



(51) МПК
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/22 (2021.08); *A61K 39/395* (2021.08); *A61K 9/19* (2021.08); *A61P 3/06* (2021.08); *A61P 3/10* (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021119914, 13.12.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.12.2019

Дата регистрации:
01.03.2023

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.12.2018 US 62/783,260;
21.12.2018 US 62/783,265

(43) Дата публикации заявки: 24.01.2023 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 01.03.2023 Бюл. № 7

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 21.07.2021

(86) Заявка РСТ:
US 2019/066261 (13.12.2019)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2020/131624 (25.06.2020)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЧАЙ, Цин (US),
 ДЭЙ, Джонатан Уэсли (US),
 КОНРАД, Роберт Джон (US),
 ЦЯН, Юэвэй (US),
 ШРЕДЕР, Оливер (US),
 СИДЖЕЛ, Роберт Уильям (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2017177181 A1, 12.10.2017. CHI
X. et al. "ANGPTL8 Promotes the Ability of
ANGPTL3 to Bind and Inhibit Lipoprotein
Lipase", Mol Metab. 2017. Vol. 6. No. 10, pp. 1137-
1149. ZHANG R. "The ANGPTL3-4-8 Model, a
Molecular Mechanism for Triglyceride
Trafficking", Open Biol., 2016, Vol. 6: 150272. RU
620064 C2, 22.05.2017. WO 2018094112 A1,
24.05.2018.

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ КОМПЛЕКСА ANGPTL3/8 И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к антителам, которые связываются с комплексом ANGPTL3/8 человека и тем самым нейтрализуют их; к фармацевтическим композициям, содержащим упомянутые антитела, к клеткам млекопитающих, экспрессирующим антитела к комплексу ANGPTL3/8, к способу получения антител к комплексу ANGPTL3/8, к способу снижения

уровня триглицеридов, а также лечения заболеваний, связанных с метаболизмом липидов. Изобретение позволяет повышать активность липопротеинлипазы и тем самым эффективно снижать уровень триглицеридов, что в дальнейшем может быть использовано для лечения заболеваний и нарушений, связанных с метаболизмом липидов. 20 н. и 16 з.п. ф-лы, 1 ил., 14 табл., 5 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 16/22 (2021.08); *A61K 39/395* (2021.08); *A61K 9/19* (2021.08); *A61P 3/06* (2021.08); *A61P 3/10* (2021.08)

(21)(22) Application: **2021119914**, 13.12.2019(24) Effective date for property rights:
13.12.2019Registration date:
01.03.2023

Priority:

(30) Convention priority:
21.12.2018 US 62/783,260;
21.12.2018 US 62/783,265(43) Application published: **24.01.2023** Bull. № 3(45) Date of publication: **01.03.2023** Bull. № 7(85) Commencement of national phase: **21.07.2021**(86) PCT application:
US 2019/066261 (13.12.2019)(87) PCT publication:
WO 2020/131624 (25.06.2020)Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodiskij i
Partnery"

(72) Inventor(s):

CHAI, Qing (US),
DAY, Jonathan Wesley (US),
KONRAD, Robert John (US),
QIAN, Yuewei (US),
SCHROEDER, Oliver (US),
SIEGEL, Robert William (US)

(73) Proprietor(s):

ELI LILLY AND COMPANY (US)

(54) ANTIBODIES AGAINST ANGPTL3/8 COMPLEX AND THEIR APPLICATION METHODS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, in particular to antibodies, which bind to a human ANGPTL3/8 complex and, thereby, neutralize them; to pharmaceutical compositions containing the mentioned antibodies, to mammalian cells expressing antibodies to ANGPTL3/8 complex, to a method for the production of antibodies to ANGPTL3/8 complex, to a method for reduction in a

level of triglycerides, as well as treatment of diseases related to lipid metabolism.

EFFECT: invention allows for an increase in activity of lipoproteinlipase and, thereby, efficient reduction in a level of triglycerides, which can be further used for the treatment of diseases and disorders related to lipid metabolism.

36 cl, 1 dwg, 14 tbl, 5 ex

RU 2 791 034 C2

RU 2 791 034 C2

[1] Данное изобретение в целом относится к биологии и медицине, а более конкретно к антителам (Ат, Ab), которые связывают и тем самым нейтрализуют комплексы ангиопоэтин-подобных белков (ANGPTL) 3/8 человека. Такие Ат могут повышать активность липопротеинлипазы (ЛПЛ, LPL) и тем самым снижать уровень триглицеридов (ТГ, TG) в сыворотке, в результате чего их можно использовать для

лечения заболеваний и нарушений, связанных с метаболизмом липидов и глюкозы. [2] ANGPTL представляют собой семейство белков, которые регулируют ряд физиологических и патофизиологических процессов. Особый интерес в данном документе представляет роль ANGPTL3 и ANGPTL8 в метаболизме липидов и глюкозы.

[3] Сведения подтверждают роль ANGPTL3 как основного регулятора метаболизма липопротеинов, и то, что он может регулировать клиренс ТГ путем ингибирования ЛПЛ и ингибирования эндотелиальной липазы (ЭЛ, EL). *См., Chi et al. (2017) Mol. Metab. 6:1137-1149.* Дефицит, инактивация или потеря ANGPTL3 может привести к низким уровням холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП, LDL-C), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП, HDL-C) и ТГ. ANGPTL3 также может влиять на чувствительность к инсулину, тем самым играя роль в модуляции не только метаболизма липидов, но и метаболизма глюкозы. *См., Robciuc et al. (2013) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 33:1706-1713.* Нуклеотидные и аминокислотные последовательности ANGPTL3 человека известны. Например, одна нуклеотидная последовательность может быть найдена в Референтной Последовательности NCBI № NM_014495 (SEQ ID NO:1), и одна аминокислотная последовательность может быть найдена в Референтной Последовательности NCBI № NP_055310 (SEQ ID NO:2).

[4] ANGPTL8 высоко экспрессируется в печени и жировой ткани и, как сообщается, ингибирует ЛПЛ, образуя комплекс с ANGPTL3 и тем самым активируя его. *См. Chi, цитировано выше.* ANGPTL8 человека, по-видимому, индуцируется приемом пищи. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности ANGPTL8 человека известны. Например, одна нуклеотидная последовательность может быть найдена в Референтной Последовательности NCBI № NM_018687 (SEQ ID NO:3), и одна аминокислотная последовательность может быть найдена в Референтной Последовательности NCBI № NP_061157 (SEQ ID NO:4).

[5] Существуют комплексы ANGPTL3/8, которые имеют один или более ANGPTL3, связанных с одним или более ANGPTL8. Данные свидетельствуют о том, что эти комплексы более эффективно опосредуют ингибирование ЛПЛ по сравнению с только ANGPTL3 или ANGPTL8. Более того, комплексы ANGPTL3/8 могут быть получены *in vitro* путем коэкспрессии ANGPTL8 и ANGPTL3 в системе экспрессии млекопитающих. *См. Chi, цитировано выше.*

[6] Известны антитела, которые связываются либо с ANGPTL3, либо с ANGPTL8, и их можно использовать отдельно или в комбинации друг с другом для лечения заболеваний и нарушений, связанных с метаболизмом липидов и глюкозы. Например, публикация Международной заявки на патент № WO 2012/174178 раскрывает полностью человеческое моноклональное Ат и его антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ANGPTL3 и препятствуют его активности. Также известны другие терапевтические антитела против ANGPTL3. *См., например,* публикация Международной заявки на патент № WO 2008/073300 и Патент США № 7,935,796. Аналогичным образом, публикация Международной заявки на патент № WO 2017/027316 раскрывает полностью человеческое моноклональное Ат или его антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ANGPTL8 и препятствуют его активности. Кроме того, публикация Международной заявки на патент № WO 2017/177181 раскрывает комбинированную

терапию с использованием Ат против ANGPTL3 и Ат против ANGPTL8.

[7] К сожалению, существующие Ат, которые связываются только с ANGPTL3 или ANGPTL8, не подавляют полностью действие данных ANGPTL и/или комплексов ANGPTL3/8 на метаболизм липидов и/или глюкозы. См., например, Dewey *et al.* (2017) *N. Engl. J. Med.* 377:211-221; и Gusarova *et al.* (2017) *Endocrinology* 158:1252-1259. В связи с этим существует потребность в дополнительных Ат, особенно в Ат против комплекса ANGPTL3/8, для лечения заболеваний и нарушений, связанных с метаболизмом липидов и глюкозы, при этом такие Ат обладают улучшенными фармакологическими ингибирующими и/или регулирующими свойствами для модуляции метаболизма липидов и/или глюкозы.

[8] Чтобы удовлетворить данную потребность, для модифицированного комплекса ANGPTL3/8 предложены нуклеотидные и аминокислотные последовательности. Соответственно, в данном документе описаны последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие один или более модифицированных ANGPTL3 и модифицированных ANGPTL8 (т.е. слитые белки). В некоторых случаях последовательности нуклеиновых кислот содержат полинуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок ANGPTL3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17. В других случаях последовательности нуклеиновых кислот содержат полинуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок ANGPTL8, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18. В других случаях последовательности нуклеиновой кислоты содержат полинуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 17 и 18.

[9] Кроме того, предложены конструкции нуклеиновых кислот, которые содержат полинуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок ANGPTL3, как описано в данном документе, слитый белок ANGPTL8, как описано в данном документе, или и то, и другое, при этом такие конструкции могут быть кассетой или вектором экспрессии.

[10] Ввиду вышеизложенного предложены клетки-хозяева, которые включают в себя одну или более кассет или векторов экспрессии, как описано в данном документе. В некоторых случаях клетки-хозяева представляют собой эукариотические клетки. В некоторых случаях полинуклеотидные последовательности слитых белков ANGPTL3 и ANGPTL8 находятся в отдельных кассетах или векторах экспрессии, тогда как в других случаях они могут находиться в одной кассете или векторе экспрессии.

[11] Также предложены слитые белки ANGPTL3, которые содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17 или 19, а также их активные варианты или фрагменты. Аналогичным образом предложены слитые белки ANGPTL8, которые содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18 или 20, а также их активные варианты или фрагменты.

[12] Кроме того, предложены функциональные комплексы ANGPTL3/8, в особенности комплексы ANGPTL3/8 человека, при этом фрагмент ANGPTL3 комплекса представляет собой нативный (полноразмерный или усеченный) ANGPTL3 или слитый белок ANGPTL3, как описано в данном документе, и при этом фрагмент ANGPTL8 комплекса представляет собой слитый белок ANGPTL8, как описано в данном документе. В некоторых случаях слитый белок ANGPTL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19. Аналогичным образом и в некоторых случаях слитый белок ANGPTL8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. Более того, и в некоторых случаях комплексы могут иметь соотношение 1:1 фрагмента ANGPTL3 к фрагменту ANGPTL8. В других случаях комплексы могут иметь

соотношения, отличные от 1:1, такие как соотношение 1:2, 1:3, 2:1 или 3:1 фрагмента ANGPTL3 к фрагменту ANGPTL8, соответственно.

