 2001. Защищенные мономерные соединения могут быть выделены из реакционной смеси и дополнительно очищены с помощью такого способа, как колоночная хроматография, жидкостная хроматография высокого давления или перекристаллизация. Как может быть понятно специалисту в данной области техники, дополнительные способы синтеза соединений формул, представленных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники. Кроме того, различные стадии синтеза могут быть выполнены в альтернативной последовательности или порядке с получением требуемых соединений. Другие превращения в рамках синтетической химии, защитные группы (например, для гидроксила, аминогруппы и т.д., присутствующих на основаниях) и методологии защитных групп (обеспечение защиты и снятие защиты), применимые при синтезе соединений, описанных в данном документе, известны из уровня техники и включают, например, описанные в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); и L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995) и их последующие издания.

Наборы

**[0242]** Предусмотрены наборы для применения практикующими врачами и

другими лицами, включающие один или несколько ингибиторов PCSK-9 (например, антитело, ингибирующую нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный ингибитор) и этикетку или другие инструкции по применению при лечении любого из состояний, обсуждаемых в данном документе, и/или дополнительные компоненты. В одном варианте осуществления набор включает стерильный препарат на основе одного или нескольких человеческих антител или одной или нескольких интерферирующих РНК, которые могут находиться в форме композиции, раскрытой в данном документе, и могут находиться в одном или нескольких флаконах. Также можно использовать другие ингибиторы PCSK9.

**[0243]** В данном документе предусмотрен набор для лечения субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов. Набор может включать лекарственную форму, содержащую ингибитор PCSK9 в количестве, достаточном для введения ингибитора PCSK9 субъекту-ребенку с HeFH, например, субъекту-ребенку с HeFH, характеризующемуся исходным содержанием LDL-C на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, в усиленной схеме дозирования, описанной в данном документе, предусматривающей введение пациенту ингибитора PCSK9 с частотой введения дозы, которая в по меньшей мере 2 раза превышает среднюю частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, например, меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты.

**[0244]** Также предусмотрен набор для лечения субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов. Набор может включать лекарственную форму, содержащую ингибитор PCSK9 в количестве, достаточном для введения ингибитора PCSK9 субъекту-ребенку с HeFH, например, субъекту-ребенку с HeFH, характеризующемуся исходным содержанием LDL-C на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH, в усиленной схеме дозирования, описанной в данном документе, предусматривающей введение пациенту ингибитора PCSK9 в дозировке, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает дозировку стандарта лечения ингибитором PCSK9 для лечения или предупреждения связанного с холестерином нарушения у взрослого пациента с HeFH.

Примеры

Пример 1

**[0245]** В этом неограничивающем примере показано двойное слепое, рандомизированное, многоцентровое, плацебо-контролируемое исследование с параллельными группами для характеристики эффективности, безопасности и переносимости эволокумаба в течение 24 недель в отношении снижения содержания холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) в качестве дополнения к диете и средству терапии для снижения содержания липидов у субъектов-детей в возрасте от 10 до 17 лет с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (HeFH). Дизайн исследования

показан на фиг. 1. Включенных в исследование участников рандомизировали для получения эволокумаба (420 мг ежемесячно) или соответствующего плацебо с помощью подкожных инъекций (фиг. 1). Применяемые критерии включения и исключения субъектов перечислены ниже.

**[0246] Критерии включения:**

- Субъекты мужского или женского пола в возрасте от  $\geq 10$  до  $\leq 17$  лет (до наступления 18 лет)
- Диагноз гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии
- Прием одобренного статина со стабильной оптимизированной дозой в течение  $\geq 4$  недель
- Другое средство терапии для снижения содержания липидов со стабильной дозой в течение  $\geq 4$  недель (фибраты должны иметь стабильную дозу в течение  $\geq 6$  недель)
- Содержание LDL-C натощак  $\geq 130$  мг/дл (3,4 ммоль/л)
- Содержание триглицеридов натощак  $\leq 400$  мг/дл (4,5 ммоль/л)

**[0247] Критерии исключения:**

- Диабет 1 типа или диабет 2 типа, который слабо контролируется
- Неконтролируемый гипертиреоз или гипотиреоз
- Прием ингибитора белка-переносчика холестерина (СЕТР) в течение последних 12 месяцев или мипомерсена или ломитапида в течение последних 5 месяцев
- Ранее получал эволокумаб или любое другое исследуемое средство терапии для ингибирования PCSK9.
- Аферез липидов в пределах последних 12 недель до скрининга.
- Гомозиготная семейная гиперхолестеринемия

**[0248] Первичная цель и конечная точка**

**[0249]** Оценить эффект эволокумаба при подкожном (SC) введении в течение 24 недель по сравнению с плацебо при добавлении к стандарту лечения в отношении процента изменения от исходного уровня содержания холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) у субъектов-детей в возрасте от 10 до 17 лет с HeFH.

**[0250]** Первичной конечной точкой был процент изменения содержания LDL-C от исходного уровня до недели 24.

**[0251] Вторичные цели эффективности и конечные точки**

**[0252]** Оценить эффект эволокумаба при SC введении в сравнении с плацебо при добавлении к стандарту лечения в отношении среднего процента изменения от исходного уровня до недель 22 и 24 и изменения содержания LDL-C от исходного уровня до недели 24, и в отношении процента изменения от исходного уровня до недели 24 содержания холестерина, отличного от холестерина липопротеинов низкой плотности (не-HDL-C), аполипопротеина В (АроВ), соотношения общего холестерина/HDL-C и соотношения АроВ/аполипопротеин А-1 (АроА1) у субъектов-детей в возрасте от 10 до 17 лет с HeFH.

**[0253]** Вторичными конечными точками были средний процент изменения содержания LDL-C от исходного уровня на неделях 22 и 24 (ранг 1); изменение



содержания LDL-C от исходного уровня на неделе 24 (ранг 2) и процент изменения от исходного уровня до недели 24 содержания не-HDL-C, ApoB, соотношения общего холестерина/HDL-C и соотношения ApoB/ApoA1 (ранг 3).

**[0254] Краткое описание результатов**

**[0255]** В общей сложности рандомизировали 158 субъектов, из которых 157 получили по меньшей мере одну дозу исследуемого препарата (IP) и были включены в полную совокупность для анализа, при этом 104 получали эволамаб (EvoMab) 420 мг SC QM, а 53 получали плацебо SC QM. Медиана (Q1, Q3) экспозиции IP при двойных слепых условиях составляла 5,6 (5,5, 5,6) месяцев в каждой группе лечения. 96,8% и 99,4% субъектов завершили введение IP и исследование соответственно (см. таблицу 1.1). Исходные характеристики субъектов в полной совокупности для анализа показаны в таблице 1.2.

Таблица 1.1. Краткое описание субъектов и их распределения в исследовании для всех рандомизированных субъектов

<b>Распределение</b>	<b>Плацебо, QM (N=53) n (%)</b>	<b>EvoMab, 420 мг, QM (N=105) n(%)</b>	<b>Всего (N=158) n(%)</b>
<b>Учет приема исследуемого препарата</b>			
<b>Субъекты, которые ни разу не получили IP</b>	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,6)
<b>Субъекты, которые получали IP</b>	53 (100,0)	104 (99,0)	157 (99,4)
<b>Субъекты, которые завершили получение IP</b>	53 (100,0)	100 (95,2)	153 (96,8)
<b>Субъекты, которые прекратили получение IP</b>	0 (0,0)	4 (3,8)	4 (2,5)
<b>Нежелательное явление</b>	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,6)
<b>Просьба субъекта</b>	0 (0,0)	2 (1,9)	2 (1,3)
<b>Другое</b>	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,6)
<b>Учет завершения исследования</b>			

<b>Субъекты, которые завершили исследование</b>	53 (100,0)	104 (99,0)	157 (99,4)
<b>Субъекты, которые прекратили исследование</b>	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,6)
<b>Отзыв информированного согласия на участие в исследовании</b>	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,6)

Таблица 1.2. Исходные характеристики для полной совокупности для анализа

	<b>Плацебо, QM (N=53)</b>	<b>EvoMab, 420 мг, QM (N=104)</b>	<b>Всего (N=157)</b>
<b>Демографические данные</b>			
<b>Возраст в годах, среднее (SD)</b>	13,7 (2,5)	13,7 (2,3)	13,7 (2,4)
<b>Возрастная группа, &lt; 14 лет, n (%)</b>	25 (47,2)	48 (46,2)	73 (46,5)
<b>Пол, мужской, n (%)</b>	26 (49,1)	43 (41,3)	69 (43,9)
<b>Расовая принадлежность, n (%)</b>			
<b>Европеоид</b>	44 (83,0)	89 (85,6)	133 (84,7)
<b>Негроид или афроамериканец</b>	0 (0,0)	2 (1,9)	2 (1,3)
<b>Азиат</b>	0 (0,0)	2 (1,9)	2 (1,3)
<b>Другое</b>	9 (17,0)	11 (10,6)	20 (12,7)
<b>Этническая принадлежность, n (%)</b>			
<b>Испанец/латиноамериканец</b>	7 (13,2)	6 (5,8)	13 (8,3)
<b>Регион, n (%)</b>			
<b>Европа</b>	35 (66,0)	68 (65,4)	103 (65,6)

<b>Латинская Америка</b>	8 (15,1)	18 (17,3)	26 (16,6)
<b>Северная Америка</b>	10 (18,9)	12 (11,5)	22 (14,0)
<b>Азиатско-Тихоокеанский регион</b>	0 (0,0)	6 (5,8)	6 (3,8)
<b>Факторы сердечно-сосудистого риска, n (%)</b>			
<b>Гипертония</b>	3 (5,7)	2 (1,9)	5 (3,2)
<b>Низкое содержание HDL-C</b>	18 (34,0)	40 (38,5)	58 (36,9)
<b>Курение сигарет в настоящее время</b>	2 (3,8)	1 (1,0)	3 (1,9)
<b>Сахарный диабет II типа</b>	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,6)
<b>Семейный анамнез преждевременной CHD</b>	21 (39,6)	31 (29,8)	52 (33,1)
<b>ВМІ (кг/м<sup>2</sup>), среднее (SD)</b>	21,3 (4,2)	22,6 (5,5)	22,1 (5,1)
<b>Ишемическая болезнь сердца</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>Нарушения, связанные с цереброваскулярными или периферическими артериями</b>	1 (1,9)	0 (0,0)	1 (0,6)
<b>Средство терапии для снижения содержания липидов</b>			
<b>Статины, n (%)</b>	52 (98,1)	104 (100,0)	156 (99,4)
<b>Высокой интенсивности, n (%)</b>	7 (13,2)	19 (18,3)	26 (16,6)
<b>Умеренной интенсивности, n (%)</b>	35 (66,0)	63 (60,6)	98 (62,4)
<b>Низкой интенсивности, n (%)</b>	10 (18,9)	21 (20,2)	31 (19,7)

<b>Неизвестной интенсивности, n (%)</b>		0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,6)
<b>Эзетимиб, n (%)</b>		8 (15,1)	13 (12,5)	21 (13,4)
<b>Исходное содержание LDL-C (мг/дл)</b>	Среднее (SD)	183,0 (47,2)	185,0 (45,0)	184,3 (45,6)
	Медиана (Q1, Q3)	173,0 (148,0, 208,5)	172,8 (155,0, 207,5)	173,0 (154,0, 208,0)
<b>Исходное содержание не-HDL-C (мг/дл)</b>	Среднее (SD)	200,2 (48,2)	203,8 (47,3)	202,6 (47,5)
	Медиана (Q1, Q3)	188,5 (164,0, 229,5)	193,3 (172,3, 224,8)	192,0 (169,0, 225,0)

[0256] Результат был статистически значимым для первичной конечной точки, представляющей собой процент изменения содержания LDL-C от исходного уровня на неделе 24 ( $p < 0,0001$ ). EvoMab приводил к снижению содержания LDL-C на дополнительные 38,30% (стандартная ошибка (SE)=3,66) по сравнению с плацебо (таблица 1.3).

[0257] EvoMab приводил к статистически значимому улучшению всех вторичных конечных точек ранга 1, 2 и 3 по сравнению с плацебо (таблица 1.3). В отношении вторичной конечной точки ранга 1, среднего процента изменения LDL-C от исходного уровня на неделях 22 и 24, EvoMab приводил к снижению содержания LDL-C на дополнительные 42,09% (SE=3,17). В отношении вторичной конечной точки ранга 2, изменение содержания LDL-C от исходного уровня до на неделе 24, EvoMab приводил к снижению содержания LDL-C на дополнительные 68,6 мг/дл (SE=7,3).

