



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114604** (13) **C2**  
(51) МПК

**C07K 16/40** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 3/06** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2014 01793</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Дейвіс Джуліан (US),</b> <b>Аллан Барретт (US),</b> <b>Дарлінг Райан Джеймс (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>12.09.2012</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ,</b> Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.07.2017</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Шляховецький Ілля Олександрович,</b> <b>реєстр. №190</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/535,625</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2011/053759 A1, 05.05.2011 WO 2010/166768 A1, 01.07.2010 WO 2011/111007 A2, 15.09.2011 WO 2011/072263 A1, 16.06.2011 A PCSK9-binding antibody that structurally mimics the EGF (A) domain of LDL-receptor reduces LDL cholesterol in vivo / Yan G. Ni, Stefania Di Marco, Jon H. Condra et al. // Journal of lipid research. - 2011. - Vol. 52. - No. 1. - P. 78-86 A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates / Joyce C. Y. Chan, Dersek E. Piper, Qiong Cao et al. // Proceedings of the national academy of sciences. - 2009. - Vol. 106. - No. 24. - P. 9820-9825
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>16.09.2011</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>26.05.2014, Бюл.№ 10</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.07.2017, Бюл.№ 13</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2012/054737, 12.09.2012</b>	

**(54) АНТИТІЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ЛЮДСЬКОЮ ПРОПРОТЕЇНКОНВЕРТАЗОЮ СУБТИЛІЗИН/КЕСИНОВОГО ТИПУ 9 (PCSK9)**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яке зв'язується з людською пропротеїнконвертазою субтилізин/кесинового типу 9 (PCSK9). Винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка містить дане антитіло, та способу лікування гіперліпідемії або гіперхолестеринемії.

UA 114604 C2



Цей винахід належить до галузі медицини. Зокрема, цей винахід стосується антитіл до пропротеїнконвертази субтилізін/кексин тип 9 (PCSK9), композицій, які містять такі антитіла до PCSK9, і способів застосування антитіл до PCSK9 для лікування гіперліпідемії або гіперхолестеринемії.

Пропропротеїнконвертаза субтилізін/кексин тип 9 (PCSK9) являє собою секретовану серинпротеазу, що утворюється головним чином у печінці, яка регулює концентрацію в плазмі крові холестерину ліпопротеїдів низької густини (LDL-C). Секретована PCSK9 зв'язується і інтерналізується з рецептором LDL (LDLR), розташованим на поверхні гепатоцитів. Функція LDLR полягає у виведенні LDL-C з плазми шляхом зв'язування і транспортування частинок LDL до лізосом для розкладання. Після того, як частинка LDL доставлена для розкладання, LDLR поновно повертається на поверхню гепатоцитів для зв'язування і виведення додаткової кількості LDL-C з плазми. PCSK9 регулює рівень LDL-C у плазмі крові шляхом спрямування інтерналізованих LDLR на розкладання, а не на поновне повернення на клітинну поверхню, тим самим знижуючи виведення LDL-C. Результати досліджень на гризунах з дефіцитом або надекспресією PCSK9 вже підтвердили, що PCSK9 регулює циркуляційні рівні LDL шляхом модулювання рівнів LDLR. Результати наукових спостережень, за якими циркулююча PCSK9 бере участь у розкладанні печінкових LDLR, надають можливість припустити, що нейтралізація PCSK9 антитілами є ефективним терапевтичним підходом для зниження LDL-C. Повідомлялось про те, що статинові лікарські засоби, які є сучасним загальноновживаним лікуванням для зниження LDL-C, можуть фактично підвищити експресію та збільшити сироваткові рівні PCSK9. Тому антитіла до PCSK9 також мають потенціал для зниження LDL-C синергічно зі статиновою терапією.

Антитіла до PCSK9 та їх вплив на зниження рівня LDL-C у плазмі крові є відомими - в цій галузі. Наприклад, US2009/0246192, US2009/0142352, US2010/0166768 і WO2010/029513 розкривають такі антитіла до PCSK9 та їх використання. Тим не менш, на сьогоднішній день немає схвалених для терапевтичного використання антитіл, що цілеспрямовано впливають на PCSK9. Таким чином, залишається потреба в альтернативних антитілах до PCSK9. Зокрема, залишається потреба в альтернативних антитілах до PCSK9, які з високою активністю знижують рівень LDL-C. Ще конкретніше, залишається потреба в альтернативних антитілах до PCSK9, які з високою активністю знижують рівень LDL-C і які забезпечують пролонговану дію (наприклад, пролонговане пригнічення рівня LDL-C). Такі антитіла за варіантом, якому віддають перевагу, повинні мати хороші фізико-хімічні властивості, щоб полегшити розробку, виробництво або виготовлення композицій.

Цей винахід пропонує антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR) і варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), де HCVR містить гіперваріабельні ділянки (CDR) HCDR1, HCDR2 і HCDR3, а LCVR містить гіперваріабельні ділянки LCDR1, LCDR2 і LCDR3, де амінокислотна послідовність HCDR2 задана послідовністю SEQ ID NO: 1, амінокислотна послідовність HCDR3 задана послідовністю SEQ ID NO: 2, амінокислотна послідовність LCDR1 задана послідовністю SEQ ID NO: 4, амінокислотна послідовність LCDR2 задана послідовністю SEQ ID NO: 5, і амінокислотна послідовність LCDR3 задана послідовністю SEQ ID NO: 6, причому згадане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент зв'язується з людською PCSK9. В одному з варіантів здійснення цього винаходу запропоноване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR) і варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), де амінокислотна послідовність HCVR задана послідовністю SEQ ID No: 7 і амінокислотна послідовність LCVR задана послідовністю SEQ ID NO: 8, причому згадане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент зв'язується з людською PCSK9. В іншому варіанті здійснення цього винаходу запропоноване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить дві варіабельні ділянки важкого ланцюга (HCVR) і дві варіабельні ділянки легкого ланцюга, де амінокислотна послідовність кожної HCVR задана послідовністю SEQ ID NO: 7 і амінокислотна послідовність кожної LCVR задана послідовністю SEQ ID NO: 8.

У іншому конкретному варіанті здійснення цього винаходу запропоноване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить важкий ланцюг (HC) і легкий ланцюг (LC), де амінокислотна послідовність HC задана послідовністю SEQ ID NO: 9 і амінокислотна послідовність LC задана послідовністю SEQ ID NO: 10. У ще більш конкретному варіанті здійснення цього винаходу запропоноване антитіло, що містить два важкі ланцюги (HC) і два легкі ланцюги (LC), де амінокислотна послідовність кожного HC задана послідовністю SEQ ID NO: 9 і амінокислотна послідовність кожного LC задана послідовністю SEQ ID NO: 10. У найбільш конкретному варіанті здійснення цього винаходу запропоноване антитіло, що

складається з двох HC і два LC, де амінокислотна послідовність кожного HC задана послідовністю SEQ ID NO: 9 і амінокислотна послідовність кожного LC задана послідовністю SEQ ID NO: 10.