5 [13] Также предложены способы получения рекомбинантных комплексов ANGPTL3/8. Способы могут включать, по меньшей мере, этап экспрессии одной или более полинуклеотидных последовательностей для фрагмента ANGPTL3 и фрагмента ANGPTL8, как описано в данном документе, в клетке-хозяине, такой как в системе экспрессии млекопитающих, для получения из них комплексов ANGPTL3/8. В некоторых случаях фрагменты ANGPTL3 и ANGPTL8 предложены в отдельных конструкциях или векторах экспрессии. В других случаях ANGPTL3 и ANGPTL8 предложены в одной 10 конструкции или векторе экспрессии. Способы также могут включать этап очистки полученных комплексов ANGPTL3/8, который может включать не только концентрирование комплексов ANGPTL3/8, но также удаление одной или более меток, линкеров и сывороточного альбумина из фрагмента ANGPTL3 и/или фрагмента ANGPTL8. Способы также могут включать этап концентрирования комплексов 15 ANGPTL3/8 до и/или после этапа очистки.

[14] Во-вторых, предложено Ат к комплексу ANGPTL3/8, а также его применение, которое включает лечение заболеваний и нарушений, связанных с метаболизмом липидов и глюкозы, путем связывания и ингибирования активности комплекса ANGPTL3/8.

20 [15] Эффективное количество Ат против комплекса ANGPTL3/8, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли можно использовать для увеличения активности ЛПЛ, снижения уровня ТГ и лечения заболеваний или нарушений, связанных с метаболизмом липидов и/или глюкозы, у индивидуума, нуждающегося в этом.

25 [16] Описанное в данном документе Ат против комплекса ANGPTL3/8 связывает растворимый комплекс ANGPTL3/8, тем самым увеличивая активность ЛПЛ и снижая уровни ТГ в сыворотке. Индивидуумы с более низким уровнем триглицеридов имеют более низкий риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Преимущественно, описанное в данном документе Ат против комплекса ANGPTL3/8 связывается только 30 с комплексом ANGPTL3/8, а не только с ANGPTL3 или только с ANGPTL8 в соответствующих концентрациях. Считается, что Ат против комплекса ANGPTL3/8 увеличивает катаболизм ТГ-богатых липопротеинов (ТГБЛП, TRL), что снижает ТГ и/или не-ХС-ЛПВП (non-HDL-C), тем самым улучшая факторы риска дислипидемии при атеросклеротическом сердечно-сосудистом заболевании (ACC3, ASCVD), не 35 устраняемого современными способами лечения. Более того, поскольку описанное в данном документе Ат против комплекса ANGPTL3/8 не связывается только с ANGPTL3 или ANGPTL8, другие воздействия данных ANGPTL не ингибируются, что может приводить к меньшему количеству нежелательных эффектов *in vivo*, таких как снижение депрессии ЭЛ.

40 [17] В частности, Ат против комплекса ANGPTL3/8 представляет собой Ат против комплекса ANGPTL3/8 человека. В некоторых случаях Ат против комплекса ANGPTL3/8 может отменять, блокировать, ингибировать, затруднять, нейтрализовать или снижать активность *in vivo* комплекса ANGPTL3/8, в особенности его ингибирующую активность ЛПЛ. В некоторых случаях Ат против комплекса ANGPTL3/8 может быть 45 полноразмерным или может быть только антигенсвязывающим фрагментом (*например*, фрагментом Fab, F(ab')₂ или scFv). Желательные свойства Ат против комплекса ANGPTL3/8 включают снижение уровня ТГ при низких дозах Ат, которое сохраняется в течение, по меньшей мере, 21 дня.

[18] В некоторых случаях Ат против комплекса ANGPTL3/8 связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека и содержит области легкой цепи, определяющие комплементарность - Lcdr1, Lcdr2 и Lcdr3, и области тяжелой цепи, определяющие комплементарность - Hcdr1, Hcdr2 и Hcdr3, при этом Lcdr1 имеет аминокислотную последовательность RSSQSLDSDDGNTYLD (SEQ ID NO:11), Lcdr2 имеет аминокислотную последовательность YMLSYRAS (SEQ ID NO:12), и Lcdr3 имеет аминокислотную последовательность MQRIEFPLT (SEQ ID NO:13), и при этом Hcdr1 имеет аминокислотную последовательность TFSGFSLISGVGVG (SEQ ID NO:14), Hcdr2 имеет аминокислотную последовательность LIYRNDDKRYSPSLKS (SEQ ID NO:15), и Hcdr3 имеет аминокислотную последовательность ARTYSSGWYGNWFDP (SEQ ID NO:16).

[19] Дополнительно предложено Ат, содержащее вариабельную область легкой цепи (LCVR), при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; или Ат, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10. В некоторых случаях Ат содержит LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9 и HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10. В некоторых случаях Ат содержит легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), при этом LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. Альтернативно Ат содержит легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), при этом LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых случаях Ат представляет собой изотип IgG4.

[20] В некоторых случаях Ат против комплекса ANGPTL3/8 может представлять собой вариант Ат, описанный выше, в особенности LC-вариант, имеющий мутацию D31S (SEQ ID NO:21), мутацию D33A (SEQ ID NO:22), мутацию D33T (SEQ ID NO: 23); мутацию M56T (SEQ ID NO: 24), мутацию E99Q (SEQ ID NO: 25) или их комбинацию (*например*, мутации D33T и M56T или мутации D33A и M56T) в отношении LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

[21] Кроме того, предложено Ат, которое получают путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу кДНК, при этом молекула кДНК кодирует полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5 и 6, в таких условиях, при которых полипептиды экспрессируются, и извлечения Ат. В альтернативном варианте предложено Ат, которое получают путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей две молекулы кДНК, при этом первая молекула кДНК кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, а вторая молекула кДНК кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, в таких условиях, при которых полипептиды экспрессируются, и извлечения Ат. В некоторых случаях Ат против комплекса ANGPTL3/8 может представлять собой вариант описанного выше Ат, в особенности LC-вариант, имеющий мутацию D31S (SEQ ID NO:21), мутацию D33A (SEQ ID NO:22), мутацию D33T (SEQ ID NO: 23); мутацию M56T (SEQ ID NO: 24), мутацию E99Q (SEQ ID NO: 25) или их комбинацию в отношении LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

[22] Кроме того, предложено Ат, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека и нейтрализует его в стандартном анализе активности ЛПЛ с EC₅₀ 0,5 нМ или менее. Также предложено Ат, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека с константой диссоциации менее или равной 1×10^{-6} М. Вместе с тем предложено Ат,

которое связывается с ANGPTL3 человека и ANGPTL8 человека с константой диссоциации более чем 1×10^{-6} М. Кроме того, предложено Ат, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека с сигналом, более чем в 3 раза превышающим фоновый сигнал, характерный при отсутствии связывания, при измерении с помощью анализа ИФА с одноточечной калибровкой, но не связывается только с ANGPTL3 человека или только с ANGPTL8 с сигналом, более чем в 3 раза превышающим фоновый сигнал, характерный при отсутствии связывания, при измерении с помощью анализа ИФА с одноточечной калибровкой. Аналогичным образом предложено Ат, которое снижает ТГ *in vivo*, по меньшей мере, на 50% по сравнению с контролем IgG в дозе 10 мг/кг в момент времени через 14 дней после введения дозы.

[23] В-третьих, предложена фармацевтическая композиция, которая содержит Ат, описанное в данном документе, или популяцию Ат, описанных в данном документе, и приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент. Также предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, при этом клетка способна экспрессировать Ат, описанное в данном документе. Дополнительно предложена клетка млекопитающего, содержащая первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, при этом первая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и при этом вторая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и при этом клетка способна экспрессировать Ат, описанное в данном документе. В некоторых случаях Ат против комплекса ANGPTL3/8 может представлять собой вариант описанного выше Ат, в особенности LC-вариант, имеющий мутацию D31S (SEQ ID NO: 21), мутацию D33A (SEQ ID NO:22), мутацию D33T (SEQ ID NO: 23); мутацию M56T (SEQ ID NO:24), мутацию E99Q (SEQ ID NO:25) или их комбинацию в отношении LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

[24] В-четвертых, предложен способ получения Ат, который включает культивирование клетки млекопитающего с молекулой ДНК, имеющей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, при этом клетка способна экспрессировать Ат, описанное в данном документе, в условиях, в которых происходит экспрессия Ат, и выделение экспрессированного Ат. В некоторых случаях полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, может кодировать мутацию D31S, мутацию D33A, мутацию D33T, мутацию M56T, мутацию E99Q или их комбинацию. В данном документе также предложен способ лечения АССЗ, хронической почечной недостаточности (ХПН, СКД), диабета, гипертриглицеридемии, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ, NASH), ожирения или их комбинации, при этом способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества Ат, описанного в данном документе. Дополнительно предложен способ снижения уровня ТГ, который включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества Ат, описанного в данном документе.

[25] В-пятых, предложено Ат для использования в терапии. В частности, Ат предназначено для лечения АССЗ, ХПН, диабета, гипертриглицеридемии, НАСГ, ожирения или их комбинации. Также предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении АССЗ, ХПН, диабета, гипертриглицеридемии, НАСГ, ожирения

или их комбинации, которая содержит эффективное количество Ат, описанного в данном документе.

[26] Преимущества, эффекты, особенности и объекты, отличные от изложенных выше, станут более очевидными при рассмотрении подробного описания, приведенного ниже. В таком подробном описании делается ссылка на следующий графический материал(ы), при этом:

[27] На Фиг. 1 представлено изображение ДСН-ПААГ геля, демонстрирующее анализ комплекса ANGPTL3/8 в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

[28] Упоминание элемента в единственном числе не исключает возможности присутствия более чем одного из элементов, если контекст явным образом не предполагает присутствия одного и только одного из элементов. Соответственно, термины в единственном числе обычно означают «по меньшей мере, один».

[29] Определения

[30] Используемый в контексте данного документа термин «около» означает в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, установленная концентрация, длина, молекулярная масса, рН, сходство последовательности, временные рамки, температура, объем и т. д. Такое значение или диапазон может быть в пределах порядка, обычно в пределах 20%, более типично в пределах 10% и даже более типично в пределах 5% от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое термином «около», будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

[31] Используемый в контексте данного документа термин «аффинность» означает силу связывания Ат с эпитопом на комплексе ANGPTL3/8.

[32] Используемый в контексте данного документа термин «ангиопоэтин-подобный белок 3» или «ANGPTL3» означает белок, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:2.

[33] Используемый в контексте данного документа термин «ангиопоэтин-подобный белок 8» или «ANGPTL8» означает белок, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:4.

[34] Используемый в контексте данного документа термин «комплекс ANGPTL3/8» означает мультибелковый комплекс одного или более соединений ANGPTL3, которые связаны с одним или более соединениями ANGPTL8.

[35] Используемый в контексте данного документа термин «Ат против комплекса ANGPTL3/8» или «комплексное Ат против ANGPTL3/8» означает Ат, которое одновременно распознает и связывается с областью как на ANGPTL3, так и на ANGPTL8, в особенности в случае, когда они находится в форме ANGPTL3/8 комплекса. Как правило, Ат против комплекса ANGPTL3/8 обычно не связывается с другими членами семейства ANGPTL (например, ANGPTL1, ANGPTL2, ANGPTL4, ANGPTL5, ANGPTL6 или ANGPTL7). Более того, как отмечалось в другом месте данного документа, Ат против комплекса ANGPTL3/8 также не будет связываться только с ANGPTL3 или только с ANGPTL8 при определенных концентрациях, как описано ниже в анализе ИФА с одноточечной калибровкой.