Таблица 1,3. Разница между вариантами лечения по первичным и вторичным конечным точкам

		<b>EvoMab - Плацебо Оценка методом наименьших квадратов (95% CI)</b>	<b>Скорректированное р-значение</b>
<b>Первичная конечная точка</b>	Процент изменения содержания LDL-C от исходного уровня до недели 24	-38,30 (-45,54, -31,06)	< 0,0001

<b>Вторичная конечная точка ранга 1</b>	Средний процент изменения содержания LDL-C от исходного уровня до недель 22 и 24	-42,09 (-48,34, -35,83)	< 0,0001
<b>Вторичная конечная точка ранга 2</b>	Изменение содержания LDL-C от исходного уровня до недели 24: (мг/дл)	-68,6 (-83,1, -54,0)	< 0,0001
<b>Вторичные конечные точки ранга 3</b>	Процент изменения содержания не-HDL-C от исходного уровня до недели		
	24	-35,04 (-41,79, -28,30)	< 0,0001
	АpoB	-32,47 (-38,82, -26,13)	< 0,0001
	Соотношение общий холестерин/HDL-C	-30,30 (-36,40, -24,21)	< 0,0001
	Соотношение АpoB/АpoA1	-36,38 (-42,97, -29,80)	< 0,0001

**[0258]** По результатам исследования не было выявлено новых проблем с безопасностью, а частота возникших во время лечения нежелательных явлений у субъектов была сопоставима в обеих группах лечения (таблица 1.4).

Таблица 1.4. Краткое описание результатов по безопасности

	<b>Плацебо, QM (N=53)</b>	<b>EvoMab, 420 мг, QM (N=104)</b>
<b>Возникшие во время лечения нежелательные явления (TEAE)</b>	34 (64,2)	64 (61,5)
<b>Степень <math>\geq 2</math></b>	22 (41,5)	46 (44,2)
<b>Степень <math>\geq 3^a</math></b>	0 (0,0)	4 (3,8)
<b>Степень <math>\geq 4</math></b>	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>SAE<sup>b</sup></b>	0 (0,0)	1 (1,0)
<b>TEAE, ведущие к прекращению введения</b>	0 (0,0)	1 (1,0)

<b>IP</b>		
<b>Летальные АЕ (или смерти)</b>	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>Наиболее распространенные ТЕАЕ (<math>\geq 2\%</math> в группе EvoMab)</b>		
<b>Назофарингит</b>	6 (11,3)	12 (11,5)
<b>Головная боль<sup>c</sup></b>	1 (1,9)	11 (10,6)
<b>Боль в ротоглотке<sup>c</sup></b>	0 (0,0)	7 (6,7)
<b>Грипп<sup>c</sup></b>	2 (3,8)	6 (5,8)
<b>Инфекция верхних дыхательных путей<sup>c</sup></b>	1 (1,9)	6 (5,8)
<b>Гастроэнтерит</b>	4 (7,5)	5 (4,8)
<b>Повышенная температура</b>	3 (5,7)	3 (2,9)
<b>Запор</b>	0 (0,0)	3 (2,9)
<b>Гриппоподобное заболевание<sup>c</sup></b>	0 (0,0)	3 (2,9)
<b>ЕОІ: потенциальные явления гиперчувствительности (узкие термины)<sup>d</sup></b>	0 (0,0)	4 (3,8)
<b>ЕОІ: потенциальные явления гиперчувствительности (широкие термины)<sup>d</sup></b>	0 (0,0)	7 (6,7)
<b>ЕОІ: потенциальные явления реакции в месте инъекции (узкие термины)</b>	3 (5,7)	5 (4,8)
<b>ЕОІ: потенциальные явления реакции в месте инъекции (широкие термины)</b>	3 (5,7)	5 (4,8)
<b>ЕОІ: потенциальные нейрокогнитивные явления<sup>e</sup></b>	0 (0,0)	1 (1,0)

<sup>a</sup> Явления степени 3 включали: одно явление нейрогенного шока (дословно: вазовагальный шок), оцененное как несерьезное и не связанное с IP; одно явление головной боли, оцененное как несерьезное и не связанное с IP; одно явление повышения содержания креатинфосфокиназы в крови вследствие интенсивной физической нагрузки, оцененное как несерьезное и не связанное с IP; и одно явление желчнокаменной болезни, оцененное как серьезное и не связанное с IP. Ни один субъект не прекратил введение IP из-за нежелательного явления степени 3.

<sup>b</sup> У субъекта развилась боль в животе в пределах нескольких дней после начала

введения IP, и впоследствии в день 35 исследования диагностировали желчнокаменную болезнь (степень 3); явление посчитали не связанным с IP и введение IP продолжили.

<sup>c</sup> Все из явлений головной боли, боли в ротоглотке, гриппа, инфекции верхних дыхательных путей (URTI) и гриппоподобного заболевания были несерьезными и в основном характеризовались степенью 1 или 2 (одно явление головной боли характеризовалось степенью 3), и ни одно из них не привело к прекращению введения IP. Эти явления соответствуют известным нежелательным реакциям на лекарственные средства (ADR) для Repatha, описанными в CDS, или симптомам этих ADR (например, грипп, гриппоподобное заболевание, назофарингит и URTI).

<sup>d</sup> Повышенная чувствительность, включая сыпь, крапивницу и ангионевротический отек, являются ожидаемыми ADR при введении Repatha; все зарегистрированные явления были несерьезными, степени 1 или 2 и соответствовали тем, которые наблюдались ранее.

<sup>e</sup> Несерьезное нарушение степени 1, представляющее собой расстройство внимания (дословно: нарушение концентрации), в день 30 исследования, которое исследователь посчитал связанным с IP; субъект продолжил введение IP, но исход явления не был зарегистрирован.

**[0259]** Эти результаты показывают, что ингибирование PCSK9 с помощью эволокумаба на фоне приема средства терапии на основе статина в популяции пациентов-детей с HeFH было безопасным и приводило к снижению содержания LDL-C на 38,3%, или на 68,6 мг/дл через 24 недели.

#### Пример 2

**[0260]** В этом неограничивающем примере показаны результаты подгруппового анализа данных из примере 1 на основе исходных квартилей содержания LDL-C. Исходы разделили на подгруппы, определяемые межквартильными диапазонами исходного содержания LDL-C для всех субъектов. Межквартильные диапазоны составляли: Q1: содержание LDL-C < 154 мг/дл; Q2:  $154 \leq$  содержание LDL-C < 173 мг/дл; Q3:  $173 \leq$  содержание LDL-C < 208 мг/дл; и Q4: содержание LDL-C  $\geq$  208 мг/дл.

**[0261]** Результаты подгруппового анализа в зависимости от квартилей исходного содержания LDL-C показаны в таблицах 2.1 и 2.2.

Таблица 2,1. Средние значения на неделе 22 и неделе 24

Уровень подгруппы	Группа лечения	Среднее по методу LS (SE)	Разница между лечением в сравнении с плацебо (SE)	P-значение
<b>Q1 (&lt; 154 мг/дл)</b>	Плацебо	2,39 (5,35)	-50,57 (4,81)	<0,001
	Эволокумаб	-48,18 (5,68)		
<b>Q2 (154 ≤ содержание LDL-)</b>	Плацебо	-0,35 (5,46)	-49,92 (5,85)	<0,001
	Эволокумаб	-50,28 (3,35)		

<b>C &lt; 173 мг/дл)</b>				
<b>Q3 (173 ≤ содержание LDL- C &lt; 208 мг/дл)</b>	Плацебо	-14,90 (8,45)	-43,64 (7,54)	<0,001
	Эволокумаб	-58,55 (6,94)		
<b>Q4 (содержание LDL-C ≥ 208 мг/дл)</b>	Плацебо	-9,56 (5,39)	-27,69 (6,65)	<0,001
	Эволокумаб	-37,25 (3,89)		

р-значение взаимодействия: 0,040

Таблица 2,2. Неделя 24

<b>Уровень подгруппы</b>	<b>Группа лечения</b>	<b>Среднее по методу LS (SE)</b>	<b>Разница между лечением в сравнении с плацебо (SE)</b>	<b>Р- значение</b>
<b>Q1 (&lt; 154 мг/дл)</b>	Плацебо	0,49 (5,69)	-47,52 (5,40)	<0,001
	Эволокумаб	-47,03 (5,80)		
<b>Q2 (154 ≤ содержание LDL- C &lt; 173 мг/дл)</b>	Плацебо	-2,42 (6,81)	-39,66 (7,46)	<0,001
	Эволокумаб	-42,08 (4,02)		
<b>Q3 (173 ≤ содержание LDL- C &lt; 208 мг/дл)</b>	Плацебо	-11,76 (8,65)	-45,25 (7,89)	<0,001
	Эволокумаб	-57,01 (7,08)		
<b>Q4 (содержание LDL-C ≥ 208 мг/дл)</b>	Плацебо	-11,75 (6,30)	-23,24 (7,78)	0,005
	Эволокумаб	-34,99 (4,54)		

р-значение взаимодействия: 0,085

[0262] Эти результаты показывают, что процент снижения содержания LDL-C при ингибировании PCSK9 с помощью эволокумаба на фоне приема средства терапии на основе статина в популяции пациентов-детей с HeFH может зависеть от исходного содержания LDL-C у пациента, подлежащего лечению. В некоторых вариантах осуществления пациенты с содержанием LDL-C на пороговом уровне или выше демонстрируют притупленный ответ на средство терапии на основе ингибитора PCSK9. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень составляет 208 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления содержание LDL-C у пациентов-детей, характеризующихся исходным содержанием LDL-C в пределах верхнего квартиля исходного содержания LDL-C среди популяции пациентов-детей с HeFH, снижается в меньшей степени, чем у пациентов с исходным содержанием LDL-C в пределах трех



нижних квартилей исходного содержания LDL-C в популяции пациентов-детей с HeFH.

Пример 3

**[0263]** В этом неограничивающем примере показано лечение субъекта-ребенка, у которого имеется HeFH, с помощью ингибитора PCSK9, вводимого в соответствии с усиленной схемой дозирования.

**[0264]** Идентифицировали субъекта-ребенка с HeFH, характеризующегося исходным содержанием LDL-C, составляющим 210 мг/дл. Субъекту вводят 420 мг эволокумаба (REPATHA) подкожно каждые две недели. Вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%.

Пример 4

**[0265]** В этом неограничивающем примере показано лечение субъекта-ребенка, у которого имеется HeFH, с помощью ингибитора PCSK9, вводимого в соответствии с усиленной схемой дозирования.

**[0266]** Идентифицировали субъекта-ребенка с HeFH, характеризующегося исходным содержанием LDL-C, составляющим 210 мг/дл. Пациенту вводят 490 мг эволокумаба (REPATHA) подкожно каждые четыре недели. Вследствие чего содержание LDL-C у пациента снижается на по меньшей мере 30%.

Пример 5

**[0267]** В этом неограничивающем примере показано лечение субъекта-ребенка, у которого имеется HeFH, с помощью ингибитора PCSK9, вводимого в соответствии с усиленной схемой дозирования.

**[0268]** Субъект-ребенок с HeFH характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим 210 мг/дл. Исходное содержание LDL-C у субъекта превышает верхний квартиль исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH. Субъекту вводят ингибитор PCSK9 с частотой введения дозы, вдвое превышающей среднюю частоту введения дозы для пациентов-детей, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля. Вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается в аналогичной степени, что и среднее снижение содержания LDL-C, достигаемое при введении ингибитора PCSK9 пациентам-детям с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля.

**[0269]** Как показано в примерах 1 и 2 выше, разные подгруппы пациентов-детей по-разному отвечали на средство терапии, направленное против PCSK9. В данном документе определили, что исходные уровни LDL-C можно применять для стратификации пациентов-детей с HeFH в отношении восприимчивости к средству терапии, направленному против PCSK9. Эти результаты указывают на то, что лучшие исходы для средства терапии, направленного против PCSK9, могут быть достигнуты у пациентов-детей, у которых имеется тяжелая форма HeFH, посредством корректировки схемы дозирования, например, посредством повышения частоты введения и/или повышения дозы. Кроме того, при меньших дозах и/или более низкой частоте введения ингибиторов PCSK9 может достигаться больший процент снижения содержания LDL-C у пациентов-детей, у

которых имеются относительно низкие исходные уровни LDL-C.

**[0270]** Каждая ссылка, цитируемая в данном документе, настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте для всего, что в ней сообщается, и для всех целей.

**[0271]** Используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если контекст явное не указывает на иное. Предусмотрено, что любая ссылка на "или" в данном документе охватывает "и/или", если не заявлено иное.

**[0272]** Как будет понятно специалисту в данной области техники для любых возможных целей все диапазоны, раскрытые в данном документе, также охватывают любые и все возможные поддиапазоны и комбинации их поддиапазонов. Любой из перечисленных диапазонов может быть легко распознан как в достаточной степени описывающий и позволяющий разбить тот же диапазон на по меньшей мере равные половины, трети, четверти, пятые части, десятые части и т. д. В качестве неограничивающего примера каждый диапазон, обсуждаемый в данном документе, может быть легко разбит на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть и т. д. Как также будет понятно специалисту в данной области техники, все формулировки, такие как "не более чем", "по меньшей мере", "более", "менее" и т. п. включают указанное число и ссылаются на диапазоны, которые впоследствии могут быть разбиты на поддиапазоны, как обсуждалось выше. Как будет понятно специалисту в данной области техники, диапазон включает каждый отдельный член. Так, например, группа, в которой имеется 1-3 изделия, относится к группам, в которых имеется 1, 2 или 3 изделия. Аналогично группа, в которой имеется 1-5 изделий, относится к группам, в которых имеется 1, 2, 3, 4 или 5 изделий и так далее.