Цей винахід також пропонує фармацевтичні композиції, які містять антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за цим винаходом, і один(-ну) або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або допоміжних речовин. Зокрема, фармацевтичні композиції за цим винаходом також містять один або декілька додаткових терапевтичних агентів.

Крім того, цей винахід пропонує спосіб лікування гіперліпідемії або гіперхолестеринемії, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості антитіла або антигензв'язувального фрагменту за цим винаходом. Цей винахід також пропонує антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за цим винаходом для застосування в терапії. Більш конкретно, цей винахід пропонує антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за цим винаходом для застосування в лікуванні гіперліпідемії або гіперхолестеринемії. Крім того, цей винахід пропонує застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагменту за цим винаходом у виготовленні лікарського засобу для лікування гіперліпідемії або гіперхолестеринемії.

Цей винахід також стосується молекул нуклеїнових кислот і векторів експресії, що кодують антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за цим винаходом. Далі, цей винахід пропонує антитіло, одержане за певним способом, де згаданий спосіб включає (a) культивування клітини-хазяїна, що містить першу полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептидну послідовність, задану послідовністю SEQ ID NO: 9, і другу полінуклеотидну послідовність, що кодує другу поліпептидну послідовність, задану послідовністю SEQ ID NO: 10, в таких умовах, в яких згадані поліпептидні послідовності експресуються; і (b) виділення зі згаданої клітини-хазяїна антитіла, яке містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де поліпептидна послідовність згаданого важкого ланцюга задана послідовністю SEQ ID NO: 9 і поліпептидна послідовність згаданого легкого ланцюга задана послідовністю SEQ ID NO: 10. Більш конкретно, антитіло, що продукується вищезгаданим способом, включає два важкі ланцюги і два легкі ланцюги, де поліпептидна послідовність кожного важкого ланцюга задана послідовністю SEQ ID NO: 9 і поліпептидна послідовність кожного легкого ланцюга задана послідовністю SEQ ID NO: 10.

Непроцесоване антитіло являє собою молекулу імуноглобуліну, яка містить 2 важких (H) ланцюги і 2 легких (L) ланцюги, сполучені між собою дисульфідними зв'язками. Аміно-кінцева ділянка кожного ланцюга містить варіабельну ділянку довжиною приблизно 100-110 амінокислот, яка відповідає, головним чином, за розпізнавання антигену за допомогою гіперваріабельних ділянок (CDR), які входять до її складу. Карбокси-кінцева ділянка кожного ланцюга визначає константну ділянку, яка відповідає, головним чином, за ефекторну функцію. Як відомо у цій галузі, легкі ланцюги класифікуються як каппа або лямбда, кожен з яких відрізняється конкретною константною ділянкою. Важкі ланцюги класифікуються як гамма, мю, альфа, дельта або епсилон і визначають ізотип антитіла як IgG, IgM, IgA, IgD або IgE, відповідно. IgG антитіла можуть бути додатково поділені на підкласи, наприклад, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>. Важкий ланцюг кожного типу також відрізняється конкретною константною ділянкою з послідовністю, добре відомою у цій галузі. Термін "антигензв'язувальний фрагмент" у значенні, вживаному у цьому описі, означає Fab-фрагменти, Fab'-фрагменти, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти і однокланові Fv-фрагменти, які зв'язуються з людською PCSK9. Термін "зв'язуються (або "зв'язується") з людською PCSK9" у значенні, вживаному у цьому описі, означає взаємодію з антигенною детермінантою на людській PCSK9, що задана амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 14. Термін "антигенна детермінанта" у значенні, вживаному у цьому описі, означає дискретні тривимірні сайти на антигені, які розпізнаються антитілами або їх антигензв'язувальними фрагментами за цим винаходом.

CDR перемежуються більш консервативними ділянками, які називаються каркасними ділянками ("FR"). Кожна варіабельна ділянка легкого ланцюга (LCVR) і варіабельна ділянка важкого ланцюга (HCVR) складається з 3 CDR та 4 FR, які розміщуються у напрямку від аміно-кінця до карбоксильного кінця таким чином: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вказані 3 CDR легкого ланцюга позначають як "LCDR1, LCDR2 і LCDR3", а 3 CDR важкого ланцюга позначають як "HCDR1, HCDR2 і HCDR3". Вказані CDR містять більшість залишків, які вступають у специфічні взаємодії з антигеном. Номенклатура і місцезнаходження амінокислотних залишків CDR у межах LCVR і HCVR антитіл або антигензв'язувальних фрагментів за цим винаходом можуть бути визначені у відповідності з добре відомою схемою нумерації, яка розроблена Кабатом (Kabat) (LCDR 1-3, HCDR2-3), або відповідно до схеми нумерації, яка розроблена Кабатом (Kabat) та Чотья (Chothia) (HCDR1).

Методи продукування та очищення антитіл і антигензв'язувальних фрагментів є добре відомими у цій галузі, і їх можна знайти, наприклад, у Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, розділи 5-8 та 15. Наприклад, миші можуть бути імунізовані людською PCSK9 або її фрагментами, і одержані антитіла після цього можуть бути виділені та очищені, і амінокислотні послідовності можуть бути визначені із застосуванням звичайних способів, добре відомих в цій галузі. Антигензв'язувальні фрагменти також можуть бути одержані звичайними способами. Антитіло або антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом конструюють так, щоб вони містили одну або декілька людських каркасних ділянок довкола CDR, одержаних з нелюдського антитіла. Людські каркасні зародкові послідовності можна одержати від ImMunoGeneTics (IMGT) через веб-сайт <http://imgt.cines.fr> або з'ясувати з *The Immunoglobulin Facts Book* by Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Зокрема, зародкові каркасні ділянки легкого ланцюга для використання у антитілі або антигензв'язувальних фрагментах за цим винаходом включають A3 та O2. Конкретні зародкові каркасні ділянки важкого ланцюга для використання у антитілі або антигензв'язувальних фрагментах за цим винаходом включають VH3-21 та VH3-23.

Генно-інженерні антитіла або антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом можуть бути одержані і очищені з використанням відомих методів. Наприклад, послідовності кДНК, що кодують важкий ланцюг (наприклад, амінокислотна послідовність, задана послідовністю SEQ ID NO: 9) і легкий ланцюг (наприклад, амінокислотна послідовність, задана послідовністю SEQ ID NO: 10), можуть бути клоновані та введені в GS (глутамінсинтетаза) вектор експресії. Згаданим сконструйованим імуноглобуліновим вектором експресії у подальшому можуть бути стабільно трансфіковані клітини CHO. Як буде зрозуміло фахівцю у цій галузі, експресія антитіл ссавцями призведе до глікозилювання, як правило, на висококонсервативних сайтах N-глікозилювання на Fc-ділянці. Стабільні клони можуть бути перевірені на експресію антитіла, що специфічно зв'язується з людською PCSK9. Позитивні клони можуть бути розмножені в біореакторах в безсироватковому культуральному середовищі для продукування антитіл. Живильні середовища, до яких було секретоване антитіло, можуть бути очищені звичайними методами. Наприклад, середовище можна зручно завантажити до колонки з афінним сорбентом Protein A або G Sepharose FF, врівноваженої сумісним буфером, наприклад, забуференим фосфатом фізіологічним розчином. Згадану колонку промивають для видалення компонентів неспецифічного зв'язування. Зв'язане антитіло елюють, наприклад, градієнтом pH і фракції антитіла виявляють, наприклад, за допомогою SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію), після чого змішують. Антитіло може бути сконцентровано та/або відфільтроване у стерильних умовах за допомогою традиційних методів. Розчинні агрегати і мультимери можуть бути ефективно видалені за допомогою традиційних методів, у тому числі із застосуванням гель-хроматографії за розміром молекул, гідрофобного хроматографування, іонообмінного хроматографування або хроматографування на гідроксиапатитовій адсорбційній колонці. Цей продукт може бути негайно замороженим, наприклад, при температурі -70 °C або може бути підданий ліофілізації.