[36] Используемый в контексте данного документа термин «связывать» или «связывает» означает способность белка образовывать тип химической связи или силы притяжения с другим белком или молекулой, как это определяется обычными способами, известными в данной области техники. Связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации (K_D) около 1×10^{-6} М или менее (т.е. меньшее

значение K_D означает более плотное связывание). Способы определения, связываются ли две молекулы, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как указано в данном документе Ат против комплекса ANGPTL3/8 связывается только с комплексом ANGPTL3/8 и не связывается отдельно только с ANGPTL3 или только с ANGPTL8. Связывается ли Ат только с комплексом ANGPTL3/8, а не отдельно только с ANGPTL3 или только с ANGPTL8, можно определить с помощью стандартных анализов ИФА в однотоочечном формате, как описано ниже, а связывание можно охарактеризовать с помощью технологии Biacore, как описано ниже. Несмотря на то, что описанные в данном документе Ат являются человеческими, они могут, однако, проявлять перекрестную реактивность с другими комплексами ANGPTL3/8 других видов, например комплексом ANGPTL3/8 яванской макаки, комплексом ANGPTL3/8 мыши или комплексом ANGPTL3/8 крысы.

[37] Используемый в контексте данного документа термин «эффективное количество» обозначает количество или дозу соединения или фармацевтической композиции, содержащей его, которое при однократном или многократном введении доз индивидууму будет вызывать биологическую или терапевтическую реакцию, или желаемый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, что находится под наблюдением исследователя, ветеринара, врача или другого лечащего персонала. В некоторых случаях эффективное количество соединения, описанного в данном документе, или композиций, включающих его, для индивидуума, нуждающегося в этом, может привести к увеличению активности ЛПЛ. Доза может включать в себя более высокую начальную нагрузочную дозу с последующей более низкой дозой. Дозу можно вводить с любым терапевтически эффективным интервалом, например, несколько раз в день, один раз в день, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца и т. д. Доза, составляющая эффективное количество, может составлять от 0,01 мг/кг до 100 мг/кг.

[38] Используемый в контексте данного документа термин «равновесная константа диссоциации» или « K_D » означает количественное измерение аффинности Ат к конкретному взаимодействию антигена, такой как аффинности Ат к комплексу ANGPTL3/8, в особенности мере склонности конъюгата Ат/комплекс ANGPTL3/8 к обратимому разделению на его составные части. Аналогичным образом, как здесь используется, «равновесной константой ассоциации» или « K_a » означает величину, обратную K_D .

[39] Используемый в контексте данного документа термин «функциональный» означает, что слитый белок ANGPTL3, слитый белок ANGPTL8 или комплекс ANGPTL3/8 обладают биологической активностью, аналогичной активности природного ANGPTL3, природного ANGPTL8 или природного комплекса ANGPTL3/8, включая, например, ингибирование ЛПЛ или действуя как антиген, к которому может быть создано и направлено Ат.

[40] Используемый в контексте данного документа термин «заболевание или нарушение, связанное с метаболизмом глюкозы» означает диабет и тому подобное.

[41] Используемый в контексте данного документа термин «заболевание или нарушение, связанное с метаболизмом липидов» означает состояние, связанное с аномальным метаболизмом липидов, такое как дислипидемия, гиперлипидемия и гиперлипопротеинемия, включая гипертриглицеридемию, гиперхолестеринемия,

хиломикронемии, смешанную дислипидемию (ожирение, метаболический синдром, диабет и *т. д.*), липодистрофию и липоатрофию. Данный термин также охватывает некоторые сердечно-сосудистые заболевания, такие как атеросклероз и коронарная болезнь сердца, острый панкреатит, НАСГ, ожирение и тому подобное.

5 [42] Используемый в контексте данного документа термин «полумаксимальная эффективная концентрация» или «EC₅₀» означает концентрацию Ат (обычно выраженную в молярных единицах (М)), которая вызывает ответ на полпути между исходным уровнем и максимумом по прошествии заранее определенного периода времени. EC₅₀, описанная в данном документе, в идеале составляет 3,0 нМ или менее.

10 [43] Используемый в контексте данного документа термин «конструкция нуклеиновой кислоты» или «кассета экспрессии» означает молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, регуляторную последовательность, функционально связанную с кодирующей последовательностью. Таким образом, регуляторная последовательность, такая как промотор, находится в рабочем взаимодействии с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими, по меньшей мере, один представляющий интерес полипептид, такой как слитые белки ANGPTL3, описанные в данном документе, и/или слитые белки ANGPTL8, описанные в данном документе. Такие конструкции нуклеиновых кислот могут быть в форме кассеты экспрессии или переноса. Конструкция нуклеиновой кислоты может включать олигонуклеотид или полинуклеотид, состоящий из дезоксирибонуклеотидов, рибонуклеотидов или их комбинаций, содержащих нуклеотидные последовательности для одного или более представляющих интерес полипептидов.

25 [44] Используемый в контексте данного документа термин «функционально связанный» означает, что элементы конструкции нуклеиновой кислоты сконфигурированы так, чтобы выполнять свои обычные функции. Таким образом, регуляторные последовательности (*т.е.* промоторы), функционально связанные с кодирующей последовательностью, способны влиять на экспрессию кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности не обязательно должны контактировать с кодирующей последовательностью, если они функционируют так, чтобы направлять ее экспрессию (*т.е.* поддерживать правильную рамку считывания). Таким образом, например, промежуточные нетранслируемые, но еще транскрибируемые последовательности могут присутствовать между промотором и кодирующей последовательностью, и промоторная последовательность по-прежнему может считаться «функционально связанной» с кодирующей последовательностью.

35 [45] Используемый в контексте данного документа термин «регуляторная последовательность» или «регуляторные последовательности» означает промоторы, сигналы полиаденилирования, последовательности терминации транскрипции и трансляции, регуляторные домены, расположенные до кодирующей последовательности, точки начала репликации, области внутренней посадки рибосомы («IRES»), энхансеры и тому подобное, которые вместе обеспечивают репликацию, транскрипцию и трансляцию кодирующей последовательности в реципиентной клетке-хозяине. Не все эти регуляторные последовательности должны присутствовать обязательно, если выбранная кодирующая последовательность способна реплицироваться, транскрибироваться и транслироваться в соответствующей клетке-хозяине.

45 [46] Используемый в контексте данного документа термин «кодирующая последовательность» или «кодирующие последовательности» означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует один или более представляющих интерес полипептидов, и представляет собой последовательность

нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется (в случае ДНК) и транслируется (в случае РНК) в полипептид *in vitro* или *in vivo* при размещении под контроль соответствующих регуляторных последовательностей. Границы кодирующей последовательности(ей) определяются стартовым кодоном на 5' (амино) конце и стоп-кодом трансляции на 3' (карбоксо) конце. Кодирующая последовательность может 5 содержать, но не ограничивается этим, последовательности вирусной нуклеиновой кислоты, кДНК из прокариотической или эукариотической мРНК, последовательности геномной ДНК из прокариотической или эукариотической ДНК или даже синтетические последовательности ДНК.

10 [47] Что касается регуляторных и кодирующих последовательностей, то они могут быть нативными/аналогичными по отношению к клетке-хозяину или друг другу. Альтернативно, регуляторная и кодирующая последовательности могут быть гетерологичными по отношению к клетке-хозяину или друг другу.

15 [48] Используемый в контексте данного документа термин «промотор» означает нуклеотидную область, состоящую из регуляторной последовательности нуклеиновой кислоты, при этом регуляторная последовательность получена из гена или создана синтетически и способна связывать РНК-полимеразу и инициировать транскрипцию расположенной после него (3'-направление) кодирующей последовательности. В 20 конструкциях нуклеиновых кислот можно использовать ряд промоторов, включая нативный промотор для одного или более представляющих интерес полипептидов. Альтернативно, промоторы могут быть выбраны на основании желаемого результата. Такие промоторы могут включать, но не ограничиваются ими, индуцируемые промоторы, репресслируемые промоторы и конститутивные промоторы.

25 [49] Используемый в контексте данного документа термин «вариант» означает полинуклеотид или полипептид, имеющий одну или более модификаций, таких как добавление, делеция, вставка и/или замена одной или более специфических нуклеиновых кислот или аминокислотных остатков по сравнению с референтной нуклеотидной или аминокислотной последовательностью. Таким образом, вариант включает одно или 30 более изменений по сравнению с референтной нуклеотидной или аминокислотной последовательностью. Как указано в данном документе Ат против комплекса ANGPTL3/8 может иметь вариацию LC или HC. В частности, Ат может быть LC-вариантом, имеющим мутацию D31S (SEQ ID NO:21), мутацию D33A (SEQ ID NO:22), мутацию D33T (SEQ ID NO:23); мутацию M56T (SEQ ID NO:24) или мутацию E99Q (SEQ ID NO:25) в отношении LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 5. Аналогичным образом, LC-вариант может представлять собой комбинацию любых двух из вышеперечисленных мутаций, таких как, например, мутаций D31S и D33A, мутаций D31S и D33T, мутаций D31S и M56T, мутаций D31S и E99Q, мутаций D33A и M56T, мутаций D33A и E99Q, мутаций D33T и M56T, мутаций D33T и E99Q, а также M56T и E99Q, опять же в отношении LC, имеющей аминокислотную последовательность 40 SEQ ID NO:5. Более того, LC-вариант может представлять собой комбинацию любых трех из вышеперечисленных мутаций, таких как, например, мутаций D31S, D33A и M56T, мутаций D31S, D33A и E99Q, мутаций D31S, D33T и M56T, мутаций D31S, D33T и E99Q, D33A, мутаций M56T и E99Q, и мутаций D33T, M56T и E99Q, опять же в отношении LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. Кроме того, LC-вариант 45 может представлять собой комбинацию любых четырех из вышеперечисленных мутаций, таких как, например, мутаций D31S, D33A, M56T и E99Q; и мутаций D31S, D33T, M56T и E99Q, опять же в отношении LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

[50] Используемый в контексте данного документа термин «вектор» означает репликон, такой как плазида, фаг или космида, к которому может быть присоединена другая последовательность нуклеиновой кислоты, такая как кассета экспрессии так, чтобы вызвать репликацию присоединенной последовательности. Вектор способен переносить молекулы нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева. Векторы обычно содержат один или небольшое количество сайтов распознавания эндонуклеазой рестрикции, при этом интересующая нуклеотидная последовательность может быть вставлена определенным образом без потери основной биологической функции вектора, а также селективный маркер, который можно использовать для идентификации и отбора клеток-хозяев, трансформированных вектором. Поэтому вектор может быть способен переносить последовательности нуклеиновой кислоты в клетки-мишени.