**[0273]** Объем раскрытого объекта изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе, которые предусмотрены в качестве единичных иллюстраций отдельных вариантов осуществления настоящего изобретения, и предполагаются функционально эквивалентные способы и компоненты. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых графических материалов. Предусмотрено, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения. По меньшей мере в некоторых из ранее описанных вариантов осуществления один или несколько элементов, применяемых в одном варианте осуществления, могут взаимозаменяемо применяться в другом варианте осуществления. Специалистам в данной области техники будет понятно, что в способах и структурах, описанных выше, могут быть сделаны различные другие исключения, дополнения и модификации без отклонения от объема заявленного объекта изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, включающий:

идентификацию субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше; и

введение субъекту антитела к PCSK9 в дозе от приблизительно 350 до приблизительно 500 мг, вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается.

2. Способ по п. 1, где исходное содержание LDL-C составляет от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 550 мг/дл.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где исходное содержание LDL-C составляет 208 мг/дл или больше.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, от приблизительно 30% до приблизительно 50%, от приблизительно 20% до приблизительно 50%, от приблизительно 20% до приблизительно 80%, от приблизительно 30% до приблизительно 50% или от приблизительно 30% до приблизительно 80%.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где содержание LDL-C у субъекта снижается на от приблизительно 30% до приблизительно 80%.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к PCSK9 вводят с интервалом от каждых двух недель до каждых четырех недель, каждые две недели или каждые четыре недели.

8. Способ по любому из пп. 1-3, где антитело к PCSK9 вводят каждые четыре недели, и где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 20%.

9. Способ по любому из пп. 1-3, где антитело к PCSK9 вводят каждые две недели, и где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%.

10. Способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, включающий:

идентификацию субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 210 мг/дл или меньше; и

введение субъекту антитела к PCSK9 в дозе, составляющей от приблизительно 350 до приблизительно 500 мг, вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 40%.

11. Способ по п. 10, где исходное содержание LDL-C составляет менее 208 мг/дл.

12. Способ по п. 10 или п. 11, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, от приблизительно 40% до приблизительно 60%, от приблизительно 40% до приблизительно 80%, от

приблизительно 50% до приблизительно 60% или от приблизительно 50% до приблизительно 80%.

13. Способ по любому из пп. 10-12, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 45%.

14. Способ по любому из пп. 10-13, где антитело к PCSK9 вводят с интервалом от каждых двух недель до каждых четырех недель, каждые две недели или каждые четыре недели.

15. Способ по любому из пп. 10-13, где антитело к PCSK9 вводят каждые четыре недели, и где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 40%.

16. Способ по любому из пп. 10-13, где антитело к PCSK9 вводят каждые две недели, и где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 50%.

17. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к PCSK9 содержит: варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую:

CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; и

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VH эволюкумаба; и

варибельную область легкой цепи (VL), содержащую:

CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба; и

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VL эволюкумаба.

18. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к PCSK9 представляет собой эволюкумаб.

19. Способ по любому из предыдущих пунктов, где доза составляет приблизительно 420 мг.

20. Способ по любому из пп. 1-18, где доза составляет приблизительно 490 мг.

21. Способ по любому из предыдущих пунктов, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере неделе 20 введения антитела к PCSK9.

22. Способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, включающий:

идентификацию субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; и

введение субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования,

где усиленная схема дозирования предусматривает количество и/или частоту введения дозы, каждое из которых независимо на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднее количество и/или среднюю частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным

значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, за счет чего содержание LDL-C у субъекта снижается.

23. Способ по п. 22, где количество ингибитора PCSK9 на от приблизительно 5% до приблизительно 100% превышает среднее количество.

24. Способ по п. 22 или п. 23, где частота введения дозы ингибитора PCSK9 на от приблизительно 15% до приблизительно 400% превышает среднюю частоту введения дозы.

25. Способ по любому из пп. 22-24, где средняя частота введения дозы представляет собой частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты.

26. Способ по любому из пп. 22-25, где среднее количество представляет собой количество ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты.

27. Способ по любому из пп. 22-26, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%.

28. Способ по любому из пп. 22-27, где содержание LDL-C у субъекта снижается на от приблизительно 30% до приблизительно 80%.

29. Способ по любому из пп. 22-28, где снижение содержания LDL-C у субъекта составляет по меньшей мере 70% от среднего снижения содержания LDL-C, достигнутого у пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля, и получающих ингибитор PCSK9 при средней частоте введения.

30. Способ по любому из пп. 22-29, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере неделе 20 введения ингибитора PCSK9.

31. Способ лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, включающий:

идентификацию субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении HeFH или ее симптомов, где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; и

введение субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов,

где усиленная схема дозирования предусматривает введение ингибитора PCSK9 в средней дозе, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает эталонную среднюю дозу ингибитора PCSK9 для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля.

32. Способ по п. 31, где эталонная средняя доза представляет собой дозу

ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты.

33. Способ по п. 31 или п. 32, где усиленная схема дозирования предусматривает повышение частоты введения дозы и/или количества ингибитора PCSK9, вводимого субъекту.

34. Способ по любому из пп. 22-33, где верхний квартиль находится в диапазоне от приблизительно 190 мг/дл до приблизительно 220 мг/дл.

35. Способ по любому из пп. 22-34, где верхний квартиль составляет приблизительно 200 мг/дл.

36. Способ по любому из пп. 22-35, где исходное содержание LDL-C у субъекта составляет приблизительно 200 мг/дл или больше.

37. Способ по любому из пп. 22-36, где исходное содержание LDL-C составляет от приблизительно 200 мг/дл до приблизительно 550 мг/дл.

38. Способ по любому из пп. 22-37, где исходное содержание LDL-C составляет 208 мг/дл или больше.

39. Способ по любому из пп. 22-38, где ингибитор PCSK9 одобрен государственным регулирующим органом для снижения уровней холестерина LDL в сыворотке крови у пациента-человека.

40. Способ по любому из пп. 22-39, где средняя частота введения дозы представляет собой частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты.

41. Способ по любому из пп. 22-40, где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело, низкомолекулярный ингибитор или ингибирующую нуклеиновую кислоту.

42. Способ по п. 41, где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело к PCSK9, siRNA или shRNA.

43. Способ по п. 41, где ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволокумаба, алирокумаба, бокоциумаба, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, REGN728, LY3015014, 1B20, инклизирана, ISIS 394814, ALN-PCSO2, SX-PCSK9 и BMS-962476.

44. Способ по любому из пп. 22-43, где средняя частота введения дозы находится в диапазоне от приблизительно одного раза каждые 2 недели до приблизительно одного раза каждые 12 недель.

45. Способ по любому из пп. 22-44, дополнительно включающий определение квартилей исходных значений LDL-C в когорте.

46. Способ по любому из пп. 22-45, где когорта содержит по меньшей мере 25 пациентов-детей с HeFH.

47. Способ по любому из пп. 22-46, где исходные значения LDL-C среди когорты составляют по меньшей мере 130 мг/дл.

48. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий измерение исходного содержания LDL-C у субъекта.

49. Способ по любому из предыдущих пунктов, где идентификация предусматривает диагностику и/или генотипирование субъекта в отношении HeFH.

50. Способ по любому из предыдущих пунктов, где идентификация предусматривает диагностику и/или генотипирование пациента в отношении сложной формы HeFH.

51. Способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, при этом способ включает:

введение субъекту-ребенку ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, где у субъекта имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH) или ее симптомы,

где усиленная схема дозирования ингибитора PCSK9 предусматривает количество ингибитора PCSK9, которое на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднее количество стандарта лечения для взрослых, у которых имеется HeFH, и/или

частоту введения дозы ингибитора PCSK9, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднюю частоту стандарта лечения для взрослых, у которых имеется HeFH, за счет чего содержание LDL-C у субъекта снижается.

52. Способ по п. 51, где усиленная схема дозирования приводит к снижению содержания LDL-C у субъекта на по меньшей мере 30%.

53. Способ по п. 51 или п. 52, где усиленная схема дозирования приводит к снижению содержания LDL-C у субъекта на 30-80%.

54. Способ по любому из пп. 51-53, где количество ингибитора PCSK9 повышено на от приблизительно 5% до приблизительно 100% по сравнению с количеством стандарта лечения.

55. Способ по любому из пп. 51-54, где частота введения дозы ингибитора PCSK9 повышена на от приблизительно 15% до приблизительно 400% по сравнению с частотой введения дозы стандарта лечения.

56. Способ по любому из пп. 51-55, где усиленную схему дозирования продолжают до тех пор, пока не будет достигнута терапевтически приемлемая конечная точка для HeFH.

57. Способ по любому из пп. 51-56, где ингибитор PCSK9 одобрен государственным регулирующим органом для снижения содержания LDL-C у пациента-человека.

58. Способ по любому из пп. 51-57, где частота введения дозы стандарта лечения составляет от одного раза каждые 2 недели до одного раза каждые 12 недель.

59. Способ по любому из пп. 51-58, где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело к PCSK9.

60. Способ по п. 59, где антитело к PCSK9 содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую:

CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH

эволокумаба; и

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VH эволокумаба; и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую:

CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволокумаба; и

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VL эволокумаба.

61. Способ по п. 59 или п. 60, где антитело к PCSK9 представляет собой эволокумаб.

62. Способ по любому из пп. 59-61, где количество стандарта лечения составляет от 400 до 500 мг/доза.

63. Способ по любому из пп. 59-62, где количество и/или частота стандарта лечения составляет приблизительно 420 мг/месяц.

64. Способ по любому из пп. 51-63, где содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере неделе 20 введения ингибитора PCSK9.

65. Способ лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, включающий:

идентификацию субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении HeFH или ее симптомов; и

введение субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования, вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов,

где усиленная схема дозирования предусматривает введение ингибитора PCSK9 в средней дозе, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднюю дозу стандарта лечения ингибитором PCSK9 для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у взрослого пациента.

66. Способ по п. 65, где усиленная схема дозирования предусматривает более высокую частоту введения дозы ингибитора PCSK9, чем частота введения дозы стандарта лечения.

67. Способ по п. 65 или п. 66, где усиленная схема дозирования предусматривает более высокое количество ингибитора PCSK9, чем количество стандарта лечения.

68. Способ по любому из пп. 51-67, где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело, низкомолекулярный ингибитор или ингибирующую нуклеиновую кислоту.

69. Способ по п. 68, где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело к PCSK9.

70. Способ по п. 68, где ингибитор PCSK9 представляет собой siRNA или shRNA.

71. Способ по п. 68, где ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволокумаба, алирокумаба, бокоцизумаба, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, инклизирана, ISIS 394814, SX-PCSK9 и BMS-962476.

72. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий введение субъекту одного или нескольких других средств терапии для снижения



содержания холестерина LDL.

73. Способ по п. 72, где другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL предусматривает статин, фибрат, секвестрант желчных кислот, ниацин, антиагрегант, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, антагонист рецептора ангиотензина II, ингибитор ацил-КоА-холестерин-ацетилтрансферазы (АСАТ), ингибитор всасывания холестерина, ингибитор белка-переносчика сложного эфира холестерина (СЕТР), ингибитор микросомального белка-переносчика триглицеридов (МТТР), модулятор холестерина, модулятор желчных кислот, агонист рецептора активации пролиферации пероксисом (PPAR), средство на основе генной терапии, составное средство для защиты сосудов, ингибитор гликопротеина IIb/IIIa, аспирин или аспириноподобное соединение, ингибитор IВ АТ, ингибитор скваленсинтазы или ингибитор хемоаттрактантного белка моноцитов (MCP)-I.

74. Способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта-ребенка, включающий:

введение субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH, где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, составляющим приблизительно 200 мг/дл или больше,

антитела к PCSK9 с частотой введения дозы, составляющей приблизительно один раз в месяц, и в количестве от приблизительно 400 мг до приблизительно 450 мг;

по меньшей мере одного статина и

по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которое отличается от антитела к PCSK9 и по меньшей мере одного статина,

вследствие чего содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%.

75. Способ по п. 74, где антитело к PCSK9 содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую:

CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно VH эволюкумаба; и

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VH эволюкумаба; и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую:

CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно VL эволюкумаба; и

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична VL эволюкумаба.

76. Способ по п. 74 или п. 75, где антитело к PCSK9 представляет собой эволюкумаб.

77. Способ по любому из пп. 74-76, где количество составляет приблизительно 420 мг.