Антитіла за цим винаходом є моноклональними антитілами. Термін "моноклональне антитіло" або "Mab" у значенні, вживаному у цьому описі, означає антитіло, яке походить з однієї копії або клону, у тому числі, наприклад, будь-якого еукаріотного, прокаріотного або фагового клону, а не спосіб, за допомогою якого воно продукується. Моноклональні антитіла та їх антигензв'язувальні фрагменти можна одержати, наприклад, за допомогою гібридомної технології, технології рекомбінантних ДНК, методу фагового дисплею, синтетичних методів, наприклад, пересадження CDR, або комбінацій таких методів чи інших методів, відомих у цій галузі.

У іншому варіанті здійснення цього винаходу антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент чи нуклеїнова кислота, що його кодує, надається в ізольованій формі. У значенні, вживаному у цьому описі, термін "ізольований" означає білок, пептид або нуклеїнову кислоту, які не містять або практично не містять інших видів макромолекул, присутніх у клітинному середовищі. Термін "практично не містить" у значенні, вживаному у цьому описі, означає білок, пептид або нуклеїнову кислоту, що становить інтерес, який(яка) містить понад 80 % (моль) макромолекул згаданих видів, за варіантом, якому віддають перевагу, понад 90 % (моль), і за варіантом, якому віддають більшу перевагу, понад 95 % (моль).

Антитіла або антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом можуть бути використані в лікуванні пацієнтів. Термін "лікування" (або "лікувати") означає уповільнення, переривання, зупинення, полегшення, припинення, зменшення або звертання розвитку або тяжкості існуючого симптому, розладу, стану або захворювання. Термін "пацієнт" у значенні, вживаному у цьому

описі, означає людину або ссавця, який не є людиною, але переважно означає людину. У значенні, вживаному у цьому описі, термін "ефективна кількість" означає кількість або дозу антитіла або антигензв'язувального фрагменту за цим винаходом, яка у випадку одно- чи багаторазового введення пацієнту справляє бажаний вплив на пацієнта, який зазнає лікування.

Ефективна кількість може бути легко визначена лікарем, який лікує хворого та є фахівцем в цій галузі, з урахуванням ряду факторів, таких як вид ссавця, його розмір, вік і загальний стан здоров'я, конкретне захворювання, ступінь або тяжкість захворювання; реакцію конкретного пацієнта; конкретне введення антитіла; спосіб введення; характеристики біодоступності введеного препарату; схему введення дози та застосування будь-яких супутніх лікарських засобів.

Антитіла або антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом, або фармацевтичні композиції, що їх містять, можуть бути введені парентеральними шляхами (наприклад, підшкірним, внутрішньовенним, внутрішньочеревинним, внутрішньом'язовим або черезшкірним). Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть бути одержані способами, добре відомими в цій галузі (наприклад, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.), і містять антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, як розкрито у цьому описі, і один(-у) або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або допоміжних речовин. Наприклад, антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за цим винаходом може бути введений до складу композиції з такими агентами як цитрат натрію, лимонна кислота, полісорбат 80 та сахароза, і одержана композиція у подальшому може бути ліофілізована, і зберігатись при температурі від 2 °C до 8 °C. Вказана ліофілізована композиція у подальшому перед введенням може відновлюватись за допомогою стерильної води для ін'єкцій.

Наведені нижче Приклади додатково ілюструють винахід, однак слід розуміти, що ці Приклади наведені для ілюстрації, а не для обмеження, і що фахівцем у цій галузі можуть бути здійснені різні модифікації.

#### Приклад 1 Генно-інженерне антитіло до PCSK9

Мишу-хазяїна імунізують пептидом, який містить скорочений у С-кінцевому напрямку фрагмент людської PCSK9 (послідовність SEQ ID NO: 17), і PC8K9-зв'язувальне IgG антитіло ізолюють, і клонують з використанням звичайних методів. Гіперваріабельні ділянки ізолизованого мишачого Fab рандомізують шляхом мутагенезу, і одержані антитіла піддають скринінгу на спорідненість до людської PCSK9. Мутації, які підвищують спорідненість, комбінують, і оптимізовані гіперваріабельні ділянки генно-інженерними методами вводять до складу людських каркасних ділянок важкого і легкого ланцюгів VH3-21 і A3, відповідно. Для додаткової оптимізації біофізичних властивостей гуманізованого антитіла, у межах послідовностей гіперваріабельних ділянок здійснюють цілеспрямовані заміни ароматичних і гідрофобних амінокислот. Бібліотеки рандомізованих гіперваріабельних ділянок також піддають скринінгу на додаткові мутації, які підвищують спорідненість. Корисні мутації гіперваріабельних ділянок довільно комбінують і експресують, і одержані антитіла піддають скринінгу на спорідненість до людської PCSK9. Одержують непроцесоване гуманізоване і оптимізоване антитіло до PCSK9, яке має такі амінокислотні послідовності:

Фрагмент mAb	Амінокислотна послідовність
HCDR1	SEQ ID NO: 1
HCDR2	SEQ ID NO: 2
HCDR3	SEQ ID NO: 3
HCVR	SEQ ID NO: 7
не	SEQ ID NO: 9
LCDR1	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SEQ ID NO: 5
LCDR3	SEQ ID NO: 6
LCVR	SEQ ID NO: 8
LC	SEQ ID NO: 10

Відповідні послідовності кДНК, які кодують амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 10 важкого і легкого ланцюгів, відповідно, виглядають так:

Фрагмент mAb	Послідовність кДНК, що кодує
HC	SEQIDNO:11
LC	SEQ ID NO: 12

#### Приклад 2 Експресія генно-інженерного антитіла до PCSK9

Згадане генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 може бути експресованим у стабільно трансфікованій лінії клітин CHO. Для трансфікування шляхом електропорації лінії клітин яєчника китайського хом'ячка, CHOK1SV (компанія Lonza Biologies PLC, Slough, Великобританія), використовують глутамінсинтезний (GS) вектор експресії, який містить кДНК з послідовностями SEQ ID NO: 11 (що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9 важкого ланцюга) і SEQ ID NO: 12 (що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10 легкого ланцюга). Вектор експресії кодує ранній промотор SV (мавпячий вірус 40E) і ген GS. Експресія GS забезпечує біохімічний синтез глютаміну (амінокислоти, яка є необхідною для клітин лінії CHOK1SV). Після завершення трансфекції, клітини піддають змішаній селекції з 50 мкМ L-метіонінсульфоксими́ну (MSX). Інгібування GS MSX застосовують для підвищення переконливості селекції. Клітини з інтегрованою кДНК вектора експресії в транскрипційно активні ділянки геному клітини-хазяїна можуть відбиратись проти клітин лінії CHOK1SV дикого типу, які експресують ендogenous рівень GS. Змішану культуру піддають одноклітинному клонуванню із застосуванням технології FACS (клітинний сортер зі збудженням флуоресценції); клональні лінії клітин розмножують, і піддають скринінгу на експресію генно-інженерного антитіла до PCSK9 Прикладу 1.