[51] Используемый в контексте данного документа термин «лечение» или «лечить» означает ведение индивидуума и уход за индивидуумом, имеющим патологию, для которой рекомендуется введение Ат против комплекса ANGPTL3/8 с целью борьбы с симптомами, или облегчения симптомов и осложнений таких патологий. Лечение включает в себя введение индивидууму, нуждающемуся в этом, соединения или композиции, содержащей соединение, описанное в данном документе, для предотвращения появления симптомов или осложнений, облегчения симптомов или осложнений, или устранения заболевания, патологии или нарушения. Лечение включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом соединения или композиций, содержащих описанное в данном документе, приводящее к увеличению активности ЛППЛ и снижению ТГ. Индивидуум, подлежащий лечению, является животным, в особенности человеком.

[52] Используемый в контексте данного документа термин «пациент», «субъект» и «индивидуум» используются в данном документе взаимозаменяемо и означают животное, в особенности человека. В некоторых случаях индивидуум представляет собой человека и, кроме того, характеризуется заболеванием, нарушением или состоянием, которые могут улучшиться от введения Ат против комплекса ANGPTL3/8.

[53] Используемый в контексте данного документа термин «антитело» или «Ат» и тому подобное означает полноразмерное Ат, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, имеющие межцепочечные и внутрицепочечные дисульфидные связи. Аминоконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей содержит вариабельную область, в первую очередь отвечающую за распознавание антигена. Каждая HC содержит N-концевую HCVR и константную область HC (HCCR). Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (LC)- (LCVR) и константную область LC - (LCCR). Как указано в данном документе, Ат представляет собой Ат типа иммуноглобулина G (IgG), и изотип IgG можно дополнительно разделить на подклассы (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Области HCVR и LCVR могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность («CDR»), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями («FR»). Каждая LCVR и HCVR содержит три CDR и четыре FR, расположенных от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В данном документе три CDR тяжелой цепи обозначены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а три CDR легкой цепи обозначены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3. CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном, таким как комплекс ANGPTL3/8. Присвоение остатков различным CDR может быть выполнено с помощью таких алгоритмов, как, например, по Чотиа, по Кабату или по Норсу. Определение CDR по Норсу основано

на кластеризации распространения аффинности с большим количеством кристаллических структур (North *et al.* (2011) *J. Mol. Bio.* 406:228-256). В данном документе CDR лучше всего обозначаются последовательностями, перечисленными в Списке Последовательностей, которые основаны на комбинации нескольких определений, включая по Норсу.

[54] Выделенная ДНК, кодирующая область HCVR, может быть преобразована в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей HCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи. Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной амплификации ПЦР.

[55] Выделенная ДНК, кодирующая область LCVR, может быть преобразована в полноразмерный ген легкой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей LCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи. Последовательности генов константной области легкой цепи человека, а также других млекопитающих, известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной амплификации ПЦР. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда.

[56] Описанные в данном документе Ат могут содержать часть Fc IgG4-РАА. Fc-часть IgG4-РАА имеет мутацию Ser на Pro в положении 231 (S231P), мутацию Phe на Ala в положении 237 (F237A) и мутацию Leu на Ala в положении 238 (L238A), согласно нумерации по абсолютному положению в SEQ ID NO:6. Мутация S231P является шарнирной мутацией, которая предотвращает образование полу-Ат (явление динамического обмена полумолекул в Ат IgG4). Мутации F237A и L238A дополнительно уменьшают эффекторную функцию и без того низкого изотипа IgG4 человека. Однако предполагается, что Ат, описанные в данном документе, альтернативно могут содержать другую Fc-часть.

[57] С целью уменьшения потенциальной индукции иммунного ответа при введении дозы человеку, некоторые аминокислоты могут потребовать обратных мутаций, чтобы соответствовать последовательностям зародышевой линии Ат.

[58] Фармацевтические композиции, содержащие описанные в данном документе соединения, могут быть парентерально введены индивидууму, нуждающемуся в таком лечении. Такой индивидуум может иметь АССЗ или иметь высокий риск развития АССЗ. Данные индивидуумы могут иметь острый коронарный синдром, инфаркт миокарда (ИМ, МИ) в анамнезе, стабильную или нестабильную стенокардию, коронарную или другую артериальную реваскуляризацию, инсульт, транзиторную ишемическую атаку (ТИА, ТИА), аневризму грудной или брюшной аорты или заболевание периферических артерий, предположительно атеросклеротического происхождения. Индивидуумы с высоким риском развития АССЗ дополнительно могут иметь сахарный диабет 2-го типа (СД2, Т2D), ХПН или семейную гиперхолестеринемию (СГ, FH).

[59] Парентеральное введение может осуществляться путем подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции с помощью шприца, необязательно шприца-ручки, или механического инъектора. Альтернативно, парентеральное введение может осуществляться с помощью инфузионной помпы. В некоторых случаях фармацевтические композиции, подходящие для введения индивидууму, содержат терапевтически эффективное количество соединения, описанного в данном документе,

и один или более фармацевтически приемлемых наполнителей. Такие фармацевтические композиции могут быть получены любым из множества способов с применением традиционных эксципиентов для фармацевтических препаратов, которые хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington, "The Science and Practice of Pharmacy" (D.V. Troy ed., 21st Ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

[60] Соединения, описанные в данном документе, могут быть использованы в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, полезными для модуляции активности ЛПЛ, лечения заболеваний или нарушений, связанных с метаболизмом липидов, или лечения заболеваний или нарушений, связанных с метаболизмом глюкозы, включая любое из нарушений, перечисленных выше. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно комбинировать с заявленными соединениями, включают, но не ограничиваются ими, антидиабетические агенты, такие как инсулин или аналоги инсулина, бигуаниды, сульфонилмочевины, тиазолидиндионы, ингибиторы дипептидилпептидазы-4 («ДПП-4», «DPP- 4») или ингибиторы натрий-зависимого переносчика глюкозы (SGLT2); инкретиновые соединения, такие как глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) или аналоги GLP-1, желудочный ингибиторный полипептид (GIP) или аналоги GIP, оксинтомодулин (ОХМ) или аналоги ОХМ; аспирин; антитромбоцитарные средства; блокаторы H₂-рецепторов; ингибиторы протонной помпы; гипотензивные средства; липид-модифицирующие препараты, такие как ингибиторы редуктазы HMG-CoA, ингибиторы PCSK9, ингибиторы абсорбции холестерина, фибраты, ниацин, агонисты LXR, агонисты RXR, агонисты ROR или модуляторы обратного транспорта холестерина; препараты для лечения сердечной недостаточности, такие как ингибиторы АСЕ, ингибиторы рецепторов ангиотензина/неприлизина, ARB или антагонисты В-адренорецепторов; препараты для противовоспалительной терапии; препараты для лечения гипертонии, препараты для лечения фибрилляции предсердий; препараты для лечения нейродегенерации; противоопухолевые препараты; препараты для лечения диабетической кардиомиопатии, диабетической ретинопатии, диабетической нейропатии, диабетической нефропатии, для снижения веса, заживление ран; препараты для лечения нефропатии; препараты для лечения БПА (PAD) или комбинации любых из вышеуказанных агентов. Ат против комплекса ANGPTL3/8 и один или более дополнительных терапевтических агентов могут быть введены либо вместе с помощью одинакового пути доставки и средства, такого как одна пилюля, капсула, таблетка или инъекционная лекарственная форма; либо введены раздельно, либо в одно и то же время различными средствами доставки или путями; либо введены последовательно.

[61] *Получение и Очистка Комплексов ANGPTL3/8*

[62] Одним из аспектов раскрытия являются комплексы ANGPTL3/8, которые можно использовать для создания Ат, которое связывается только с комплексом и не связывается отдельно только с ANGPTL3 или только с ANGPTL8. Не смотря на то, что Ат против ANGPTL3 и Ат против ANGPTL8 уже известны, существует проблема в синтезе достаточных количеств функциональных комплексов ANGPTL3/8, в особенности комплексов ANGPTL3/8 человека, для создания Ат против комплекса ANGPTL3/8. Дополнительно или альтернативно такие комплексы ANGPTL3/8 можно использовать в анализах для оценки свойств Ат, направленных на ANGPTL3, ANGPTL8 и/или комплексы ANGPTL3/8.

[63] Таким образом, в раскрытии также описаны способы создания ANGPTL8 путем превращения его в N- или C-концевой сывороточный альбумин (например, человека,

мышь или кролика). Функциональные комплексы ANGPTL3/8 затем могут быть получены путем коэкспрессии слитого белка ANGPTL8 с нативным слитым белком ANGPTL3 или ANGPTL3 в системе экспрессии млекопитающих.

[64] Как отмечалось выше, известны нуклеотидные и аминокислотные последовательности нативного ANGPTL3 человека и нативного ANGPTL8 человека (см., например, SEQ ID NO:1-2 и 3-4, соответственно). Однако ANGPTL3 или ANGPTL8, как описано в данном документе, являются модифицированными (*т.е.* рекомбинантными/синтетическими) и поэтому отличаются от нативных последовательностей содержанием дополнительных аминокислотных последовательностей для улучшения получения, секретирования и/или образования комплексов ANGPTL3 и ANGPTL8.

[65] Например, ANGPTL3 можно модифицировать путем включения в него одного или более линкеров и меток, известных в данной области техники. Как указано в данном документе ANGPTL3 человека (SEQ ID NO:2) модифицирован путем включения линкера и FLAG-метки, так что слитый белок ANGPTL3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17. В некоторых случаях линкер может содержать от около 1 до около 10 аминокислот, например, 3 аминокислоты, в особенности 3 остатка Ala. Линкер и FLAG-метки могут быть размещены на N- или C-конце последовательности ANGPTL3, в особенности на C-конце, как в SEQ ID NO:17, при этом остатки 1-460 соответствуют ANGPTL3, а остатки 461-471 соответствуют линкеру 3-Ala и FLAG-метке.

[66] Аналогичным образом, ANGPTL8 можно модифицировать путем включения одного или более линкеров и меток в дополнение к последовательности для сывороточного альбумина, в особенности человеческого сывороточного альбумина. Как указано в данном документе ANGPTL8 человека (SEQ ID NO:4) модифицирован путем включения линкера, сигнального пептида каппа-цепи IgG, полигистидиновой (His)-метки, зрелого человеческого сывороточного альбумина человека, линкера и сайта расщепления PreScission®, таким образом, что слитый белок ANGPTL8 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18. В некоторых случаях линкер может содержать от около 1 до около 10 аминокислот, например, жесткий полипролиновый повтор, в особенности линкер Ala-Pro (AP)-10. Сигнальный пептид, His-метка, зрелый ЧСА (HSA), линкер и сайт расщепления PreScission® могут быть размещены на N- или C-конце последовательности ANGPTL8, в особенности на N-конце как в SEQ ID NO:18, при этом остатки 1-20 соответствуют сигнальному пептиду каппа-цепи IgG, остатки 21-27 соответствуют His-метке, остатки 28-612 соответствуют ЧСА, остатки 613-632 соответствуют линкеру AP-10, остатки 633-643 соответствуют сайту расщепления PreScission®, а остатки 644-820 соответствуют ANGPTL8.