78. Способ лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, включающий:

введение субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH и исходное содержание холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови на уровне или выше верхнего квартиля исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH,

ингибитора PCSK9;

по меньшей мере одного статина и

по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которое отличается от ингибитора PCSK9 и по меньшей мере одного статина,

вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов,

где ингибитор PCSK9 вводят в соответствии со схемой дозирования ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля.

79. Способ по п. 78, где верхний квартиль находится в диапазоне от приблизительно 190 мг/дл до приблизительно 220 мг/дл.

80. Способ по п. 78 или п. 79, где исходное содержание LDL-C составляет приблизительно 200 мг/дл или больше.

81. Способ по любому из пп. 78-80, где ингибитор PCSK9 вводят в соответствии со схемой дозирования ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты.

82. Способ лечения или предупреждения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, включающий:

введение субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH,

ингибитора PCSK9, где ингибитор PCSK9 вводят в соответствии со схемой дозирования стандарта лечения для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у взрослого пациента;

по меньшей мере одного статина и

по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которое отличается от ингибитора PCSK9 и по меньшей мере одного статина,

вследствие чего осуществляется лечение или предупреждение HeFH или ее симптомов.

83. Способ по п. 82, где по меньшей мере одно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL вводят в соответствии с усиленной схемой дозирования, предусматривающей среднюю дозу по меньшей мере одного другого средства терапии для снижения содержания холестерина LDL, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает среднюю дозу стандарта лечения по меньшей мере одним другим средством терапии для снижения содержания холестерина LDL для лечения или предупреждения HeFH или ее симптомов у пациента-

ребенка.

84. Способ по п. 83, где схема усиленного дозирования предусматривает повышение частоты введения дозы и/или повышение количества ингибитора PCSK9.

85. Способ по любому из пп. 78-84, где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело, низкомолекулярный ингибитор или ингибирующую нуклеиновую кислоту.

86. Способ по п. 85, где ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволокумаба, алирокумаба, бокоцизумаба, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, REGN728, LY3015014, 1B20, инклизирана, ISIS 394814, SX-PCSK9 и BMS-962476.

87. Способ по любому из пп. 74-86, где по меньшей мере одно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL предусматривает второй ингибитор PCSK9.

88. Способ по п. 87, где второй ингибитор PCSK9 представляет собой низкомолекулярный ингибитор или ингибирующую нуклеиновую кислоту.

89. Способ по п. 88, где второй ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволокумаба, алирокумаба, бокоцизумаба, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, REGN728, LY3015014, 1B20, инклизирана, ISIS 394814, SX-PCSK9 и BMS-962476.

90. Способ по любому из пп. 74-89, где по меньшей мере одно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL предусматривает статин, фибрат, секвестрант желчных кислот, ниацин, антиагрегант, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, антагонист рецептора ангиотензина II, ингибитор ацил-КоА-холестерин-ацетилтрансферазы (ACAT), ингибитор всасывания холестерина, ингибитор белка-переносчика сложного эфира холестерина (СЕТР), ингибитор микросомального белка-переносчика триглицеридов (МТТР), модулятор холестерина, модулятор желчных кислот, агонист рецептора активации пролиферации пероксисом (PPAR), средство на основе генной терапии, составное средство для защиты сосудов, ингибитор гликопротеина IIb/IIIa, аспирин или аспириноподобное соединение, ингибитор IВ АТ, ингибитор скваленсинтазы или ингибитор хемоаттрактантного белка моноцитов (MCP)-I.

91. Способ по любому из предыдущих пунктов или пп. 99-102, где возраст субъекта составляет 17 лет или младше.

92. Способ по любому из предыдущих пунктов или пп. 99-102, где возраст субъекта составляет от 10 до 17 лет.

93. Способ по любому из предыдущих пунктов или пп. 99-102, где у субъекта имеется сложная форма НсFH.

94. Способ по любому из предыдущих пунктов или пп. 99-102, где субъект получает по меньшей мере одно другое средство терапии для снижения содержания холестерина LDL.

95. Способ по любому из предыдущих пунктов или пп. 99-102, где ингибитор PCSK9 или антитело к PCSK9 вводят подкожно или внутривенно.

96. Набор для лечения субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или

предупреждении гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, содержащий:

лекарственную форму, содержащую ингибитор PCSK9 в количестве, достаточном для введения ингибитора PCSK9 субъекту-ребенку, у которого имеется HeFH, в усиленной схеме дозирования, предусматривающей введение субъекту ингибитора PCSK9 с частотой введения дозы, которая в по меньшей мере 2 раза превышает среднюю частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше верхнего квартиля.

97. Набор по п. 96, где средняя частота введения дозы представляет собой частоту введения дозы ингибитора PCSK9 для пациентов-детей с HeFH, характеризующихся исходным значением LDL-C, которое меньше медианы исходных значений LDL-C среди когорты.

98. Набор для лечения субъекта-ребенка, нуждающегося в лечении или предупреждении гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) или ее симптомов, содержащий:

лекарственную форму, содержащую ингибитор PCSK9 в количестве, достаточном для введения ингибитора PCSK9 субъекту-ребенку, в усиленной схеме дозирования, предусматривающей введение субъекту ингибитора PCSK9 в дозировке, которая на от приблизительно 20% до приблизительно 500% превышает дозировку стандарта лечения ингибитора PCSK9 для лечения или предупреждения связанного с холестерином нарушения у взрослого пациента с HeFH.

99. Способ снижения содержания холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови, включающий:

введение субъекту ингибитора PCSK9,

где у субъекта имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия,

где субъект представляет собой субъекта-ребенка,

где ингибитор PCSK9 вводят в количестве, которое является по меньшей мере таким же эффективным, как 420 мг эволокумаба,

где ингибитор PCSK9 вводят с частотой каждые две недели или больше,

за счет чего уровень LDL-C субъекта снижается на более чем 30%.

100. Способ снижения холестерина LDL (LDL-C) в сыворотке крови у субъекта, включающий:

идентификацию субъекта-ребенка, у которого имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (HeFH), где субъект характеризуется исходным содержанием LDL-C, превышающим верхний квартиль исходных значений LDL-C среди когорты пациентов-детей с HeFH; и

введение субъекту ингибитора PCSK9 в усиленной схеме дозирования,

где усиленная схема дозирования предусматривает частоту и/или количество введения дозы, которые на от 20% до 500% превышают среднюю частоту введения дозы и/или среднее количество, указанные на этикетке, одобренной государственным

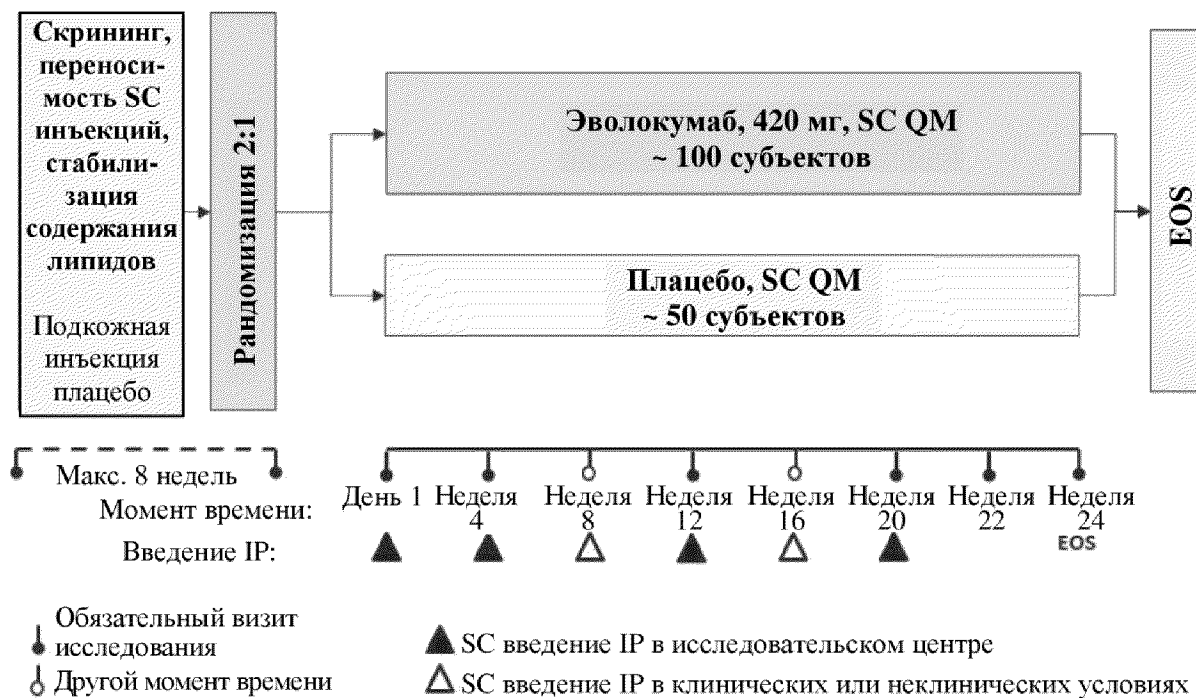
регулирующим органом, для ингибитора PCSK9, за счет чего содержание LDL-C у субъекта снижается на по меньшей мере 30%.

101. Способ по п. 100, где усиленная схема дозирования предусматривает частоту введения дозы, которая в по меньшей мере 2 раза превышает среднюю частоту введения дозы.

102. Способ по любому из пп. 99-101, где ингибитор PCSK9 предусматривает одно или несколько из эволокумаба, алирокумаба, бокоцизумаба, 1D05-IgG2, RG-7652, LGT209, REGN728, LY3015014, 1B20, инклизирана, ISIS 394814, ALN-PCS02, SX-PCSK9 и BMS-962476.