#### Приклад 3

##### Зв'язування антигенної детермінанти

PCSK9-зв'язувальну антигенну детермінанту мишачого IgG (з якого одержали генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1) визначають шляхом екстрагування антигенної детермінанти і мас-спектрометрії на основі воднево-дейтерієвого обміну, та звужують до ділянки в межах лінійної амінокислотної послідовності 160-181 каталітичного домену людської PCSK9 (нумерація амінокислот ґрунтується на непроцесованій послідовності людської PCSK9 з включенням сигнального пептиду довжиною у двадцять вісім амінокислот). Взаємодія генно-інженерного антитіла Прикладу 1 з цією антигенною детермінантою в каталітичному домені людської PCSK9 підтверджується оцінкою його зв'язування з синтетичними пептидами, які відповідають залишкам 160-181 (Таблиця 1). Вказане генно-інженерне антитіло Прикладу 1 зв'язує пептид 160-181 з більшою спорідненістю, ніж інтактну людську PCSK9, причому згадану різницю стимулює більш висока швидкість асоціації ( $k_{on}$ ). Швидкість дисоціації ( $k_{off}$ ) знаходиться в межах 2-кратній швидкості дисоціації інтактної PCSK9, що дозволяє висунути припущення про те, що сили взаємодії (після завершення зв'язування) є подібними. Крім того, ці дані дозволяють припустити, що майже всі зв'язувальні детермінанти вміщені у межах цієї лінійної ділянки PCSK9. Зв'язування генно-інженерного антитіла Прикладу 1 з пептидом 166-181 є значно слабшим, ніж з пептидом 160-181, що демонструє роль амінокислоти (або декількох амінокислот) в межах ділянки 160-165. Зв'язування генно-інженерного антитіла Прикладу 1 з пептидом 163-174 було значно сильнішим, аніж з 166-181, що також дозволяє припустити внесок від залишків 163-165.

Таблиця 1:

Кінетика зв'язування та спорідненість антитіла Прикладу 1 до пептидів, що відповідають послідовностям каталітичного домену людської PCSK9

Фрагмент PCSK9	Послідовність	$k_{on}$ (1/Mc)	$K_{off}$ (1/c)	$K_D$ (nM)
С-кінцевий His зрілої hPCSK9*	(SEQ ID NO: 13)	8,67E+04	1,50E-04	1,8
hPCSK9 160-181**	RITPPRYRADEYQPPDGGSLVE (SEQ ID NO: 14)	1,45E+06	2,42E-04	0,17
hPCSK9 166-181**	YRADEYQPPDGGSLVE (SEQ ID NO: 15)	4,58E+06	1,56E-01	34
hPCSK9 163-174**	PPRYRADEYQPP (SEQ ID NO: 16)	2,75E+06	8,31E-03	3,0

\* Використана hPCSK9 являє собою зрілу форму, яка не містить сигнального пептиду з двадцяти восьми амінокислот, і яка містить С-кінцеву His-мітку.

\*\* Нумерація амінокислот відповідає повній людській PCSK9 з сигнальним пептидом довжиною у двадцять вісім амінокислот.

#### Приклад 4

Кінетика зв'язування і спорідненість

- 5 Для оцінки кінетики зв'язування і спорідненості досліджуваного антитіла до PCSK9 Прикладу 1, до PCSK9 людей, макак-крабоїдів, мишей, пацюків і кролів застосовують відомий в цій галузі поверхневий плазмонний резонанс (SPR). В умовах фізіологічної буферної системи (іонна сила і рН) і температури (37 °C), генно-інженерне антитіло Прикладу 1 зв'язується з людською PCSK9 з середньою швидкістю асоціації ( $k_{on}$ )  $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  і середньою швидкістю дисоціації ( $k_{off}$ )  $1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Було визначене значення  $K_D$  зв'язування людської PCSK9 для генно-інженерного антитіла Прикладу 1, яке становить приблизно 11 нМ. Генно-інженерне антитіло Прикладу 1 зв'язується з PCSK9 макак-крабоїдів з середньою швидкістю асоціації ( $k_{on}$ )  $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  середньою швидкістю дисоціації ( $k_{off}$ )  $2,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , наслідком чого є значення  $K_D$  зв'язування PCSK9 макак-крабоїдів на рівні приблизно 25 нМ. У наведеній нижче Таблиці 2 представлені
- 10 узагальнені додаткові результати, одержані з генно-інженерним антитілом до PCSK9 Прикладу 1 із застосуванням PCSK9 мишей, пацюків і кролів. Ці дані показують, що генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 при фізіологічних значеннях рН, іонної сили і температури зв'язується з PCSK9 як людей, так і макак-крабоїдів з наномольною спорідненістю.
- 15

Таблиця 2:

Кінетика зв'язування і спорідненість антитіла до PCSK9 Прикладу 1 до PCSK9 людини, макак-крабоїдів, мишей, пацюків і кролів

Антиген	$K_{on}$ Середнє $\pm$ середнє квадратичне відхилення $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ( $10^5$ )	$K_{off}$ Середнє $\pm$ середнє квадратичне відхилення $\text{s}^{-1}$ ( $10^{-3}$ )	$K_D$ Середнє $\pm$ середнє квадратичне відхилення нМ	n
Людська PCSK9*	1,2 $\pm$ 0,46	1,2 $\pm$ 0,18	11 $\pm$ 2,9	6
PCSK9 макак-крабоїдів*	1,1 $\pm$ 0,51	2,5 $\pm$ 0,79	25 $\pm$ 6,8	4
PCSK9 мишей**	NB	NB	NB	3
PCSK9 пацюків**	NB	NB	NB	2
PCSK9 кролів **	NB	NB	NB	3

"NB" Зв'язування не виявлено;

\* Аналіз проводили при температурі 37°C;

\*\* Аналіз проводили при температурі 25°C



## Приклад 5

## Інгібування зв'язування PCSK9 з рецептором LDL

PCSK9 регулює плазмовий рівень LDL-C шляхом зниження вмісту LDLR печінки і тим самим зменшення поглинання LDL гепатоцитами. Каталітичний домен PCSK9 являє собою сайт, який зв'язується з LDLR. Таким чином, очікується, що антитіла, які розпізнають каталітичний домен PCSK9, будуть інгібувати зв'язування PCSK9 з LDLR.