[67] Способы конструирования конструкций нуклеиновых кислот для экспрессии слитого белка ANGPTL3 и/или слитого белка ANGPTL8, как описано в данном документе, хорошо известны в данной области техники и могут быть найдены, например, в Balbás & Lorence, “Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols” (2nd Ed. Humana Press 2004); Davis *et al.*, “Basic Methods in Molecular Biology” (Elsevier Press 1986); Sambrook & Russell, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001); Tijssen, “Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes” (Elsevier 1993); и “Current Protocols in Molecular Biology” (Ausubel *et al.* eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience 1995); а также патентах США № 6,664,387; 7,060,491; 7,345,216 и 7,494,805. Поскольку ANGPTL8 не содержит дисульфидных связей, можно использовать системы экспрессии млекопитающих. Как указано в данном документе системы экспрессии HEK293 или системы экспрессии CHO

могут быть использованы для создания слитых белков ANGPTL3 и/или ANGPTL8, в особенности путем коэкспрессии.

[68] Помимо экспрессии слитого белка ANGPTL3 и/или слитого белка ANGPTL8, способы также могут включать очистку полученных слитых белков на основе конкретной метки, используемой для каждого слитого белка, которые хорошо известны в данной области техники. Что касается слитых белков ANGPTL3 и ANGPTL8, описанных в данных документах, очистка может привести к ряду усечений после удаления меток, таким образом, что слитый белок ANGPTL3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19 (при этом остатки 1-444 соответствуют ANGPTL3, а остатки 445-455 соответствуют линкеру 3-Ala и FLAG-метке), а слитый белок ANGPTL8 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20 (при этом остатки 1-4 соответствуют остаткам расщепления из сайта расщепления PreScission®, а остатки 5-182 соответствуют фрагменту ANGPTL8), которые легко связываются друг с другом с образованием функциональных комплексов ANGPTL3/8.

[69] *Получение и Очистка Антител*

[70] Ат против комплекса ANGPTL3/8 могут быть получены в системе экспрессии клеток млекопитающих с использованием линии клеток CHO - GSKO. Нокаут гена глутаминсинтетазы (ГС, GS) обеспечивает жесткую строгость отбора путем устранения эндогенной фоновой активности ГС, которая может позволить выживание низко- или непродуцительных клеток в условиях отбора. Гены, кодирующие HC и LC Ат, описанного в данном документе, могут быть субклонированы в отдельные ГС-содержащие плазмиды экспрессии для котрансфекции, или обе цепи могут быть субклонированы в одну ГС-содержащую экспрессионную плазмиду. Последовательность кДНК, кодирующая HC или LC, слита в рамке считывания с кодирующей последовательностью сигнального пептида, который может представлять собой лидерную последовательность капша-цепи мыши, для усиления секреции желаемого продукта в среду для культивирования клеток. Экспрессия управляется вирусным промотором цитомегаловируса (ЦМВ, CMV).

[71] Клетки CHO - GSKO - стабильно трансфицируют с использованием электропорации и соответствующего количества рекомбинантной плазмиды для экспрессии HC и LC, и трансфицированные клетки поддерживают в суспензионной культуре при подходящей плотности клеток. Отбор трансфицированных клеток осуществляют путем выращивания без глутамин в бессывороточной среде, содержащей 25 мкМ метионинсульфоксимиона (МСК, MSX), и инкубируют при 32°C-37°C и 5-7% CO₂. Ат секретируются в среду из клеток CHO. Ат могут быть очищены с помощью аффинной хроматографии с протеином А с последующей анионообменной хроматографией или хроматографией с гидрофобным взаимодействием (или другими подходящими способами), и можно использовать эксклюзионную хроматографию для дальнейшей очистки.

[72] Ат из собранной среды захватываются на смоле MabSelect SuRe Protein A (GE Healthcare). Затем смолу быстро промывают рабочим буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (ФСБ, PBS) pH 7,4 или рабочим буфером, содержащим Трис, для удаления неспецифически связанного материала. Затем Ат элюируют из смолы раствором с низким pH, таким как 20 мМ уксусная кислота/5 мМ лимонная кислота. Фракции, содержащие Ат против ANGPTL3/8, объединяют и могут удерживаться при низком pH для инактивации потенциальных вирусов. Уровень pH может быть увеличен, по мере необходимости, добавлением основания, такого как 0,1 М Трис pH 8,0. Ат против ANGPTL3/8 могут быть дополнительно очищены с помощью хроматографии с

гидрофобным взаимодействием (HIC) с использованием смол, таких как Phenyl HP (GE Healthcare). Ат против ANGPTL3/8 могут быть элюированы из колонки HIC с использованием градиента сульфата натрия в 20 мМ Трис, pH 8,0. Ат против ANGPTL3/8 могут быть дополнительно очищены с помощью эксклюзионной хроматографии с использованием колонки Superdex 200 (GE Healthcare) с изократическим элюированием в ФСБ, pH 7,4.

[73] Описанные в данном документе соединения получают данным или подобным способом, что может быть легко определено специалистом в данной области техники.

[74] Мышей, несущих переменные домены легкой и тяжелой цепей человека, иммунизируют комплексом ANGPTL3/8, описанным выше, и выделяют отдельные антиген-специфические В-клетки с помощью FACS с использованием ANGPTL3/8 (положительный) и ANGPTL3 (отрицательный) в качестве маркеров. ДНК переменной области тяжелой цепи и легкой цепи выделяют из отдельных В-клеток с помощью ПЦР и клонируют в векторах экспрессии IgG. После трансфекции супернатанты клеток СНО исследуют на связывающую активность.

ПРИМЕРЫ

[75] Нижеследующие неограничивающие примеры предложены в целях иллюстрации, а не ограничения.

[76] Пример 1: Создание Комплексов ANGPTL3/8

[77] Экспрессия ANGPTL3 и ANGPTL8: нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность ANGPTL3 человека, линкер и FLAG-метку (SEQ ID NO:17) вставляют в вектор экспрессии млекопитающих, содержащий промотор ЦМВ. Аналогичным образом, нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность ANGPTL8 человека, сигнальный пептид каппа-цепи IgG мыши, HIS-метку, сайт расщепления зрелого человеческого сывороточного альбумина (ЧСА, HSA)-PreScission® (SEQ ID NO:18) вставляют в вектор экспрессии млекопитающих, содержащий промотор ЦМВ. Экспрессия белка осуществляется посредством временной котрансфекции обоих описанных выше векторов экспрессии в клетках HEK293F, культивируемых в бессывороточной среде. Культуральную среду собирают через 5 дней после трансфекции и хранят при 4°C для последующей очистки белка.

[78] Очистка белка: очистку белка проводят при 4°C, при этом 4 л культуральной среды дополняют 1 М Трис-HCl (pH 8,0) и 5 М NaCl до конечной концентрации 25 мМ и 150 мМ, соответственно. Затем среду инкубируют со 150 мл смолы Ni-NTA (Qiagen) в течение ночи. Смолу набивают в колонку и промывают Буфером А (50 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 0,3 М NaCl). Белок элюируют градиентом имидазола 0-300 мМ в буфере А. Фракции, содержащие HIS-ЧСА-ANGPTL8/ANGPTL3-Метка, объединяют, концентрируют и загружают в колонку HiLoad® Superdex® 200 (GE Healthcare Biosciences) и элюируют буфером А. Фракции, содержащие HIS-ЧСА-ANGPTL8/ANGPTL3-Метка, снова объединяют, концентрируют и расщепляют протеазой PreScission® (GE Healthcare Biosciences) для удаления ЧСА из слитого белка HIS-ЧСА-ANGPTL8. Образец белка, расщепленного PreScission®, загружают в колонку HiLoad® Superdex® 200 и элюируют буфером для хранения (20 мМ HEPES, pH 8,0, 150 мМ NaCl). Фракции, содержащие комплекс ANGPTL3/8, объединяют и концентрируют, при этом концентрацию белка определяют с использованием способа Брэдфорда. Комплекс ANGPTL3/8 делят на аликвоты и хранят при -80°C до дальнейшего использования.

[79] Анализ активности ЛПЛ. Анализ EnzCheck® LPL проводят в соответствии с инструкциями производителя (ThermoFisher Scientific). Вкратце, комплексы ANGPTL3

и ANGPTL3/8 серийно разводят в питательной среде и заменяют среду ЛПЛ-клетками в течение 1 часа инкубации. Затем к ЛПЛ-экспрессирующим клеткам добавляют липазный субстрат EnzCheck® (ELS) и инкубируют в течение 30 минут. Флуоресценцию измеряют при 482 нм/515 нм (возбуждение/испускание, соответственно). Рассчитывают % ингибирующего воздействия ANGPTL3 и 3/8 на LPL.

[80] Результаты:

[81] В Таблице 1 представлен выход комплексного белка ANGPTL3/8 на различных стадиях очистки/концентрирования.

[82] Таблица 1: Выход Комплексного Белка ANGPTL3/8.

Старт (L)	Выход после Смолы Ni-NTA (мг)	Выход после 1 ^й Колонки Superdex® 200 (мг)	Выход после 2 ^й колонки Superdex® 200 (мг)
4	105	47	12

[83] Подобным образом на Фиг. 1 представлен 4-20% TG TGX гель, окрашенный Кумасси, с нанесенным образцом очищенного и концентрированного комплекса ANGPTL3/8, полученного из колонок, что подтверждает, что комплексы формируются/собираются. После очистки и концентрирования ANGPTL3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, а ANGPTL8 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

[84] В анализе ЛПЛ EC₅₀ ANGPTL3 составляет 21,5 нМ, тогда как EC₅₀ комплекса ANGPTL3/8 составляет 0,54 нМ, что подтверждает функциональность комплексов.

[85] Пример 2: Анализ

[86] Анализ ИФА с одноточечной калибровкой (ИФАОТК, SPE): селективность связывания Ат с комплексом ANGPTL3/8, свободным ANGPTL3 или свободным ANGPTL8 первоначально проверяется с использованием стандартных анализов ИФА в одноточечном формате. Вкратце, аналитические планшеты покрывают Ат против Fc человека в концентрации 2 мкг/мл и затем блокируют казеином. Затем IgG, секретируемый в супернатант после экспрессии в клетках CHO, захватывается на аналитическом планшете. Биотинилированный антиген добавляют в концентрации 25 нМ, чтобы обеспечить связывание Ат/антиген. Комплексы Ат/антиген детектируют после добавления нейтравидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и субстрата щелочной фосфатазы и последующего измерения оптической плотности при 560 нм. Положительное связывание определяется сигналом, более чем в 3 раза превышающим фоновый сигнал, характерный при отсутствии связывания.

[87] Анализ ИФА: селективность связывания Ат с комплексом ANGPTL3/8, свободным ANGPTL3 или свободным ANGPTL8 проверяется с использованием стандартных анализов ИФА. Вкратце, аналитические планшеты покрывают Ат против Fc человека в концентрации 2 мкг/мл и затем блокируют казеином. Затем Ат из супернатанта клеток CHO, после экспрессии в клетках CHO, захватывается на аналитическом планшете, и в результате получается концентрация Ат, равная 2 мкг/мл. Биотинилированный антиген (ANGPTL3, ANGPTL8 или комплекс ANGPTL3/8) добавляют в различных концентрациях путем серийных разведений, чтобы обеспечить связывание Ат/антиген. Комплексы Ат/антиген детектируют после добавления нейтравидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и субстрата щелочной фосфатазы и последующего измерения оптической плотности при 560 нм.