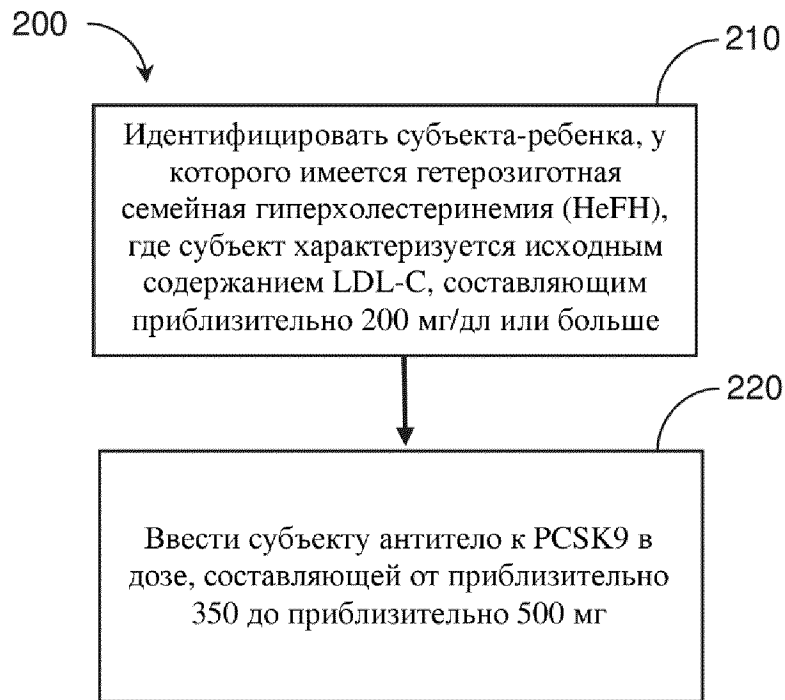
По доверенности

1/26

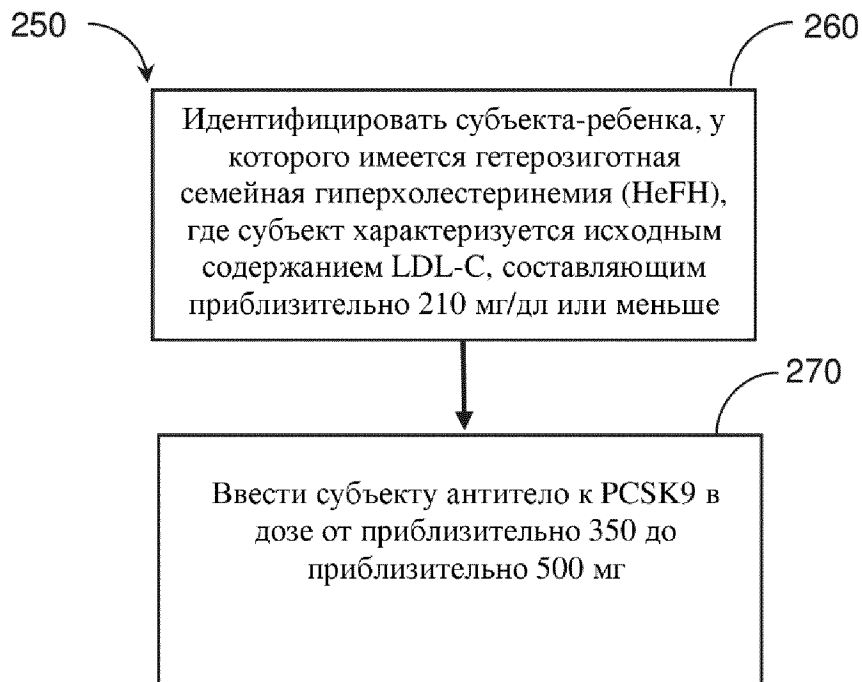


QM= ежемесячное введение дозы; IP = исследуемый препарат

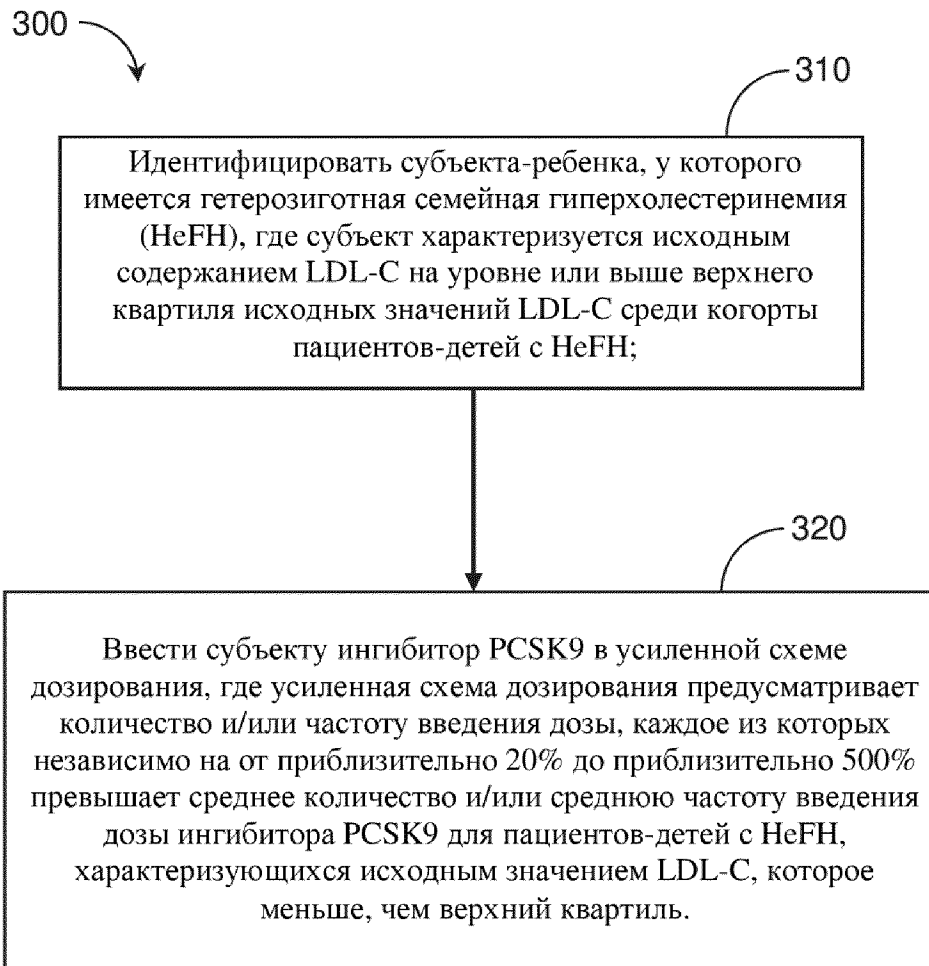
**Фиг. 1**



Фиг. 2А

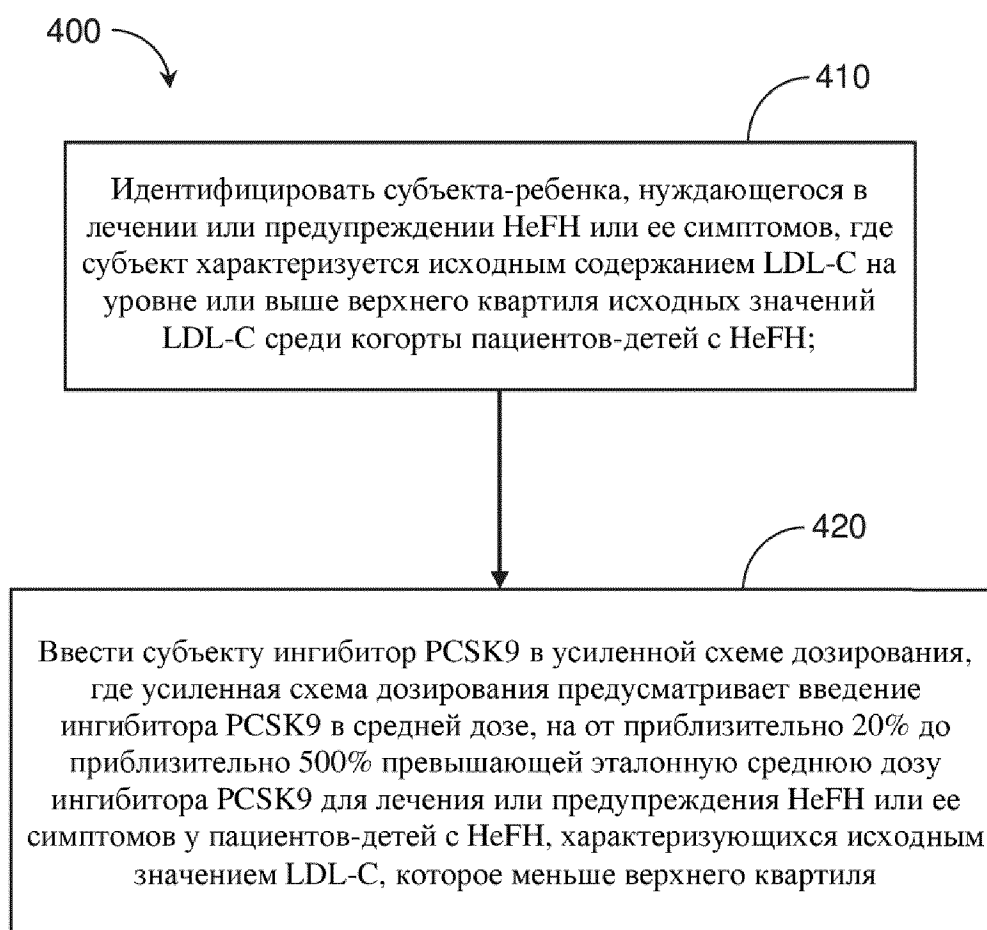


Фиг. 2В

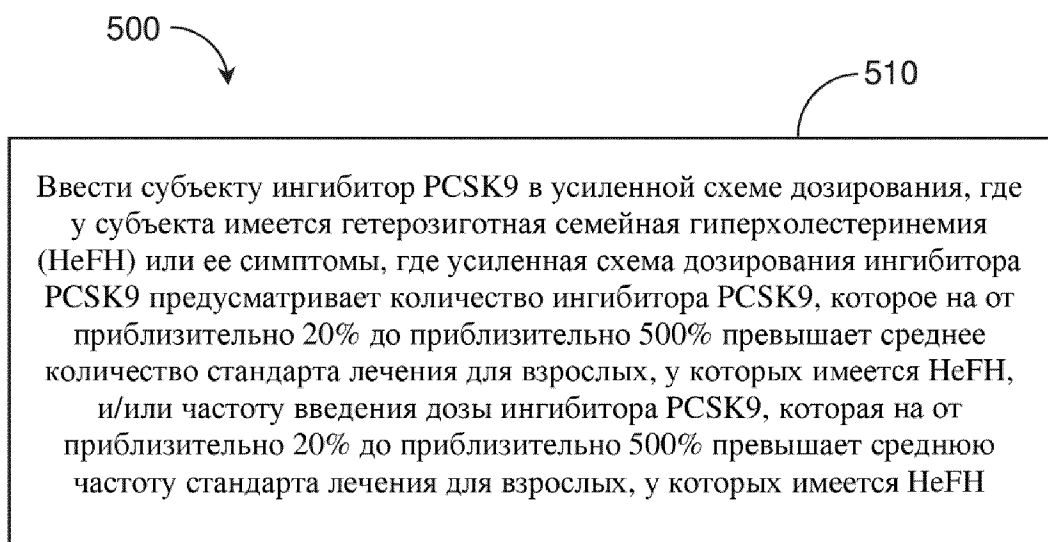


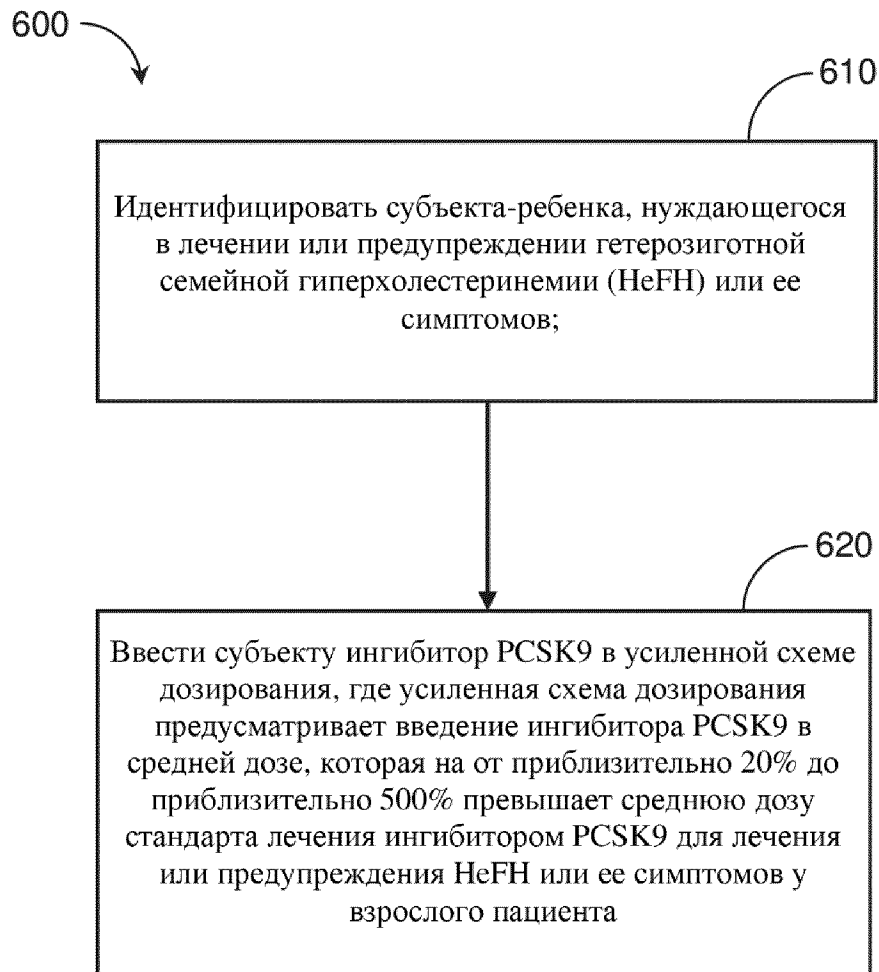
Фиг. 3



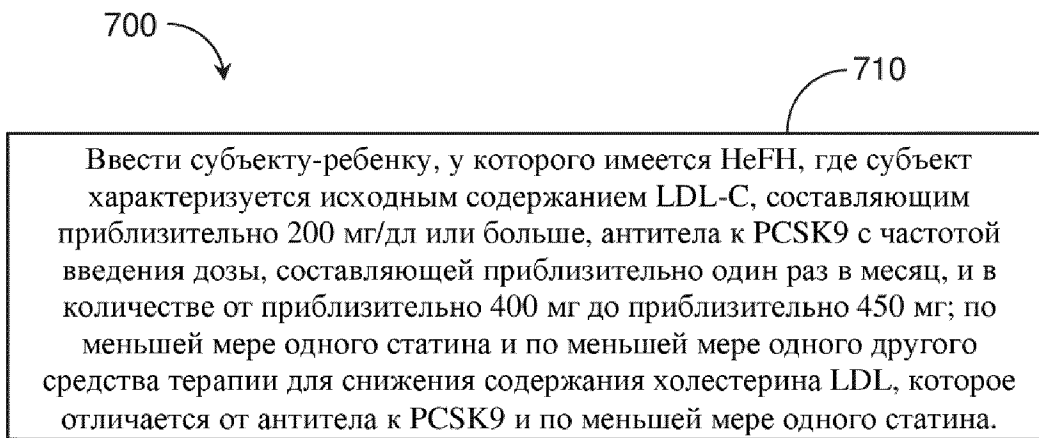


Фиг. 4

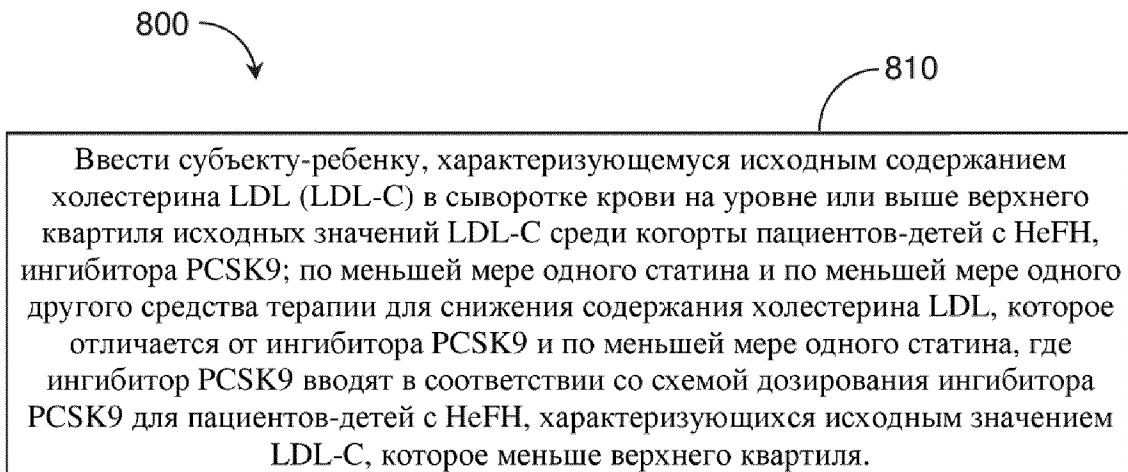
**Фиг. 5**



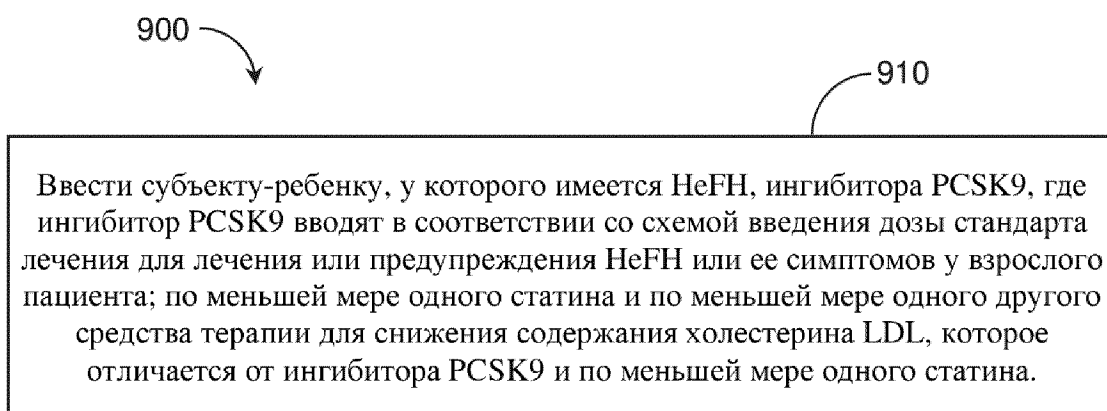
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

**Фиг. 9**

1        gededgdyee lvlalrseed glaeapehgt tatfhrcakd pwrlpgtyvv vlkeethlsq  
 61        sertarrlqa qaarrgyltk ilhvfhgllp gflvkmsgdl lelalklphv dyieedssvf  
 121       agsipwnler itppryrade yqppdggslv evylldtsiq sdhreiegrv mvtdfenvpe  
 181       edgtrfhrqa skcdshgthl agvvsgrdag vakgasmrsl rvlncqgkgt vsgtliglef  
 241       irksqlvqpv gplvllpla ggysrvlnaa cqrlaragvv lvtaagnfrd daclyspasa  
 301       pevitvgatn aqdqpvltgt lgtnfgrcvd lfappediig assdcstcfv sqsgtsqaaa  
 361       hvgiaamml saepeltlae lrqrlihfsa kdvineawfp edqrvltpnl vaalppsthg  
 421       agwqlfcrtv wsahsgptrm ataiarcapd eellscssfs rsgkrrgerm eaqggklvcr  
 481       ahnafggeg v yaiarccllp qancsvhtap paeasmgtrv hchqqghvlt gcsshweved  
 541       lgthkppvlr prgqpnqcvg hreasihasc chapgleckv kehgipapqe qvtvaceegw  
 601       tltgcsalpg tshvlgayav dntcvvrsrd vsttgstsee avtavaiccr srhlaqasqe  
 661       lq                    (SEQ ID NO:1)

**Фиг. 10А**

gededgdyee lvlalrseed glaeapehgt tatfhrcakd pwrlpgtyvv  
vlkeethlsq sertarrlqa qaarrgyltk ilhvfhgllp gflvkmsgdl  
lelalklphv dyieedssvf agsipwnler itppryrade yqppdggslv  
 evylldtsiq sdhreiegrv mvtdfenvpe edgtrfhrqa skcdshgthl  
 agvvsgrdag vakgasmrsl rvlncqgkgt vsgtliglef irksqlvqpv  
 gplvllpla ggysrvlnaa cqrlaragvv lvtaagnfrd daclyspasa  
 pevitvgatn aqdqpvltgt lgtnfgrcvd lfappediig assdcstcfv  
 sqsgtsqaaa hvgiaamml saepeltlae lrqrlihfsa kdvineawfp  
 edqrvltpnl vaalppsthg agwqlfcrtv wsahsgptrm ataiarcapd  
 eellscssfs rsgkrrgerm eaqggklvcr ahnafggeg v yaiarccllp  
 qancsvhtap paeasmgtrv hchqqghvlt gcsshweved lgthkppvlr  
 prgqpnqcvg hreasihasc chapgleckv kehgipapqe qvtvaceegw  
 tltgcsalpg tshvlgayav dntcvvrsrd vsttgstsee avtavaiccr  
 srhlaqasqe lq                    (SEQ ID NO:2)

**Фиг. 10В**

```

1      atgggcaccg tcagctccag gcggtcctgg tggccgctgc cactgctgct gctgctgctg
61     ctgctcctgg gtccccgagg cgccccgtgc caggaggacg aggacggcga ctacgaggag
121    ctggtgctag ccttgcgttc cgaggaggac ggccctggccg aagcaccgga gcacggaacc
181    acagccacct tccaccgctg cgccaaggat ccgtggagggt tgccctggcac ctacgtggtg
241    gtgctgaagg aggagaccca cctctcgtag tcagagcgca ctgcccgcgg cctgcaggcc
301    caggctgccc gccggggata cctcaccaag atcctgcatg tcttccatgg ccttcttctt
361    ggcttcctgg tgaagatgag tggcgacctg ctggagctgg ccttgaagtt gccccatgtc
421    gactacatcg aggaggactc ctctgtcttt gccagagca tcccgtggaa cctggagcgg
481    attacccctc cacggtaccg ggcgatgaa taccagcccc ccgacggagg cagcctggtg
541    gaggtgtatc tcctagacac cagcatacag agtgaccacc gggaaatcga gggcagggtc
601    atggtcaccg acttcgagaa tgtgcccagag gaggacggga cccgcttcca cagacaggcc
661    agcaagtgtg acagtcatgg caccacacctg gcaggggtgg tcagcggcgg ggatgccggc
721    gtggccaagg gtgccagcat gcgcagcctg cgcgtgctca actgccaagg gaagggcacg
781    gttagcggca ccctcatagg cctggagttt attcggaaaa gccagctggt ccagcctgtg
841    gggccaactg tggctgctgct gccctggcg ggtgggtaca gcccgctcct caacgccgcc
901    tgccagcggc tggcgagggc tggggtcgtg ctggtcaccg ctgccggcaa cttccgggac
961    gatgctgccc tctactcccc agcctcagct cccgaggtca tcacagttgg gcccaccaat
1021   gcccaggacc agccggtgac cctggggact ttggggacca actttggccg ctgtgtggac
1081   ctctttgccc caggggagga catcattggt gcctccagcg actgcagcac ctgctttgtg
1141   tcacagagtg ggacatcaca ggctgctgcc cacgtggctg gcattgcage catgatgctg
1201   tctgccgagc cggagctcac cctggccgag ttgaggcaga gactgatcca cttctctgcc
1261   aaagatgtca tcaatgaggc ctggttccct gaggaccagc gggtaactgac ccccaacctg
1321   gtggccgccc tgccccccag caccatggg gcaggttggc agctgttttg caggactgtg