Для визначення впливу досліджуваного антитіла до PCSK9 на зв'язування PCSK9 з рецептором LDL застосовували дослідження за методикою AlphaLISA®. Рекombінантна непроцесована PCSK9, що використовується при проведенні дослідження, експресується в стабільній клітинній лінії HEK (лінія клітин нирки людського зародку) 293 у вигляді С-кінцевого His-міченого білка (Qian et al., J. Lipid Res. 48: 1488-1498, 2007). Екстрацелюлярний домен рекombінантного рецептора LDL експресується в тимчасово трансфікованих клітинах лінії HEK 293E клітин як С-кінцевий FLAG-мічений білок (Qian et al., J. Lipid Res. 48: 1488-1498, 2007). Мишаче анти-PCSK9 Mab, яке зв'язується з С-кінцевим доменом людської PCSK9, експресується в клітинах лінії HEK293, і очищається на колонці з афінним сорбентом Protein-G, з подальшою обробкою на колонці Superdex 200. Моноклональне анти-FLAG® BioM2 антитіло (компанія Sigma) являє собою очищене мишаче IgG1 моноклональне антитіло, ковалентно зв'язане з біотином гідрозидним зв'язком. Анти-FLAG® BioM2 буде розпізнавати послідовність FLAG на N-кінці, Met-N-кінці або С-кінці FLAG гібридних білків. Анти-FLAG® BioM2 може бути виявлений за допомогою авідинових або стрептавідинових кон'югатів. Моноклональне анти-FLAG® BioM2-біотин антитіло постачається в розчині, до складу якого входить 50 % гліцерину, 10 mM фосфату натрію, pH 7,25, 150 mM NaCl, та який містить 0,02 % азиду натрію, і зберігається при температурі -20 °C.

Експерименти за методикою AlphaLISA® проводять в 384-лункових білих планшетах ProxiPlate (компанія Perkin Elmer) з використанням як буфера 25 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 % TX-100, 0,1 % казеїну, 1 мг/мл декстрану-500 і 0,05 % Proclin-300. При проведенні досліджень використовують донорні гранули AlphaLISA® Streptavidin (компанія Perkin Elmer) і акцепторні гранули мишачого анти-PCSK9 Mab, кон'югованого з AlphaLISA®. Коли гранули опиняються у безпосередній близькості завдяки взаємодії партнерів зв'язування, PCSK9 і LDLR, синглетний кисень передається від донорних гранул на акцепторні гранули. У разі лазерного збудження при 680 нм, синглетний кисень збуджує випромінювання світла акцепторною гранулою. Акцепторні гранули зв'язуються з мишачим анти-PCSK9 Mab шляхом відновного амінування з використанням NaBH<sub>3</sub>CN (компанія Sigma), і зберігаються при температурі 4 °C. Акцепторні гранули, кон'юговані з мишачим анти-PCSK9 Mab (22 мкг/мл), попередньо навантажуються 2,22 нМ розчином PCSK9 протягом однієї години. Донорні гранули (44 мкг/мл) попередньо навантажуються 5,55 нМ розчином анти-FLAG® BioM2 і 2,22 нМ розчином FLAG-міченого LDLR протягом однієї години. Після завершення попереднього навантаження, 2 мкл досліджуваного антитіла до PCSK9 або контрольного IgG додають до планшету ProxiPlate, що містить 9 мкл суміші кожних гранул (кінцева концентрація PCSK9 і LDLR=1 нМ) за допомогою повністю автоматизованої піпетки Multimek (компанія Beckman), і залишають для зв'язування впродовж ночі при кімнатній температурі. Сигнал AlphaLISA® (кількість імпульсів на секунду) вимірюють за допомогою Envision Turbo (компанія Perkin Elmer). Всі експерименти з проведенням дослідження AlphaLISA® здійснюють за умов низької освітленості.

Після проведення процедур по суті як описано вище зв'язування людської PCSK9 з LDLR при дослідженні AlphaLISA® зростає у залежності від концентрації PCSK9. Додавання генно-інженерного антитіла до PCSK9 Прикладу 1 (досліджуване антитіло до PCSK9) спричинює пов'язане з концентрацією і повне інгібування зв'язування PCSK9 з LDLR, з середнім значенням IC<sub>50</sub> на рівні приблизно 90 пМ. Контрольний IgG4 у цьому дослідженні не демонструє ефективності. Результати цього дослідження показують, що генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 інгібує зв'язування людської PCSK9 з LDLR.

## Приклад 6

## Інгібування функціонування PCSK9 на клітинах HepG2

Для визначення впливу досліджуваного антитіла до PCSK9 на густину LDLR на гепатоцитах, людські клітини HepG2 культивують в колбах T75, покритих полі-D-лізином. Через 24 год. клітини висівають з розрахунку 5000 клітин/лунку в 100 мкл середовища DMEM/F-12 (3:1), яке містить 5 % (у об'ємному відношенні) людської ліпопротеїн-дефіцитної сироватки (LPDS; компанія Intracel), на 96-лункові чорні планшети (компанія Becton-Dickinson), сенсibilізовані полі-D-лізином. Після інкубації протягом ночі в середовищі, яке містить LPDS, клітини впродовж

2 год. інкубують з 69 нМ (5 мкг/мл) His-міченої на С-кінці рекомбінантної людської PCSK9 і досліджуваним антитілом до PCSK9 або контрольним IgG4 антитілом при концентраціях у межах від 2,6 нМ до 1333 нМ. Всі інкубації проводять при температурі 37 °С. Рівні LDLR контролюють за допомогою антитіла до LDLR (компанія Progen), флуоресцентно міченого за допомогою набору для мічення Zenon® Alexa Fluor® 488 Mouse IgG2b Labeling Kit (компанія Invitrogen). Клітини інкубують з ідентифікуючим антитілом протягом 90 хв при кімнатній температурі, після чого фіксують протягом 10 хв за допомогою фіксатора без формаліна (Prefer; компанія ANATECH, Ltd) з подальшим підвищенням коефіцієнту проникності в 0,01 % розчині Triton X-100. Клітини забарвлюють йодидом пропідію (10 мкг/мл) (компанія Invitrogen) для визначення загальної кількості клітин. Кількісне визначення сигналу LDLR здійснюють за допомогою лазерного сканувального мікропланшетного цитометру - детектору флуоресценції Acumen Explorer™ (компанія TTP LabTech).

Після проведення процедур по суті як описано вище людська PCSK9 викликає залежне від концентрації зменшення рівня LDLR на клітинах HepG2 зі значенням  $EC_{50}$ , яке становить 18 нМ. Генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 (досліджуване антитіло до PCSK9) інгібує PCSK9-індуковане пригнічення LDLR на клітинах HepG2 з  $IC_{50}$ , яке становить 104 нМ. Людський контрольний IgG4 був відносно неактивним при концентраціях до 1333 нМ. Ці дані показують, що генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 інгібує PCSK9-опосередкований розкладання LDLR.