[88] Таблица 2: Селективность Связывания Ат с Комплексом ANGPTL3/8, ANGPTL8 и ANGPTL3 в Анализе ИФАОТК.

	Связывание Комплекса ANGPTL3/8	Связывание ANGPTL8	Связывание ANGPTL3
Ат	2,302 (положительное)	0,087 (отрицательное)	0,074 (отрицательное)
D31S	0,928	0,072	0,058
D33A	0,898	0,118	0,076
D33T	0,661	0,070	0,060
M56T	0,775	0,085	0,060
E99Q	1,538	0,100	0,083
Средний Фоновый Сигнал при Отсутствии Связывания	0,09	0,07	0,08
3 x Фон	0,27	0,21	0,24

Значения представляют собой оптическую плотность (OD) при 560 нм, а фоновый сигнал, характерный при отсутствии связывания, по всем исследуемым планшетам в среднем отражается в строке «Фоновый сигнал». Этот отрицательный контроль демонстрирует фоновый сигнал в отсутствии Ат.

[89] В анализе ИФАОТК Ат, имеющее LC с последовательностью SEQ ID NO:5 и HC последовательностью SEQ ID NO:6, демонстрирует положительное связывание с комплексом ANGPTL3/8 человека и отрицательное связывание с ANGPTL8 человека и ANGPTL3 человека. Ат с вариантами LC, имеющими мутацию D31S (SEQ ID NO:21), мутацию D33A (SEQ ID NO:22), мутацию D33T (SEQ ID NO:24), мутацию M56T (SEQ ID NO:24) или мутацию E99Q (SEQ ID NO:25) и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, аналогичным образом демонстрируют связывание с комплексом ANGPTL3/8 человека и отрицательное связывание с ANGPTL8 человека и ANGPTL3 человека.

[90] Таблица 3: Анализ ИФА Связывания Ат при Различных Концентрациях ANGPTL3, ANGPTL8 и Комплекса ANGPTL3/8.

Конц. антигена [нМ]	hANGPTL8		hANGPTL3		комплекс hANGPTL3/8	
	Ат	Контроль	Ат	Контроль	Ат	Контроль
100	0,072	0,076	0,081	0,091	2,705	0,063
33,3	0,050	0,060	0,052	0,063	2,411	0,056
11,1	0,045	0,051	0,046	0,052	1,708	0,047
3,70	0,051	0,048	0,046	0,052	1,042	0,046
1,23	0,043	0,048	0,043	0,052	0,510	0,046
0,412	0,046	0,050	0,043	0,067	0,231	0,046
0,137	0,047	0,053	0,048	0,055	0,110	0,044
0,046	0,051	0,054	0,060	0,069	0,078	0,053

Контроль представляет собой буфер без Ат.

[91] Ат, имеющее LC с последовательностью SEQ ID NO:5 и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, демонстрирует положительное связывание с комплексом ANGPTL3/8 человека в зависимости от его концентрации и отсутствие детектируемого связывания с ANGPTL8 человека и ANGPTL3 человека вплоть до концентрации антигена 100 нМ в данном анализе (Таблица 3).

[92] В дополнение к вышеупомянутому Ат против комплекса ANGPTL3/8, имеющего LC с последовательностью SEQ ID NO:5 и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, Ат с вариантами LC, имеющими мутацию D31S (SEQ ID NO:21), мутацию D33A (SEQ ID NO:22) или мутацию E99Q (SEQ ID NO:25) и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, исследуются и аналогичным образом демонстрируют положительное связывание с комплексом ANGPTL3/8 человека в зависимости от концентрации и не демонстрируют связывание с ANGPTL8 человека и ANGPTL3 человека вплоть до концентрации антигена 100 нМ в данном анализе (Таблицы 4-6).

[93] Таблица 4: Анализ ИФА Связывания варианта Ат D31S при Различных Концентрациях ANGPTL3, ANGPTL8 и Комплекса ANGPTL3/8.

Конц. антигена [нМ]	hANGPTL8		hANGPTL3		комплекс hANGPTL3/8	
	Ат	Контроль	Ат	Контроль	Ат	Контроль
100	0,098	0,076	0,084	0,081	2,471	0,092
33,3	0,063	0,065	0,069	0,064	2,226	0,068
11,1	0,062	0,059	0,062	0,062	1,735	0,053
3,70	0,056	0,055	0,060	0,057	1,134	0,049
1,23	0,058	0,049	0,059	0,058	0,575	0,048
0,412	0,062	0,049	0,058	0,057	0,234	0,047
0,137	0,080	0,077	0,057	0,076	0,137	0,068
0,046	0,096	0,085	0,060	0,064	0,149	0,075

[94] Таблица 5: Анализ ИФА Связывания варианта Ат D33A при Различных Концентрациях ANGPTL3, ANGPTL8 и Комплекса ANGPTL3/8.

Конц. антигена [нМ]	hANGPTL8		hANGPTL3		комплекс hANGPTL3/8	
	Ат	Контроль	Ат	Контроль	Ат	Контроль
100	0,078	0,076	0,082	0,081	2,388	0,092
33,3	0,049	0,065	0,067	0,064	2,179	0,068
11,1	0,048	0,059	0,060	0,062	1,635	0,053
3,70	0,048	0,055	0,056	0,057	1,040	0,049
1,23	0,049	0,049	0,057	0,058	0,491	0,048
0,412	0,047	0,049	0,056	0,057	0,196	0,047
0,137	0,053	0,077	0,062	0,076	0,101	0,068
0,046	0,074	0,085	0,062	0,064	0,111	0,075

[95] Таблица 6: Анализ ИФА Связывания варианта Ат E99Q при Различных Концентрациях ANGPTL3, ANGPTL8 и Комплекса ANGPTL3/8.

Конц. антигена [нМ]	hANGPTL8		hANGPTL3		комплекс hANGPTL3/8	
	Ат	Контроль	Ат	Контроль	Ат	Контроль
100	0,098	0,076	0,084	0,081	2,471	0,092
33,3	0,063	0,065	0,069	0,064	2,226	0,068
11,1	0,062	0,059	0,062	0,062	1,735	0,053
3,70	0,056	0,055	0,060	0,057	1,134	0,049
1,23	0,058	0,049	0,059	0,058	0,575	0,048
0,412	0,062	0,049	0,058	0,057	0,234	0,047
0,137	0,080	0,077	0,057	0,076	0,137	0,068
0,046	0,096	0,085	0,060	0,064	0,149	0,075

[96] Пример 3: Аффинность Рецептора *In Vitro*

[97] Кинетику связывания можно определить с использованием прибора Biacore® T200 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.; Пискатауэй, Нью-Джерси). Поверхность сенсорного чипа CM4 может быть подготовлена ковалентным связыванием человеческого Fab Binder (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). Кинетические эксперименты можно проводить при температуре около 25°C в рабочем буфере HBSEP+, 0,01% БСА при pH 7,4. Ат могут быть захвачены на поверхности чипа, и серии концентраций комплекса ANGPTL3/8 мыши, яванской макаки или человека могут быть введены на поверхность чипа со скоростью около 50 мкл/мин в течение около 240 секунд с временем диссоциации около 800 секунд. Для определения кинетических параметров (*например*, k_a , k_d , K_D) данные были подвергнуты двойной нормализации и приведены в соответствие

модели связывания 1:1 с использованием оценочного программного обеспечения Biacore T200 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). В Таблице 7 ниже представлено связывание Ат против комплекса ANGPTL3/8, имеющего LC с последовательностью SEQ ID NO:5 и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, с различными комплексами ANGPTL3/8 из разных видов при pH 7,4 и температуре 25°C.

[98] Таблица 7: Связывание Ат с Кросс-Видовыми Комплексами ANGPTL3/8 при pH 7,4 и Температуре 25°C.

Связывание Комплекса ANGPTL3/8 с Ат	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)	SD	N
Мышь	$4,75 \times 10^5$	$1,72 \times 10^{-4}$	$3,66 \times 10^{-10}$	$6,19 \times 10^{-11}$	3
Яванская макака	$4,91 \times 10^5$	$9,91 \times 10^{-5}$	$2,13 \times 10^{-10}$	$6,30 \times 10^{-11}$	3
Человек	$4,77 \times 10^5$	$6,31 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-10}$	$2,69 \times 10^{-11}$	2

[99] В дополнение к вышеупомянутому Ат против комплекса ANGPTL3/8, имеющего LC с последовательностью SEQ ID NO:5 и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, Ат с вариантами LC, имеющими мутацию D31S (SEQ ID NO:21), мутацию D33A (SEQ ID NO:22) или мутацию E99Q (SEQ ID NO: 25) и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, исследовали на связывание с различными комплексами ANGPTL3/8 из разных видов при pH 7,4 и температуре 25°C (Таблицы 8-10).

[100] Таблица 8: Связывание Варианта Ат D31S с Кросс-Видовыми Комплексами ANGPTL3/8 при pH 7,4 и Температуре 25°C.

Связывание Комплекса ANGPTL3/8 с Ат D31S	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)	SD	N
Мышь	$4,96 \times 10^5$	$1,08 \times 10^{-4}$	$2,18 \times 10^{-10}$	$1,88 \times 10^{-11}$	3
Яванская макака	$4,62 \times 10^5$	$1,68 \times 10^{-4}$	$3,65 \times 10^{-10}$	$1,50 \times 10^{-11}$	3
Человек	$4,97 \times 10^5$	$5,75 \times 10^{-5}$	$1,16 \times 10^{-10}$	$1,91 \times 10^{-11}$	3

[101] Таблица 9: Связывание Варианта Ат D33A с Кросс-Видовыми Комплексами ANGPTL3/8 при pH 7,4 и Температуре 25°C.

Связывание Комплекса ANGPTL3/8 с Ат D33A	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)	SD	N
Мышь	$5,15 \times 10^5$	$3,47 \times 10^{-4}$	$6,80 \times 10^{-10}$	$7,07 \times 10^{-11}$	3
Яванская макака	$4,35 \times 10^5$	$2,65 \times 10^{-4}$	$6,09 \times 10^{-10}$	$1,21 \times 10^{-11}$	3
Человек	$4,57 \times 10^5$	$9,19 \times 10^{-5}$	$2,01 \times 10^{-10}$	$1,75 \times 10^{-11}$	3

[102] Таблица 10: Связывание Варианта Ат E99Q с Кросс-Видовыми Комплексами ANGPTL3/8 при pH 7,4 и Температуре 25°C.

Связывание Комплекса ANGPTL3/8 с Ат E99Q	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)	SD	N
Мышь	$5,96 \times 10^5$	$1,51 \times 10^{-4}$	$2,54 \times 10^{-10}$	$1,79 \times 10^{-11}$	3
Яванская макака	$6,20 \times 10^5$	$7,23 \times 10^{-5}$	$1,16 \times 10^{-10}$	$8,58 \times 10^{-12}$	3
Человек	$6,74 \times 10^5$	$3,26 \times 10^{-5}$	$4,84 \times 10^{-11}$	$6,50 \times 10^{-12}$	3

[103] Пример 4: Анализ Функциональной Активности ЛПЛ *In Vitro*

[104] Биотест на основе клеток используется для оценки способности Ат против комплекса ANGPTL3/8, имеющего LC с последовательностью SEQ ID NO:5 и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, подавлять ингибирование ЛПЛ активности очищенным белком ANGPTL3/8. Ингибирующая активность Ат против ANGPTL3/8 определялась с использованием липазного субстрата EnzChek™ (ThermoFisher).