1381   tggtcagcac actcggggcc tacacggatg gccacagcca tcgcccgtg cgccccagat
1441   gaggagctgc tgagctgctc cagtttctcc aggagtggga agcggcgggg cgagcgcgatg
1501   gaggcccaag ggggcaagct ggtctgcccg gccacaacg cttttggggg tgagggtgtc
1561   tacgccattg ccaggtgctg cctgctacct caggccaact gcagcgtcca cacagctcca
1621   ccagctgagg ccagcatggg gaccctgtct cactgccacc aacagggcca cgtcctcaca
1681   ggctgcagct cccactggga ggtggaggac cttggcacc acaagccgcc tgtgctgagg
1741   ccacgaggtc agcccaacca gtgctggtgg cacagggagg ccagcatcca cgttctctgc
1801   tgccatgccc caggtctgga atgcaaagtc aaggagcatg gaatcccggc cctcaggag
1861   caggtgaccg tggcctgcca ggagggtggt accctgactg gctgcagtgc cctcctggg
1921   acctcccacg tcttgggggc ctacgccgta gacaacacgt gtgtagtcag gagccgggac
1981   gtcagcacta caggcagcac cagcgaagag gccgtgacag ccgttgccat ctgctgccgg
2041   agccggcacc tggcgaggc ctcccaggag ctccagtga (SEQ ID NO: 3)

```

Фиг. 11

```
1      mgtvssrrsw wplpllllll lllgpagara gededgdyee lvlalrseed glaeapehgt  
61     tatfhrcakd pwrlpgtyvv vlkeethlsq sertarrlqa qaarrgyltk ilhvfhgllp  
121    gflvkmsgdl lelalklphv dyieedssvf agsipwnler itppryrade yqppdggslv  
181    evylldtsiq sdhreiegrv mvtdfenvpe edgtrfhrqa skcdshgthl agvvsgrdag  
241    vakgasmrsl rvlncqgkgt vsgtliglef irksqlvqpv gplvllpla ggysrvlnaa  
301    cqrlaragvv lvtaagnfrd daclyspasa pevitvgatn aqdqpvtlgt lgtnfgrcvd  
361    lfappediig assdcstcfv sqsgtsqaaa hvagiaamm1 saepeltlae lrqrlihfsa  
421    kdvineawfp edqrvltpnl vaalppsthg agwqlfctv wsahsgptrm ataiarcapd  
481    eellscssfs rsgkrrgerm eaqggklvcr ahnafgggev yaiarccllp qancsvhtap  
541    paeasmgtrv hchqqghvlt gcsshweved lgthkppv1r prgqpnqcvg hreasihasc  
601    chappleckv kehqipapqe qvtvaceegw tltgcsalpg tshvlgayav dntcvvrsrd  
661    vsttgstsee avtavaiccr srhlaqasqe lq (SEQ ID NO: 4)
```

Фиг. 12



```

          10      20      30      40      50
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : atgggcaccgctcagctccaggcggctcctggtggccgctgccactgctgct
Рамка 1 : M G T V S S R R S W W P L P L L L

          60      70      80      90      100
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : gctgctgctgctgctcctgggtcccgcgggcgcccgctgcccaggaggacg
Рамка 1 : L L L L L L G P A G A R A Q E D E

          110     120     130     140     150
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : aggacggcgactacgaggagctggtgctagccttgcgctccgaggaggac
Рамка 1 : D G D Y E E L V L A L R S E E D

          160     170     180     190     200
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : ggcctggccgaagcaccgcagcaccggaaccacagccaccttcaccgctg
Рамка 1 : G L A E A P E H G T T A T F H R C

          210     220     230     240     250
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : cgccaaggatccgctggagggtgacctggcacctacgtggtggtgctgaagg
Рамка 1 : A K D P W R L P G T Y V V V L K E

          260     270     280     290     300
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : aggagaccacacctctcgagtcagagcgcactgcccgcgcctgcaggcc
Рамка 1 : E T H L S Q S E R T A R R L Q A

          310     320     330     340     350
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : caggctgcccgccgggataacctcaccgaagatcctgcatgtcttccatgg
Рамка 1 : Q A A R R G Y L T R I L H V F H G

          360     370     380     390     400
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : ccttcttccctggtctcctggtgaagatgagtgggcgacctgctggagctgg
Рамка 1 : L L P G F L V K M S G D L L E L A

          410     420     430     440     450
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : ccttgaagttgccccatgtcgactacatcgaggaggactcctctgtcttt
Рамка 1 : L K L P H V D Y I E E D S S V F

          460     470     480     490     500
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : gccagagcatcccgtggaacctggagcggattacccctccgcggtaccg
Рамка 1 : A Q S I P W N L E R I T P P R Y R

          510     520     530     540     550
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : ggcggatgaataccagccccccgacggaggcagcctggtggaggtgtatc
Рамка 1 : A D E Y Q P P D G G S L V E V Y L