#### Приклад 7

Інгібування PCSK9-індукованого зниження поглинання LDL

Для визначення впливу досліджуваного антитіла до PCSK9 на поглинання LDL, клітини HepG2 висівають з розрахунку 5000 клітин/лунку в 100 мкл середовища DMEM/F-12 (3:1), доповненого 5 % LPDS, на 96-лункові чорні планшети, сенсibiliзовані полі-D-лізином, і інкубують при температурі 37 °С в атмосфері 5 %  $CO_2$  протягом 18 год. Людську PCSK9 (69 нМ) додають до клітин з досліджуваним антитілом до PCSK9 або без досліджуваного антитіла до PCSK9, або до клітин з людським контрольним IgG4 при концентраціях у межах від 2,6 нМ до 1333 нМ, і піддають попередній інкубації з клітинами протягом 2 год. при температурі 37 °С. Після додавання 100 нг/лунку флуоресцентно міченого LDL (BODIPY-LDL, компанія Invitrogen), клітини інкубують протягом 4 год. при температурі 37 °С. Клітини при кімнатній температурі протягом 10 хв фіксують за допомогою фіксатора без формаліна (Prefer; компанія ANATECH, Ltd). Після подвійного промивання клітин за допомогою PBS, коефіцієнт проникності клітин підвищують за допомогою забуференого фосфатом фізіологічного розчину, що містить 0,01 % Triton X-100, протягом 15 хв при кімнатній температурі, і забарвлюють йодидом пропідію (10 мкг/мл) для визначення загальної кількості клітин. Поглинання LDL визначають за допомогою лазерного сканувального флуоресцентного мікропланшетного цитометру Acumen Explorer™, і виражають у вигляді відсотку флуоресцентних клітин відносно загальної кількості клітин. Реакцію на досліджуване антитіло до PCSK9 або контрольний IgG виражають, як відсоткове інгібування PCSK9, тобто відсоток повернення до максимального поглинання LDL при відсутності PCSK9 по відношенню до вихідного поглинання LDL-C у присутності лише PCSK9. Також обчислюють відповідні значення  $IC_{50}$  для інгібування PCSK9-індукованого зниження поглинання LDL.

Після проведення процедур по суті як описано вище людська PCSK9 викликає залежне від концентрації зменшення поглинання LDL на клітинах HepG2 зі значенням  $EC_{50}$ , що дорівнює 32 нМ. Генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 звертає PCSK9-індуковане інгібування, що відображається як підвищене поглинання LDL, у той час як контрольний IgG4 не звертає інгібування. Зокрема, генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 демонструє середнє максимальне відсоткове інгібування PCSK9, яке становить 84 % і середнє значення  $IC_{50}$ , яке становить 194 нМ. Ці дані показують, що генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 інгібує PCSK9-індуковане зниження поглинання LDL.

#### Приклад 8

Ефективність *in vivo*

Для визначення *in vivo* фармакокінетичної (PK) та/або фармакодинамічної (PD) дії досліджуваного антитіла до PCSK9, це досліджуване антитіло може бути введено звичайним макам-краб'ядам з подальшим визначенням певних PK та/або PD параметрів. Наприклад, досліджуване антитіло до PCSK9 може бути введено внутрішньовенним або підшкірним шляхом здоровим, "наївним" макам-краб'ядам, і сироваткові концентрації вказаного досліджуваного антитіла можуть у подальшому бути виміряні за допомогою дослідження сендвіч-ELISA з людським IgG. Сироваткові концентрації, виміряні в різних часових точках після введення антитіла, можуть використовуватись для визначення різних PK параметрів вказаного

досліджуваного антитіла, в тому числі  $T_{1/2}$ ,  $C_{max}$ , AUC і плазмового кліренсу (CL). Так само, досліджуване антитіло до PCSK9 може бути введено внутрішньовенним або підшкірним шляхом здоровим, "наївним" макакам-крабоїдам, і сироваткові концентрації LDL-C можуть бути виміряні за допомогою аутоаналізатору (Direct LDL-C Plus, 2<sup>nd</sup> Gen., компанія Roche Diagnostics).

Після проведення процедур по суті як описано вище фармакокінетичні параметри генно-інженерного антитіла до PCSK9 Прикладу 1 оцінюють на здорових макаках-крабоїдах після внутрішньовенного введення однієї дози 1 мг/кг, 5 мг/кг або 15 мг/кг і після однієї підшкірної дози 5 мг/кг. Фармакокінетичні параметри, виміряні при проведенні цих досліджень, представлені у наведеній нижче Таблиці 3.

Таблиця 3

Фармакокінетичні параметри  
генно-інженерного антитіла до PCSK9 Прикладу 1 у макак-крабоїдів.

Внутрішньовенно n = 4/групу)						
Доза (мг/кг)	$T_{1/2}$ (дні)	$C_{max}$ (мкг/мл)	$AUC_{total}$ (год·мкг/мл)	CL (мл/год./кг)		
1	5,4±1,0	19,8±1,1	2218±222	0,45±0,04		
5	7,3±1,3	107,3±3,2	14378±1374	0,35±0,04		
15	8,4±3,0	260,3±45,0	57290±16535	0,28±0,07		

  

Підшкірно (n = 3/групу)						
Доза (мг/кг)	$T_{max}$ (дні)	$C_{max}$ (мкг/мл)	$T_{1/2}$ (дні)	$AUC_{total}$ (год·мкг/мл)	CL/F (мл/год./кг)	%F
5	2,7±0,6	32,4±1,9	5,4±0,7	11575±1345	0,44±0,05	81

Сироватковий рівень LDL визначають після введення генно-інженерного антитіла до PCSK9 Прикладу 1 у двох незалежних дослідженнях. В обох дослідженнях, ознаки пригнічення рівня LDL-C було очевидними через 24 год. після введення генно-інженерного антитіла до PCSK9 Прикладу 1. Після внутрішньовенного (i.v.) введення антитіла Прикладу 1 у дозі 5 мг/кг, спостерігалось максимальне середнє зниження рівня LDL-C на 60 % (дослідження 1) і 25 % (дослідження 2). При внутрішньовенному введенні дози 5 мг/кг, середнє пригнічення рівня LDL-C зберігалось протягом приблизно 8 тижнів (дослідження 1) і 2 тижнів (дослідження 2). При проведенні дослідження 2, спостерігався незначний вплив дози (від 1 мг/кг до 15 мг/кг) на величину пригнічення LDL-C (від 25 % до 35 %). Вплив дози на тривалість пригнічення LDL-C був більш очевидним. При введенні підшкірним шляхом (5 мг/кг), ефективність генно-інженерного антитіла Прикладу 1 щодо пригнічення рівнів LDL-C була подібною до ефективності, яка спостерігається після внутрішньовенного введення. Після введення генно-інженерного антитіла Прикладу 1 у будь-якій дозі, будь-якого впливу на сироваткові рівні холестерину ліпопротеїнів високої густини не спостерігалось.

#### Приклад 9

Фізико-хімічні властивості генно-інженерного антитіла до PCSK9

Було також встановлено, що генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 має хорошу розчинність, хімічну стабільність і фізичну стабільність.