Использовались клеточные линии НЕК293, экспрессирующие ЛПЛ человека, яванской макаки, мыши или крысы, и очищенный белок ANGPTL3/8 человека, яванской макаки, мыши или крысы. Генерация НЕК293-ЛПЛ включает линию эмбриональных клеток человека, стабильно экспрессирующую ЛПЛ человека, которую получают (НЕК293-
 5 huLPL) с использованием стандартных способов. Вкратце, ЛПЛ человека клонируют в плазмиду лентивируса с промотором ЦМВ и устойчивостью к бластицидину. Плазмиду используют для создания лентивируса ЛПЛ человека с использованием смеси ViraPower Packaging Mix (Invitrogen). Клетки НЕК293 инкубируют с лентивирусом ЛПЛ и отбирают клоны, устойчивые к бластицидину. Клон выбирают после подтверждения экспрессии
 10 мРНК ЛПЛ человека с помощью количественной ПЦР и активности ЛПЛ с помощью использования субстрата EnzChek™. Этот процесс повторяется для ЛПЛ яванской макаки, мыши и крысы.

[105] Способы модифицированы по сравнению со способами, описанными в Basu *et al.* (Basu *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52:826-832): (а) Клетки НЕК293-ЛПЛ добавляют на
 15 половину площади 96-луночного планшета, покрытого Поли-Д-Лизином А (человека), В (яванской макаки), С (мышь) или D (крысы) при плотности 25000 клеток/луночку и инкубируют в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Ат серийно разводят девять раз от исходной концентрации стокового раствора для получения десятикратной CRC, а затем добавляют к очищенным белкам ANGPTL3/8 (при концентрации IC₈₀ 0,42 нМ
 20 для человека, 0,38 нМ для яванской макаки, 0,13 нМ для мыши или 0,81 нМ для крысы) в 96-луночных планшетах Е (человек), F (яванская макака), G (мышь) или H (крыса).

[106] Среды для клеток НЕК293-ЛПЛ в планшетах А, В, С и D заменяют смесями ANGPTL3/8 и Ат из планшета Е, F, G и H, соответственно, и инкубируют 1 час при 37°C,
 25 5% CO₂. 10 мкл субстрата липазы EnzChek™ (приготовленного в концентрации 5 мкМ в 0,05% Zwittergent (3-(N, N-диметилдоктадециламмоний)пропансульфонат) (Sigma)) добавляют к клеткам, смеси ANGPTL3/8 и Ат в планшетах А, В, С и D. Планшетный анализатор используется для измерения флуоресценции при длине волны Возбуждения 482 нм и Испускания 515 нм с ограничивающим фильтром 495 нм. Между временными
 30 точками планшеты инкубируют при 37°C, 5% CO₂. Относительная флуоресценция (прямо пропорциональная активности ЛПЛ) рассчитывается путем вычитания сигнала на 1 мин из сигнала на 31 мин. Эффективная концентрация, при которой Ат восстанавливает активность ЛПЛ на 50% (EC₅₀), рассчитывается с использованием Excel Fit. Концентрации EC₅₀ представлены в Таблице 11.

[107] Процент дерепрессии рассчитывается следующим образом:
 = (RFU - RFU(MIN))/(RFU(MAX) - RFU(MIN)) x 100,
 где MAX=только клетки (ЛПЛ) и MIN=клетки (ЛПЛ) + ANGPTL3/8 КС
 (кондиционированная среда).

[108] Ат обычно имеет низкий уровень EC₅₀ и, таким образом, способно подавлять
 40 дерепрессировать ЛПЛ. Ат также имеет подходящий % максимальной дерепрессии ЛПЛ.

[109] Таблица 11: EC₅₀ Ат и % Максимальной Дерепрессии ЛПЛ для ЛПЛ Человека, Яванской Макаки, Мыши и Крысы, а также Комплекса ANGPTL3/8 Человека, Яванской
 45 Макаки, Мыши и Крысы.

ЛПЛ и ANGPTL3/8 Разных Видов	EC ₅₀ Ат (нМ)	% Макс. Дерепрессии ЛПЛ
ЛПЛ человека и ANGPTL3/8 человека	0,28	102%
ЛПЛ яванской макаки и ANGPTL3/8 яван-	1,31	96%

ской макаки		
ЛПЛ мыши и ANGPTL3/8 мыши	1,38	103%
ЛПЛ крысы и ANGPTL3/8 крысы	2,77	105%

[110] В дополнение к вышеупомянутому Ат против комплекса ANGPTL3/8, имеющего LC с последовательностью SEQ ID NO:5 и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, Ат с вариантами LC, имеющими мутацию D31S (SEQ ID NO:21), мутацию D33A (SEQ ID NO:22) мутацию D33T (SEQ ID NO:23) или мутацию E99Q (SEQ ID NO: 25) и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, исследовали на способность подавлять ингибирование ЛПЛ активности очищенным белком ANGPTL3/8 (Таблица 12).

[111] Таблица 12: EC₅₀ Варианта Ат и % Макс. Дерепрессии ЛПЛ для ЛПЛ Человека и Мыши и Комплекса ANGPTL3/8 Человека и Мыши.

ЛПЛ и ANGPTL3/8 Раз-ных Видов	D31S EC ₅₀ Ат (нМ), % Макс. Дерепрессии ЛПЛ	D33A EC ₅₀ Ат (нМ), % Макс. Дерепрессии ЛПЛ	D33T EC ₅₀ Ат (нМ), % Макс. Дерепрессии ЛПЛ	E99Q EC ₅₀ Ат (нМ), % Макс. Дерепрессии ЛПЛ
ЛПЛ человека и ANGPTL3/8 человека	0,86, 106%	1,14, 103%	1,56, 105%	0,49, 106%
ЛПЛ мыши и ANGPTL3/8 мыши	1,79, 110%	4,07, 106%	4,55, 114%	1,65, 110%

[112] Пример 5: Ответ Триглицеридов *In Vivo*

[113] Воздействие Ат против комплекса ANGPTL3/8, имеющего LC с последовательностью SEQ ID NO:5 и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, на уровень ТГ в сыворотке оценивается на мышах, трансгенных по huCETP и huApolipoprotein A1 (а). У мышей берут кровь и выделяют сыворотку перед началом эксперимента. ТГ измеряется в образцах сыворотки с помощью химического анализатора Cobas® (Roche). Животные были разделены на 5 групп по 20 особей в каждой, чтобы получить группы с аналогичными средними значениями ТГ в сыворотке. Затем каждую группу из 20 особей подразделяют на 4 группы по 5 особей с аналогичными средними значениями триглицеридов в сыворотке. Ат вводят мышам путем однократной подкожной инъекции в дозе 1 мг/кг (n=20), 3 мг/кг (n=20), 10 мг/кг (n=20) или 30 мг/кг (n=20) 4 отдельным группам животных. Контрольное антигенсвязывающее мАт, соответствующее нуль-изотипу, вводят путем однократной подкожной инъекции в дозе 30 мг/кг (n=20) пятой группе животных.

[114] Забор крови у животных делают через 1 час (n=5), 8 часов (n=5), 1 день (n=5), 2 дня (n=5), 3 дня (n=5), 7 дней (n=5), 14 дней (n=5) и 21 день (n=5) после введения Ат. Кровь отбирают у животных подгруппы А через 1 час и 3 дня. Кровь отбирают у животных подгруппы В через 8 часов и 7 дней. Кровь отбирают у животных подгруппы С через 1 день и 14 дней. Кровь отбирают у животных подгруппы D через 2 дня и 21 день. Сыворотку готовили из крови, и уровни ТГ в сыворотке измеряли с помощью клинического химического анализатора Cobas® (Roche). Процентное изменение ТГ от согласованного по времени изотипического контроля рассчитывают для каждой дозы Ат в каждый момент времени. Расчет процентного изменения составляет [(Rх триглицерид сыворотки - триглицерид сыворотки изотипического контроля согласованного по времени)/(триглицерид сыворотки изотипического контроля согласованного по времени)] x 100. Данные представлены в Таблице 13.

[115] Таблица 13: Процент Снижения Уровня ТГ с Помощью Ат По Сравнению с Контролем IgG При Различных Дозах Ат в Разные Моменты Времени.

Время После Введе-	1 час	8 часов	1 день	2 дня	3 дня	7 дней	14 дней	21 день
--------------------	-------	---------	--------	-------	-------	--------	---------	---------

ния Дозы								
1 мг/кг	-22	-33	-76*	-66*	-61*	41	6,4	-20
3 мг/кг	-26	-71*	-84*	-77*	-86*	-25	19,7	-19
10 мг/кг	-27	-62*	-87*	-89*	-88*	-88*	-64,4*	-28
30 мг/кг	-23	-74*	-92*	-87*	-93*	-93*	-89,1*	-75*

5 Тест Даннета использовался для каждого набора данных для сравнения каждой экспериментальной группы с согласованным по времени контролем, и значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Группы, статистически значимые по сравнению с соответствующими по времени контролями, обозначены в таблице знаком (*).

10 [116] Эффективность Ат, имеющего LC с последовательностью SEQ ID NO:5 и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, при снижении ТГ является подходящей, начиная с Дня 1, и благоприятное влияние сохраняется до Дня 21.

15 [117] В дополнение к вышеупомянутому Ат против комплекса ANGPTL3/8, имеющего LC с последовательностью SEQ ID NO: 5 и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, Ат с вариантами LC, имеющими мутацию D31S (SEQ ID NO:21), мутацию D33A (SEQ ID NO:22) или мутации E99Q (SEQ ID NO:25) и HC с последовательностью SEQ ID NO:6, также исследовались для оценки изменения уровня ТГ по сравнению с контролем IgG у мышей (Таблица 14).

20 [118] Таблица 14: Процент Снижения Уровня ТГ По Сравнению с Контролем IgG При Различных Дозах Вариантов Ат в Разные Моменты Времени.

Время после введения дозы	1 день	7 дней	15 дней	21 день
D31S 3 мг/кг	-83*	-38*	-25	-12
D31S 10 мг/кг	-90*	-91*	-37*	-21
D33A 3 мг/кг	-74*	-77*	-34*	-10
D33A 10 мг/кг	-78*	-86*	-76*	-60*
E99Q 3 мг/кг	-82*	-49*	-5	15
E99Q 10 мг/кг	-86*	-91*	-61*	6

30 Тест Даннета использовался для каждого набора данных для сравнения каждой экспериментальной группы с согласованным по времени контролем, и значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Группы, статистически значимые по сравнению с соответствующими по времени контролями, обозначены в таблице знаком (*).

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[119] Нижеследующие нуклеотидные и аминокислотные последовательности упоминаются в раскрытии выше и приводятся ниже для справки.