```

Фиг. 13

```

50      560      570      580      590      600
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tcctagacaccagcatacagagtgccaccgggaaatcgagggcagggtc
Рамка 1 : L D T S I Q S D H R E I E G R V

610      620      630      640      650
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : atggtcaccgacttcgagaatgtgcccgaggaggacgggaccccgctcca
Рамка 1 : M V T D F E N V P E E D G T R F H

50      660      670      680      690      700
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : cagacaggccagcaagtgtgacagtcattggcaccacccctggcaggggtgg
Рамка 1 : R Q A S K C D S H G T H L A G V V

710      720      730      740      750
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tcagcggccgggatgccggcggtggccaagggtgccagcatggcagcctg
Рамка 1 : S G R D A G V A K G A S M R S L

50      760      770      780      790      800
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : cgcgtgctcaactgccaaagggaaagggcacgggttagcggcaccctcatagg
Рамка 1 : R V L N C Q G K G T V S G T L I G

810      820      830      840      850
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : cctggagtttatttcgaaaagccagctggtccagcctgtggggccactgg
Рамка 1 : L E F I R K S Q L V Q P V G P L V

50      860      870      880      890      900
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tggtgctgctgcccctggcgggtgggtacagccgctcctcaacgcccgc
Рамка 1 : V L L P L A G G Y S R V L N A A

910      920      930      940      950
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tgccagcgcctggcgagggctggggctgctgctggtcaccgctgccggcaa
Рамка 1 : C Q R L A R A G V V L V T A A G N

50      960      970      980      990      1000
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : cttccgggacgatgcctgcctcctactccccagcctcagctcccaggtca
Рамка 1 : F R D D A C L Y S P A S A P E V I

1010     1020     1030     1040     1050
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tcacagttggggccaccaatgcccaggaccagccggtgaccctggggact
Рамка 1 : T V G A T N A Q D Q P V T L G T

50      1060     1070     1080     1090     1100
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : ttggggaccacactttggcgcgtgtgtggacctctttgccccaggggagga
Рамка 1 : L G T N F G R C V D L F A P G E D

```

Фиг. 13 (продолж. 1)

```

      100      1110      1120      1130      1140      1150
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : catcattgggtgacctccagcgaactgcagcacctgctttgtgtcacagagtg
Рамка 1 : I I G A S S D C S T C F V S Q S G

      150      1160      1170      1180      1190      1200
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : ggacatcacaggctgctgccccagtggtggcattgcagccatgatgctg
Рамка 1 : T S Q A A A H V A G I A A M M L

      200      1210      1220      1230      1240      1250
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tctgcccagccggagctcaccctggccgagttgaggcagagactgatcca
Рамка 1 : S A E P E L T L A E L R Q R L I H

      250      1260      1270      1280      1290      1300
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : cttctctgccaaagatgtcatcaatgaggcctggttccctgaggaccagc
Рамка 1 : F S A K D V I N E A W F P E D Q R

      300      1310      1320      1330      1340      1350
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : gggactgaccccccaacctgggtggccgacctgccccccagcacccatggg
Рамка 1 : V L T P N L V A A L P P S T H G

      350      1360      1370      1380      1390      1400
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : gcagggtggcagctgttttgccaggactgtgtggtcagcacactcggggcc
Рамка 1 : A G W Q L F C R T V W S A H S G P

      400      1410      1420      1430      1440      1450
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tacacggatggccacagccatcgcccgctgcgccccagatgaggagctgc
Рамка 1 : T R M A T A I A R C A P D E E L L

      450      1460      1470      1480      1490      1500
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tgagctgctccagtttctccaggagtgggaagcggcggggcgagcgcatg
Рамка 1 : S C S S F S R S G K R R G E R M

      500      1510      1520      1530      1540      1550
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : gaggcccaagggggcaagctgggtctgcccggcccacaacgcttttggggg
Рамка 1 : E A Q G G K L V C R A H N A F G G

      550      1560      1570      1580      1590      1600
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tgagggtgtctacgccattgccagggtgctgctgctaccocaggccaact
Рамка 1 : E G V Y A I A R C C L L P Q A N C

      600      1610      1620      1630      1640      1650
      -----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : gcagcgtccacacagctccaccagctgaggccagcatggggaccctgtgc
Рамка 1 : S V H T A P P A E A S M G T R V

```

Фиг. 13 (продолж. 2)

```

        650      1660      1670      1680      1690      1700
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : cactgccaccaaacaggccacgtcctcacaggctgcagctcccactggga
Рамка 1 : H C H Q Q G H V L T G C S S H W E

        700      1710      1720      1730      1740      1750
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : ggtggaggaccttggcaccacaaagccgctgtgctgaggccacgaggtc
Рамка 1 : V E D L G T H K P P V L R P R G Q

        750      1760      1770      1780      1790      1800
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : agccsaaccagtgcgtggccacagggaggccagcatccacgcttccctgc
Рамка 1 : F N Q C V G H R E A S I H A S C

        800      1810      1820      1830      1840      1850
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tgccatgccccaggctctggaatgcaaatgcaaggagcatggaatccccgc
Рамка 1 : C H A P G L E C K V K E H G I P A

        850      1860      1870      1880      1890      1900
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : ccctcaggggcaggtgaccgtggcctgagaggaggctggaccctgactg
Рамка 1 : P Q G Q V T V A C E E G W T L T G

        900      1910      1920      1930      1940      1950
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : gctgcagcgcctccctgggacctcccacgtcctgggggacctacgcegtg
Рамка 1 : C S A L P G T S H V L G A Y A V

        950      1960      1970      1980      1990      2000
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : gacaacacgtgtgtagtcaggagccgggacgtcagcactacaggcagcac
Рамка 1 : D N T C V V R S R D V S T T G S T

                2010      2020      2030      2040      2050
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : cagcgaagaggccgtgacagccggttgccatctgctgccggagccggcacc
Рамка 1 : S E E A V T A V A I C C R S R H L

        50      2060      2070      2080      2090      2100
-----|-----|-----|-----|-----|
Запрос : tggcgcaggcctcccaggagctccag
Рамка 1 : A Q A S Q E L Q

```

SEQ ID NO:5  
SEQ ID NO:6

**Фиг. 13 (продолж. 3)**

## СТРУКТУРНАЯ ФОРМУЛА

## Тяжелая цепь (SEQ ID

EVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTLT	SYGISWVRQA	PGQGLEWMGW	50
VSFYNGNTNY	AQKLGGRGTM	TTDPSTSTAY	MELRSLRSDD	TAVYYCARGY	100
GMDVWGQGT	VTVSSASTKG	PSVFPAPCS	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	150
PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL	SSVTVPSSN	FGTQTYTCNV	200
DHKPSNTKVD	KTVERKCCVE	CPPCPAPPVA	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	250
PEVTCVVVDV	SHEDPEVQFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQF	NSTFRVVSVL	300
TVVHQDWLNG	KEYKCKVSNK	GLPAPIEKTI	SKTKGQPREP	QVYTLPPSRE	350
EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTPP	MLDSDGSFFL	400
YSKLTVDKSR	WQQGNVFSCS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	K	441

## Легкая цепь (SEQ ID NO:8)

ESALTQPAASV	SGSPGQSITI	SCTGTSSDVG	GYNSVSWYQQ	HPGKAPKLM	50'
YEVSNRPSGV	SNRFSGSKSG	NTASLTISGL	QAEDEADYYC	NSYTSTSMVF	100'
GGGTKLTVLG	QPKAAPSVTL	FPPSSEELQA	NKATLVCLIS	DFYFGAVTVA	150'
WKADSSPVKA	GVETTTPSKQ	SNNKYAASSY	LSLTPEQWKS	HRSYSCQVTH	200'
EGSTVEKTVA	PTECS				215'

## Дисульфидные мостики

22'-90'	22'''-90'''	22-96	22''-96''	129-214'	129''-214'''
137'-196'	137'''-196'''	142-198	142''-198''	217-217''	218-218''
221-221''	224-224''	255-315	255''-315''	361-419	361''-419''

## Сайты гликозилирования (N)

Asn-291 Asn-291''

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФОРМУЛА



## ЭВОЛОКУМАБ

Фиг. 14

**алирокумаб****Тяжелая цепь (SEQ ID NO:9)**

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFN	NYAMNWVRQA	PGKGLDWVST	50
ISGSGGTTNY	ADSVKGRFII	SRDSSKHTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKDS	100
NWGNFDLWGR	GTLVTVSSAS	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY	150
FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL	YSLSSVVTVP	SSSLGTQTYI	200
CNVNHKPSNT	KVDKKVEPKS	CDKTHTCPPC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	250
TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	300
YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	350
TLPPSRDELT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD	400
SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPG	447

**Легкая цепь (SEQ ID NO:10)**

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSVL	YRSNNRNFLG	WYQOKPGQPP	50
NLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQQYYTT	100
PYTFGQGTKL	EIKRTVAAPS	VFIFPPSDEQ	LKSGTASVVC	LLNNFYPREA	150
KVQWKVDNAL	QSGNSQESVT	EQDSKDSTYS	LSSTLTLSKA	DYEKHKVYAC	200
EVTHQGLSSP	VTKSFNRGEC				220

**Фиг. 15A****Бокоцизумаб****Тяжелая цепь (SEQ ID NO:11)**

QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYMHWVRQA	PGQGLEWMGE	50
ISPFGGRTNY	NEKFKSRVTM	TRDTSTSTVY	MELSSLRSED	TAVYYCARER	100
PLYASDLWGQ	GTTVTVSSAS	TKGPSVFPLA	PCSRSTSEST	AALGCLVKDY	150
FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL	YSLSSVVTVP	SSNFGTQTYT	200
CNVDHKPSNT	KVDKTVERKC	CVECPPCPAP	PVAGPSVFLF	PPKPKDTLMI	250
SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	QFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQFNSTFRVV	300
SVLTVVHQDW	LNGKEYKCKV	SNKGLPSSIE	KTISKTKGQP	REPQVYTLPP	350
SREEMTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPMLDSDGS	400
FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK	444

**Легкая цепь (SEQ ID NO:12)**

DIQMTQSPSS	LSASVGDRVY	ITCRASQGIS	SALAWYQQKP	GKAPKLLIYS	50
ASYRYTGVPV	RFGSGSGTD	FTFTISSLQP	EDIATYYCQQ	RYSLWRTFGQ	100
GTKLEIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	150
DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	200
LSSPVTKSFN	RGEC				214

**Фиг. 15B**

Seq ID No.	ЛИНИЯ	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
13		Зародышевая линия			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFQSYGIS	WVRQAPGQGLEWMG
14	20D10	VH1-18		JH6B	-I-----	--PL-----	-----
15	26E10	VH1-18		JH6B	-----	---L-----	-----
16	21B12	VH1-18		JH6B	-----	---L-----	-----
17	23G1	VH1-18		JH6B	-----	---L-----	-----
18	26H5	VH1-18		JH6B	-----	---L-----	-----
19	27H5	VH1-18		JH6B	-----R-----	---L-----	-----
20	31D1	VH1-18		JH6B	-I-----	---L-----	-----
21	27E7	VH1-18		JH6B	-----L-----	--SL-----	-----
22	30B9	VH1-18		JH6B	-----	--PL-----	-----
23	19H9	VH1-18		JH6B	-----	--AL-----	-----
24	17C2	VH1-18		JH6B	-----	--S-----	-----
25	25A7	VH1-18		JH6B	-----	---P-----	-----
26		Зародышевая линия			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFQSYGIS	WVRQAPGQGLEWMG
27	3B6	VH1-18		JH4B	-----	-----	-----
28		Зародышевая линия			EVQLVE SGGGLVQP GGS LRLSCAAS	GFT FSSY WMS	WVRQAPGK GLEWVA
29	9H6	VH3-7	D7-27	JH3A	-----	-----R-----	-----
30		Зародышевая линия			EVQLVE SGGGLVQP GGS LRLSCAAS	GFT FSSY WMS	WVRQAPGK GLEWVA
31	9C9	VH3-7	D7-27	JH3B	-----VV-----	-----	-----
32	1A12	VH3-7	D7-27	JH3B	-----	-L--NF---	-----
33		Зародышевая линия			EVQLVE SGGGLV K P GGS LRLSCAAS	GFT FSSY SMN	WVRQAPGK GLEWVS
34	31H4	VH3-21	D3-3	JH3A	-----	-----	-----
35		Зародышевая линия			EVQLLE SGGGLVQP GGS LRLSCAAS	GFT FSSY AMS	WVRQAPGK GLEWVS
36	13B5	VH3-23		JH4B	-----	-----	-----

Фиг. 16

Seq ID No.	ЛИНИЯ	CDR2	FR3	CDR3	FR4
13		WISAYNGNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCAR	YGMDV	WGQGTTVTVSS
14	20D10	-----V--	S-----V-----	G-----	-----
15	26E10	-V-F-----	-G-----P-----	G-----	-----
16	21B12	-V-F-----	-G-----P-----	G-----	-----
17	23G1	-V-F-----	-G-----P-----	G-----	-----
18	26H5	--F-----V--	-----V-----	G-----	-----
19	27H5	--V-----V--	-----V-----S-----	G-----	-----
20	31D1	--F-----V--	-----V-----F--	G-----	-----
21	27E7	-----V--	-----V--V-----	G-----	-----
22	30B9	-----V--	-----V-----	G-----	-----
23	19H9	-----V--	-----V-----	G-----	-----
24	17C2	-V-----F--	-----	G-V--	-----
25	25A7	-----E--	-----V-----F--	G-V--	-----
26		WISAYNGNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCAR	GY DY	WGQGLVTVSS
27	3B6	---T-----V--	-----	--TR--	-----
28		NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	NWG AFDV	WGQGTMTVTVSS
29	9H6	---H-----	-----	ES---F---	--H-----
30		NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	NWG AFDI	WGQGTMTVTVSS
31	9C9	-----	-----	ES---F---	-----
32	1A12	-----	-----S-T-	ES---F---	-----
33		SISSSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	DYDFWSGYTAFDV	WGQGTMTVTVSS
34	31H4	-----S-----	-----F--	-----A--D-----	-----
35		AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	FDY	WGQGLVTVSS
36	13B5	T-----R-----	-----	EVGSP--	-----

Фиг. 16 (продолж.)