#### А. Розчинність

Для забезпечення можливості зручного введення дози бажаною є достатньо висока розчинність. Наприклад, 1 мг/кг доза на 1,0 мл ін'єкцію пацієнту масою 100 кг буде потребувати розчинності на рівні 100 мг/мл. Бажаним також є зберігання антитіла в мономерному стані без агрегування високомолекулярних сполук (HMW) при високій концентрації. Для визначення розчинності досліджуваного антитіла, антитіло може бути діалізовано в (1) в розчині 10 мМ цитрату, рН 6, (2) розчині 10 мМ цитрату, рН 6, 150 мМ NaCl, і (3) забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS), рН 7,4. Відновлений діалізат у подальшому може бути проаналізований за допомогою аналітичної гель-хроматографії за розміром молекул (SEC) для визначення відсотка HMW. У подальшому досліджуване антитіло може бути сконцентроване в 4 мл центробіжному концентраторі при температурі ~ 25 °C до досягнення межі розчинності або порового об'єму концентратора. У раз досягнення порового об'єму, дані про концентрацію надають як значення, яке є більшим або дорівнює вказаному. Концентроване антитіло після цього може бути проаналізоване засобами SEC для визначення відсотка HMW. Для визначення

того, чи є будь-яке збільшення % HMW після концентрації оборотним, концентрований зразок може бути розбавлений до 1 мг/мл і проаналізований методом SEC.

- Після проведення процесів по суті як описано вище генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 при всіх умовах досліджування демонструвало розчинність, що перевищує 128 мг/мл. Крім того, при високій концентрації були присутні лише низькі рівні HMW.

Таблиця 4:

Відсоток HMW в розчинних зразках, визначений за допомогою SEC

	%HMW (діалізат)	%HMW (концентрат)	% HMW (розведення 1 мг/мл)
10 mM цитратний буфер, pH 6	0,75 %	1,60 %	0,93 %
10 mM цитратний буфер, 150 mM NaCl, pH6	0,62 %	1,39 %	0,90 %
PBS, pH 7,4	0,94 %	2,00 %	1,34 %

#### В. Хімічна стабільність

- Хімічна стабільність сприяє розробці лікарських композицій з достатнім строком придатності. Для оцінки хімічної стабільності досліджуваного антитіла, вказане антитіло може бути введене до складу композиції в концентрації 1 мг/мл в 10 mM цитратному буфері при pH 4, pH 5, pH 6 або pH 7. Після цього зразки композиції інкубують протягом 4 тижнів при температурі 4 °C, 25 °C і 40 °C під час дослідження прискореного розкладання. Зміни зарядового профілю антитіла, які відображають хімічні зміни, можуть бути оцінені із застосуванням капілярного ізоелектрофокусування (cIEF) у відповідності зі стандартними методиками. При дослідженні хімічної стабільності генно-інженерного антитіла Прикладу 1, після здійснення дослідження за методиками по суті так як описано вище, були одержані наведені нижче результати.

Таблиця 5:

Хімічна і стабільність, визначена із застосуванням cIEF

	Зміна % головного піку через (зберігання при температурі 25 °C)	4 тижні (у порівнянні з 4 °C) (зберігання при температурі 40 °C)
10 mM цитратний буфер, pH 5	-0,4	Не випробували
10 mM цитратний буфер, pH 6	-4,1	-24,7
10 mM цитратний буфер, pH 7	-7,7	Не випробували

- Результати показують, що після 4 тижнів зберігання при температурі 25 °C, % головного піку зменшується лише на 4,1 процентних пункти, у випадку одержання композиції при значенні pH 6 (звичайний рівень pH, що застосовується у композиції на основі антитіла), що вказує на те, що генно-інженерне антитіло до PCSK9 Прикладу 1 має достатню хімічну стабільність, щоб сприяти розробці рідких композицій з прийнятним строком придатності. Крім того, згадане антитіло також демонструє хорошу хімічну стабільність при pH5 і, меншою мірою, при pH7, що вказує на те, що антитіло має характеристики стабільності, які надають можливість одержання композицій в певному діапазоні pH.

#### С. Фізична стабільність

- Для оцінки фізичної стабільності досліджуваного антитіла, згадане антитіло може бути введене у композицію в концентрації 1 мг/мл в 10 mM цитратному буфері при pH 4, pH5, pH6 або pH7 (або 10 mM Трис-буфері, pH 8). Після цього, під час дослідження прискореного розкладання зразки інкубують протягом 4 тижнів при температурі 4 °C, 25 °C і 40 °C. Після інкубації фізичну стабільність оцінюють із застосуванням гель-хроматографії за розміром молекул (SEC), яка відокремлює бажане мономерне антитіло від агрегованого високомолекулярного (HMW) антитіла.

У Таблиці 6 наведені результати дослідження фізичної стабільності генно-інженерного антитіла до PCSK9 Прикладу 1 після здійснення дослідження за методиками по суті так як описано вище. Дані показують, що при pH 5, pH 6 і pH 7, зміна HMW протягом 4 тижнів при

температурі 25 °C або 40 °C була менше ніж 1 %, що вказує на те, що це антитіло має хорошу фізичну стабільність, і є стійким до самоасоціації та агрегації.

Таблиця 6:

Відсоток HMW фізично стабільних зразків

	% HMW, визначений за допомогою SEC				
	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
Вихідний зразок	0,26	0,32	0,40	0,50	1,31
25 °C впродовж 4 тижнів	0,37	0,44	0,51	0,66	2,10
40 °C впродовж 4 тижнів	20,34	1,15	1,02	1,32	3,41

### **Послідовності**

HCDR1 (SEQ ID NO: 1):

GFPFSKLGMV

HCDR2 (SEQ ID NO: 2):

TISSGGGYTYYPDSVKG

HCDR3 (SEQ ID NO: 3):

EGISFQGGTYTYVMDY

LCDR1 (SEQ ID NO: 4):

RSSKSLLHRNGITYSY

LCDR2 (SEQ ID NO: 5):

QLSNLAS

LCDR3 (SEQ ID NO: 6):

YQNLELPLT

HCVR (SEQ ID NO: 7):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFPFSKLG MVWVRQAPGKGLEWVSTISSG  
GGYTYYPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGISFQGGTYTYVM  
DYWGQGTLVTVSS

LCVR (SEQ ID NO: 8):

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SISRSSKSLHRNGITYSYWYLQKPGQSPQLLIYQLS  
NLASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQNLELPLTFGQGTKVEIK

HC (SEQ ID NO: 9):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFPFSKLG MVWVRQAPGKGLEWVSTISSG  
GGYTYYPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGISFQGGTYTYVM  
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPC  
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR  
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS  
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG

LC (SEQ ID NO: 10):

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SISRSSKSLHRNGITYSYWYLQKPGQSPQLLIYQLS  
NLASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQNLELPLTFGQGTKVEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

кДНК HC (SEQ ID NO: 11):

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCGTTCAGTAAGCTCGGCATGGTTTGGG  
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTGGT  
GGTTACACATACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCCAGAGACAA

TGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG  
 TATATTACTGTGCGAGAGAAGGAATTAGCTTTCAGGGTGGCACCTACACTTATGTTA  
 TGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCC  
 CATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCC  
 TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAG  
 GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT  
 ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTAC  
 ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTC  
 CAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCAT  
 CAGTCTTCCTGTTCCCCC AAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTG  
 AGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAC  
 TGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA  
 GTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT  
 GAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCG  
 AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTG  
 CCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  
 AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGA  
 ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA  
 GCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCC  
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG  
 GGTGA