Seq ID No.	ЛИНИЯ	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
37		<b>Зародышевая линия</b>			EVQLLES	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
38	23B5	VH3-23	D2-8	JH4B	-----	-----N	-----
39	25G4	VH3-23	D2-8	JH4B	-----	-----N	-----
40		<b>Зародышевая линия</b>			QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
41	30A4	VH3-33		JH6B	-----	-----	-----
42		<b>Зародышевая линия</b>			QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
43	27A6	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-----	----N-F---	-----
44	28B12	VH3-33	D6-6	JH6B	-----	-----F---	-----
45	28B12v1	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-----	-----F---	-----
46	28D6	VH3-33	D6-6	JH6B	-----	-----F---	-----
47	16F12	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-----	----N-F---	-----
48	22E2	VH3-33	D6-6	JH6B	-----	-----F---	-----
49	31B12	VH3-33	D6-6	JH6B	-----	-----	-----
50	31B12v1	VH3-33	D6-6	JH6B	-----	-----	-----C---
51		<b>Зародышевая линия</b>			QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
52	31G11	VH3-33	D6-19	JH6B	-----	----R-----	-----
53		<b>Зародышевая линия</b>			QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVS	GGSISSGGY YWS	WIRQHPGKGLEWIG
54	3C4	VH4-31		JH6B	-----	-----SD---	-----
55		<b>Зародышевая линия</b>			QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVS	GGSISSGGY YWS	WIRQHPGKGLEWIG
56	27B2	VH4-31	D5-5	JH4B	-----	-----	-----
57		<b>Зародышевая линия</b>			QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY	GGSPSGYYWS	WIRQPPGKGLEWIG
58	31A4	VH4-34	D6-6	JH4B	-----	----A---N	-----
59		<b>Зародышевая линия</b>			QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAIS	GDSVSSNSAAWN	WIRQSPSRGLEWLG
60	13H1	VH6-1		JH4B	-----	-----	-----

20/26

Фиг. 17

Seq ID No.	ЛИНИЯ	CDR2	FR3	CDR3	FR4
37		AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK	VLMVYA DY	WGQGTLVTVSS
38	23B5	T-----DN-----	-----	KF-----ML--	-----
39	25G4	T-----N-----	-----	KF-----ML--	-----
40		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	YYYGMDV	WGQGTTVTVSS
41	30A4	-----D-----	-----	ETGPLKL-----	-----
42		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	IAA GMDV	WGQGTTVTVSS
43	27A6	L--S---D-----	-----	AIAALY YYY----	-----
44	28B12	L--N-----	-----	AIAALY YYY----	--H-----
46	28D6	L--N-----	-----	AIAALY YYY----	-----
47	16F12	L--S---DE-----	-----	AIAALY YYY----	-----
48	22E2	L--N-----	-----	AIAALY YYY----	-----
114	22E2v1	L--N-----	-----	AIAALY YYY----	-----
49	31B12	I-----	-----	RGGLAARPG----	-----
50	31B12v1	I-----	-----	RGGL--PG----	-----
51		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	GI AVAY YYYGMDV	WGQGTTVTVSS
52	31G11	L--H---T--V-----	-----	-----	-----
53		YIYYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	YYYGMDV	WGQGTTVTVSS
54	3C4	-----	-I-----L-----	GGVTT---A---	-----
55		YIYYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	EDTAMV YFDY	WGQGTLVTVSS
56	27B2	--N-----	-----	-----P-----	-----
57		EINHSGSTNYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	GQLV FDY	WGQGTLVTVSS
58	31A4	-----R-D-----	-----K-----N-----	-----P---	-----
59		RTYYRSKWYNDYAVSVKS	RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR	FDY	WGQGTLVTVSS
60	13H1	-----KN-S-----	-----G-----	GGPTAA---	-----

Фиг. 17 (продолж.)

Seq ID No.	ЛИНИЯ	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
61	<b>Зародышевая линия</b>				DIVMTQSP <sup>LS</sup> LPVTPGEPAS <sup>I</sup> SC	RSSQSL <sup>LL</sup> HSNGYNYLD	WY <sup>L</sup> QKPGQSPQ <sup>LL</sup> IY
62	30A4	A3		JK3	-----S-----P-----	-----F-N	-----
63	<b>Зародышевая линия</b>				DIQMTQSP <sup>SSL</sup> SASVGD <sup>RVT</sup> ITC	RASQSI <sup>SS</sup> YLN	WY <sup>Q</sup> QKPGKAPK <sup>LL</sup> IY
64	3C4	O2		JK4	-----	---R--N--S	--L----I-----
65	<b>Зародышевая линия</b>				DIQMTQSP <sup>SSL</sup> SASVGD <sup>RVT</sup> ITC	RASQSI <sup>SS</sup> YLN	WY <sup>Q</sup> QKPGKAPK <sup>LL</sup> IY
66	23B5	O2		JK5	--L-----	-----	-----V---
67	25G4	O2		JK5	-----	-----I---	-----Y---
67	<b>Зародышевая линия</b>				QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC	TGSSSNIGAGYDVH	WY <sup>Q</sup> QLPGTAPK <sup>LL</sup> IY
69	31H4	V1-13		JL2	-----	-----	-----S
70	27B2	V1-13		JL2	-----	-----H---	-----V-----
71	<b>Зародышевая линия</b>				QSAL <sup>T</sup> QPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGGYNYVS	WY <sup>Q</sup> QH <sup>PG</sup> KAPK <sup>LM</sup> IY
72	25A7	V1-4		JL2	-----	-----R--S--	---H-----V---
73	27H5	V1-4		JL2	-----	-----S--	-----P-----
74	26H5	V1-4		JL2	-----	-----S--	-----P-----
75	31D1	V1-4		JL2	-----	-----S--	-----P-----
76	20D10	V1-4		JL2	-----	-----S--	---Y---P---K---
77	27E7	V1-4		JL2	-----	-----S--	-----P-----
78	30B9	V1-4		JL2	-----	-----S--	-----P-----
79	19H9	V1-4		JL2	-----	---N-----S--	-----P-----
80	26E10	V1-4		JL2	-----	-----S--	-----
81	21B12	V1-4		JL2	-----	-----S--	-----
82	17C2	V1-4		JL2	-----	-----A--S--	-----R---

Фиг. 18

Seq ID No.	ЛИНИЯ	CDR2	FR3	CDR3	FR4
61		LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC	MQALQTPFT	FGPGTKVDIK
62	30A4	---H---	-----E-----	--V-----	-----
63		AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC	QQSYSTPLT	FGGGTKVEIK
64	3C4	-----	-----S-----	-----I-----	-----
65		AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC	QQSYSTPIT	FGQGRLEIK
66	23B5	-----	-----N-----	-----S-----	-----
67	25G4	--A----	-----	-----A-----	-----
67		GNSNRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSLGGSV	FGGGTKLTVL
69	31H4	-----	-----	-----	-----
70	27B2	--TY---	-----	---N---V-	-----
71		EVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSSVV	FGGGTKLTVL
72	25A7	-----	---T-----	-----	-----
83	25A7v1	-----	---T-----	-----	-----
73	27H5	-----	---I-----F-	---T-M-	-----
84	27H5v1	-----	---I-----F-	---T-M-	-----
74	26H5	-----	---I-----F-	---T-M-	-----
75	31D1	-----	-----F-	---T-M-	-----A--
76	20D10	-----	-----F-	---T-M-	-----
77	27E7	-----	-----F-	---T-M-	-----
78	30B9	-----	-----F-	---T-M-	-----
79	19H9	-----	-I-----F-	---T-M-	-----
85	19H9v1	-----	-I-----F-	---T-M-	-----
80	26E10	-----	-----	N---T-M-	-----
81	21B12	-----	-----	N---T-M-	-----
82	17C2	-----	-----	---TNM-	-----

Фиг. 18 (продолж.)

Seq ID No.	ЛИНИЯ	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
86	<b>Зародышевая линия</b>				QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSSDVGGYNYVS	WYQQHPGKAPKLLIY
87	<b>23G1</b>	V1-4		JL3	-----	-----S--	-----
88	<b>Зародышевая линия</b>				QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLLIY
89	<b>13H1</b>	V1-7		JL3	L-----	-----N-----	----YS-----
90	<b>Зародышевая линия</b>				QSVLTQPPSASGTPGQRTISC	SGSSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIY
91	<b>9C9</b>	V1-16		JL3	-----	-----K--	----V-----
92	<b>9H6</b>	V1-16		JL3	-----P-----	-----	-----
93	<b>31A4</b>	V1-16		JL3	-----	-----	-----
94	<b>1A12</b>	V1-16		JL3	-----	-----K--	----F-----
95	<b>Зародышевая линия</b>				QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
96	<b>16F12</b>	V1-19		JL1	-----	-----F--	-----
97	<b>22E2</b>	V1-19		JL1	-----	-----F--	-----
98	<b>27A6</b>	V1-19		JL1	-----	-----F--	----F-----
99	<b>28B12</b>	V1-19		JL1	-----	-----F--	-----
100	<b>28D6</b>	V1-19		JL1	-----T-----	-----F--	-----
101	<b>31G11</b>	V1-19		JL1	-----	-----F--	-----
102	<b>Зародышевая линия</b>				QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
103	<b>13B5</b>	V1-19		JL2	-----	--N-----	-----
104	<b>Зародышевая линия</b>				SYELTQPPSVSVSPGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLVIY
105	<b>31B12</b>	V2-1		JL2	-----R-----	-----	-----
106	<b>Зародышевая линия</b>				QPVLTQPPSASASLGAVTLTC	TLSSGYSNYKVD	WYQQRPGKGRPFVMR
107	<b>3B6</b>	V5-2		JL2	-----LF-----	-----S-E--	-----

24/26

Фиг. 19

Seq ID No.	ЛИНИЯ	CDR2	FR3	CDR3	FR4
86		EVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSS V	FGGGTKLTVL
87	23G1	--T----	-----	N----T-M-	-----
88		EGSKRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSST	FGGGTKLTVL
89	13H1	-V-----	-----	-----LV	-----
90		SNNQRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC	AAWDDSLN V	FGGGTKLTVL
91	9C9	R-----L	-----	-----W-	-----
92	9H6	---R---	-----	-----W-	-----
93	31A4	-----	-----	-V-----GWV	-----
94	1A12	---R---	-----	-----W-	--A-----
95		DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC	GTWDSLSAYV	FGTGTKVTVL
96	16F12	-Y-----	-----	-----	----R----
97	22E2	-Y-----	-----	-----G--	----R----
98	27A6	-Y-----	-----	-----S--	----R----
99	28B12	-Y-----	-----	-----G--	----R----
100	28D6	-Y-----	-----	-----G--	----R----
101	31G11	-S-----	-----D-----	-----	-----
102		DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC	GTWDSLSAVV	FGGGTKLTVL
103	13B5	-----	-----N-----	-----	-----
104		QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTAVV	FGGGTKLTVL
105	31B12	-NT-W-L	-----K---V-----	-----V-	-----
106		VGTGGIVGSKGD	GIPDRFSVLGSLNRYLTIKNIQEEDES DYHC	GADHGSGSNFVVV	FGGGTKLTVL
107	3B6	-D-----E	-----	-----T-----	-----
108		VGTGGIV	GSKGDGIPDRFSVLGSLNRYLTIKNIQEEDE	SDYHCGADHGSGSNFVVV	FGGGTKLTVL
109	3B6v1	-D-----	-----E-----	-----T-----	-----

Фиг. 19 (продолж.)

**IgG2 человека:**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  
VPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP  
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:110)

**IgG4 человека:**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  
VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL  
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:111)

**Лямбда-цепь**

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY  
LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:112)

**Каппа-цепь**

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS  
LTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:113)

**Фиг. 20**