кДНК LC (SEQ ID NO: 12)

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCC  
 GGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCTTACATCGTAATGGCATCACTTAT  
 TCGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATCAGCTG  
 TCCAACCTTGCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGAT  
 TTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCTAT  
 CAAAATCTAGAACTTCCGCTCACGTTCCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAACG  
 GACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT  
 GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTA  
 CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA  
 GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAG  
 CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC

TCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGCTAA

hPCSK9 (SEQ ID NO: 13):

RAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPDHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVL  
KEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVD  
YIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMV  
TDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKG  
TVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNF  
RDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAPGEDIIGASSDCSTC  
FVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFSKDVINEAWFPEDQRVLT  
NLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRR  
GERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCH  
QQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVK  
EHGIPAPQEQTVAEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEG  
AVTAVAICCRSRHLAQASQELQDVHHHHHH

hPCSK9 160-181 (SEQ ID NO: 14):

RITPPRYRADEYQPPDGGSLVE

hPCSK9 166-181 (SEQ ID NO: 15):

YRADEYQPPDGGSLVE

hPCSK9 163-174 (SEQ ID NO: 16):

PPRYRADEYQPP

hPCSK9, скорочена на C-кінці (SEQ ID NO: 17):

QEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPDHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKE  
ETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIE  
EDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD  
ENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGTVS  
GTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDD  
ACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAPGEDIIGASSDCSTCFVSQ  
SGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPEL



ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Eli Lilly and Company  
 <120> АНТИТІЛА ДО PCSK9 ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ  
 <130> X19477  
 <150> 61/535625  
 <151> 2011-09-16

<160> 17  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетична

<400> 1

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

<210> 2  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> Синтетична

<400> 2

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

Gly

<210> 3  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> Синтетична

<400> 3

Glu Gly Ile Ser Phe Gln Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Val Met Asp Tyr  
1 5 10 15

<210> 4  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 4

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg Asn Gly Ile Thr Tyr Ser Tyr  
1 5 10 15

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 5

Gln Leu Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 6

Tyr Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9  
<211> 451  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser  
 130 135 140  
 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 165 170 175  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 180 185 190  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys  
 195 200 205  
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu  
 210 215 220  
 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 245 250 255  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270  
 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
 290 295 300  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser  
 325 330 335  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350

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

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

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr  
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
435 440 445

Ser Leu Gly  
450

<210> 10  
<211> 219  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 11  
<211> 1356  
<212> ДНК  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 11  
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cccgttcagt aagctcggca tggtttgggt ccgccaggct 120  
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaacc attagtagtg gtgggtggtta cacatactat 180  
ccagacagtg tgaaggggcg gttcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagagaagga 300

```

attagctttc aggggtggcac ctacacttat gttatggact actggggcca gggcaccttg 360
gtcacctgtc cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tcccgctagc gccctgctcc 420
aggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
ccggtgacgg tgctcgtgaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc 540
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600
ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caagggtggac 660
aagagagttg agtccaaata tggccccca tgcccaccct gcccagcacc tgaggccgcc 720
gggggaccat cagtcttcct gtcccccca aaaccaagg acactctcat gatctcccg 780
acccctgagg tcacgtgctt ggtgggtggc gtgagccagg aagacccga ggtccagttc 840
aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg ggaggagcag 900
ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac 960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc 1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag 1080
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctacccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga aagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct 1200
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc 1260
aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggttga 1356

```

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

<220>  
 <223> Синтетична

```

<400> 12
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctctta catcgtaatg gcactactta ttcgtattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atcagctgtc caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
agcagggtagg aggctgagga tgttgagtt tattactgct atcaaaatct agaacttccg 300
ctcacgttcg gccagggcac caagggtgaa atcaaacgga ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcttg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctcgcaa 600

```



gtcaccatc agggcctgag ctgcctcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgctaa 660

<210> 13

<211> 672

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетична

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 14

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

Gly Gly Ser Leu Val Glu  
20

<210> 15  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 15

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

<210> 16  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 16

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

<210> 17  
<211> 376  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Синтетична

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu
    370                      375

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR) і варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), де HCVR містить гіперваріабельні ділянки (CDR) HCDR1, HCDR2 і HCDR3, а LCVR містить CDR LCDR1, LCDR2 і LCDR3, де амінокислотна послідовність HCDR1 задана послідовністю SEQ ID NO: 1, амінокислотна послідовність HCDR2 задана послідовністю SEQ ID NO: 2, амінокислотна послідовність HCDR3 задана послідовністю SEQ ID NO: 3, амінокислотна послідовність LCDR1 задана послідовністю SEQ ID NO: 4, амінокислотна послідовність LCDR2 задана послідовністю SEQ ID NO: 5 і амінокислотна послідовність LCDR3 задана послідовністю SEQ ID NO: 6, причому згадане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент зв'язується з людською пропротейнконвертазою субтилізин/кексинового типу 9 (PCSK9).
- 10 2. Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR) і варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), де амінокислотна послідовність HCVR задана послідовністю SEQ ID NO: 7 і амінокислотна послідовність LCVR задана послідовністю SEQ ID NO: 8.
- 15

3. Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за п. 2, що містить дві варіабельні ділянки важкого ланцюга (HCVR) і дві варіабельні ділянки легкого ланцюга (LCVR), де амінокислотна послідовність кожної HCVR задана послідовністю SEQ ID NO: 7 і амінокислотна послідовність кожної LCVR задана послідовністю SEQ ID NO: 8.
- 5 4. Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, що містить важкий ланцюг (HC) і легкий ланцюг (LC), де амінокислотна послідовність HC задана послідовністю SEQ ID NO: 9 і амінокислотна послідовність LC задана послідовністю SEQ ID NO: 10.
- 10 5. Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за п. 4, що містить два важкі ланцюги (HC) і два легкі ланцюги (LC), де амінокислотна послідовність кожного HC задана послідовністю SEQ ID NO: 9 і амінокислотна послідовність кожного LC задана послідовністю SEQ ID NO: 10.
6. Антитіло, що містить два важкі ланцюги (HC) і два легкі ланцюги (LC), де амінокислотна послідовність кожного HC задана послідовністю SEQ ID NO: 9 і амінокислотна послідовність кожного LC задана послідовністю SEQ ID NO: 10.
- 15 7. Антитіло, що складається з двох важких ланцюгів і двох легких ланцюгів, де амінокислотна послідовність кожного важкого ланцюга задана послідовністю SEQ ID NO: 9 і амінокислотна послідовність кожного легкого ланцюга задана послідовністю SEQ ID NO: 10.
8. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за п. 1 і один(ну) або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або допоміжних речовин.
- 20 9. Спосіб лікування гіперліпідемії або гіперхолестеринемії, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості антитіла або антигензв'язувального фрагмента за п. 1.
10. Спосіб лікування гіперліпідемії або гіперхолестеринемії, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості антитіла за п. 6.
- 25

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601