35 [120] SEQ ID NO:1

40 atatatagagttagaagtctaggtctgctccagaagaaacagttccacgttgctgaaattgaaatcaagataaaaatgttcacaatt
aagctccttcttttattgtctctagttatttctcagaattgatcaagacaattcatcttattctctatctccagagccaaaatcaagattg
ctatgtagacgatgtaaaaatttagccaatggcctcctcagttgggacatggctttaaagactttgtccataagacgaagggccaaat
tgacatattcaaaaactcaacatattgatcagctttttatgatctatcgtgcaaacagtgaaatcaagaagaagaaaaggaactgaga
45 agaactacataaaactacaagtcaaaaatgaagaggtaaagaatgtcactgaactcaactcaaaactgaaagcctcctagaagaaaa
aattctactcaasaaaagtgaatatttagaagagcaactaactaacttaattcaaaaatcaacctgaaactccagaacaccagaagtaac
ttactttaaacttttagaagaaacaagataatagcatcaaaccttctccagaccgtggaagaccaataaaacattaacaaacagca
tagtcaaaaatagaatagaaatcagctcagaaggactagttatcaagaaccacagaaatttctctatctccaagccaagagcaccaa
gaaactccttctcagttgaatgaaataagaaatgtaaacatgatggcattcctgctgaatgtaccaccattataacagagggtgaacat
50 acaagtggcatgtatgccatcagaccagcaactcctcaagttttcatgtctactgtgatgtatcaggtagtcattgacattaattcaacat
cgaatagatggatcacaaaactcaatgaaacgtgggagaactacaaataggtttggaggcttgatggagaattttggtggcctaga
gaagataactccatagtgaaagcaatcaattatgtttacgaattgagttggaagactgaaagacaacaacattatattgaatattcttttac
ttgggaaatcacgaaaccaactatagctacatctagttgcgattactggcaatgtccccaatgcaatcccggaaaacaagatttggtgttt

[133] SEQ ID NO:14

TFSGFSL SISGVGVG

[134] SEQ ID NO:15

LIYRNDDKRYSPSLKS

5 [135] SEQ ID NO:16

ARTYSSG WYGNWFDP

[136] SEQ ID NO:17

MFTIKLLL FIVPLVISSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKD
 FVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLE
 10 LNSKLESLL EEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKTFVEKQDNSIKDLLQ
 TVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDG
 IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWEN
 YKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLG NHETNYTL
 HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWHDEC GENNLNGK
 15 YNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEAAADYKDDDDK

[137] SEQ ID NO:18

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDHHHHHHDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFA
 QYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE
 MADCCAQKQEPERNECF LQHKKDDNP NLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAR
 20 RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CAS
 LQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRAD
 LAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNY
 AEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEF
 KPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK
 25 CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD
 ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
 FVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPLEVL FQ
 GPGRAAPMGGPELAQHEELTLLFHGTLQLGQALNGVYRTTEGRLTKARNSLGLYGR TI
 ELLGQEVSRGRDAAQELRASLLETQMEEDILQLQAEATAEVLGEVAQAQKVL RDSVQR
 30 LEVQLRSAWLGPAYREFEVLKAHADKQSHILWALTGHVQRQRREMVAQQHRLRQIQE
 RLHTAALPA

[138] SEQ ID NO:19

SRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQK
 LNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLL EEKILLQ
 35 QKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHS
 QIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTS
 GMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWL
 GLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLG NHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE
 NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWHDEC GENNLNGKY NKPRAKSKPERRR
 40 GLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEAAADYKDDDDK

[139] SEQ ID NO:20

GPGRAAPMGGPELAQHEELTLLFHGTLQLGQALNGVYRTTEGRLTKARNSLGLYGR
 TIELLGQEVSRGRDAAQELRASLLETQMEEDILQLQAEATAEVLGEVAQAQKVL RDSV
 QRLEVQLRSAWLGPAYREFEVLKAHADKQSHILWALTGHVQRQRREMVAQQHRLRQI
 45 QERLHTAALPA

[140] SEQ ID NO:21

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPA SISRSSQSLLSSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYMLSY
 RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQRIEFPLTFGGG TKVEIKRTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
YLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[141] SEQ ID NO:22

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLDSADGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYMLS
5 YRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQRIEFPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[142] SEQ ID NO:23

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLDSTDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYMLS
10 YRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQRIEFPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[143] SEQ ID NO:24

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTL
15 RASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQRIEFPLTFGGGTKVEIKRTVAA
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
YLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[144] SEQ ID NO:25

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYMLS
20 YRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQRIQFPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ
- 25 <120> АНТИТЕЛЯ ПРОТИВ КОМПЛЕКСА ANGPTL3/8 И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
- <130> X21977
- <150> US 62/783,260
- <151> 2018-12-21
- <150> US 62/783,265
- 30 <151> 2018-12-21
- <160> 25
- <170> PatentIn версия 3.5
- <210> 1
- <211> 2951
- 35 <212> ДНК
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

40	atatatagag ttaagaagtc taggtctgct tccagaagaa aacagttcca cgttgcttga	60
	aattgaaaat caagataaaa atgttcacaa ttaagctcct tctttttatt gttcctctag	120
	ttatttcctc cagaattgat caagacaatt catcatttga ttctctatct ccagagccaa	180
	aatcaagatt tgctatgta gacgatgtaa aaattttagc caatggcctc cttcagttgg	240
	gacatggtct taaagacttt gtccataaga cgaagggcc aattaatgac atatttcaaa	300
	aactcaacat atttgatcag tctttttatg atctatcgct gcaaaccagt gaaatcaag	360
	aagaagaaaa ggaactgaga agaactacat ataaactaca agtcaaaaat gaagaggtaa	420
45	agaatatgct acttgaactc aactcaaaaac ttgaaagcct cctagaagaa aaaattctac	480
	ttcaacaaaa agtgaaatat ttagaagagc aactaactaa cttaatcaa aatcaacctg	540
	aaactccaga acaccagaa gtaacttcac ttaaaaacttt tgtagaaaa caagataata	600
	gcatcaaaga ccttctccag accgtggaag accaatataa acaattaaac caacagcata	660

RU 2791034 C2

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45
 Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 50 55 60
 5 Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 65 70 75 80
 Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 85 90 95
 10 Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110
 Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125
 Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
 130 135 140
 15 Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
 165 170 175
 Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
 20 180 185 190
 His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
 195 200 205
 Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
 210 215 220
 25 Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
 225 230 235 240
 Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255
 Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
 30 260 265 270
 Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285
 Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
 290 295 300
 35 Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320
 Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
 325 330 335
 Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
 40 340 345 350
 Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
 355 360 365
 Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
 370 375 380
 45 Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415

RU 2791034 C2

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
 420 425 430
 Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
 435 440 445
 5 Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
 450 455 460
 <210> 3
 <211> 888
 <212> ДНК
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 ataccttaga ccctcagtca tgccagtgcc tgctctgtgc ctgctctggg ccctggcaat 60
 ggtgaccgg cctgcctcag cggcccccat gggcggccca gaactggcac agcatgagga 120
 gctgaccctg ctcttccatg ggaccctgca gctggggccag gccctcaacg gtgtgtacag 180
 15 gaccacggag ggacggctga caaaggccag gaacagcctg ggtctctatg gccgcacaat 240
 agaactcctg gggcaggagg tcagccgggg cgggatgca gcccaggaac ttcgggcaag 300
 cctgttgagg actcagatgg aggaggatat tctgcagctg caggcagagg ccacagctga 360
 ggtgctgggg gaggtggccc aggcacagaa ggtgctacgg gacagcgtgc agcggctaga 420
 agtccagctg aggagcgcct ggctggggccc tgcctaccga gaatttgagg tcttaaaggc 480
 20 tcacgctgac aagcagagcc acatcctatg ggccctcaca ggccacgtgc agcggcagag 540
 gcgggagatg gtggcacagc agcatcggct gcgacagatc caggagagac tccacacagc 600
 ggcgctccca gcctgaatct gcctggatgg aactgaggac caatcatgct gcaaggaaca 660
 cttccacgcc cagtgaggcc cctgtgcagg gaggagctgc ctgttactg ggatcagcca 720
 gggcgccggg ccccacttct gagcacagag cagagacaga cgcaggcggg gacaaaggca 780
 25 gaggatgtag cccattggg gaggggtgga ggaaggacat gtaccctttc atgcctacac 840
 acccctcatt aaagcagagt cgtggcatct caaaaaaaaa aaaaaaaaa 888
 <210> 4
 <211> 198
 <212> БЕЖОК
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Pro Val Pro Ala Leu Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Val Thr
 5 10 15
 Arg Pro Ala Ser Ala Ala Pro Met Gly Gly Pro Glu Leu Ala Gln His
 35 20 25 30
 Glu Glu Leu Thr Leu Leu Phe His Gly Thr Leu Gln Leu Gly Gln Ala
 35 40 45
 Leu Asn Gly Val Tyr Arg Thr Thr Glu Gly Arg Leu Thr Lys Ala Arg
 50 55 60
 40 Asn Ser Leu Gly Leu Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu Leu Gly Gln Glu
 65 70 75 80
 Val Ser Arg Gly Arg Asp Ala Ala Gln Glu Leu Arg Ala Ser Leu Leu
 85 90 95
 Glu Thr Gln Met Glu Glu Asp Ile Leu Gln Leu Gln Ala Glu Ala Thr
 45 100 105 110
 Ala Glu Val Leu Gly Glu Val Ala Gln Ala Gln Lys Val Leu Arg Asp
 115 120 125
 Ser Val Gln Arg Leu Glu Val Gln Leu Arg Ser Ala Trp Leu Gly Pro

RU 2 791 034 C2

130 135 140
Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala His Ala Asp Lys Gln Ser
145 150 155 160
His Ile Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg Gln Arg Arg Glu
5 165 170 175
Met Val Ala Gln Gln His Arg Leu Arg Gln Ile Gln Glu Arg Leu His
180 185 190
Thr Ala Ala Leu Pro Ala
195
10 <210> 5
<211> 220
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
15 <223> Синтетическая конструкция
<400> 5
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 20 25 30
Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Met Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
25 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
30 100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
35 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
40 180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220
45 <210> 6
<211> 449
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

gtggaatcca aatacggacc gccatgtccg ccctgccccg ccccggaagc tgccggggga 720
cccagcgtgt tcctggtccc acctaagccg aaggacactc tgatgatctc aaggactccc 780
gaagtcactt gcgtggtcgt ggacgtgtcc caggaggacc ccgaagtcca gtttaattgg 840
tacgtggatg gtgtcagagt ccacaacgcc aagaccaagc ctgcgagga acagttcaat 900
5 tccacctacc gggtcgtgtc cgtcctgacc gtgctgcatc aggactggct gaacggaaag 960
gagtacaagt gcaaagtgtc caacaagggg ctcccttctt ccatcgaaaa gaccatcagc 1020
aaggccaagg gccagcctcg cgaaccacaa gtctacaccc tgcccccatc gcaagaggaa 1080
atgaccaaga accaagtgtc gctgacatgc ctctcaagg gattctaccc gtcggatatt 1140
gcggtggaat gggagtccaa cggacagccc gagaacaact acaagaccac cccgccggtg 1200
10 ttggactccg acggctcctt tttcctgtac tcccggctca ctgtggacaa gtcgcggtgg 1260
caggagggga acgtgttctc ctgttccgtg atgcacgaag ctctgcacaa cactacacc 1320
cagaagtcgc tgagcctctc actggga 1347

<210> 9

<211> 113

15 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 9

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

35 <210> 10

<211> 123

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

40 <223> Синтетическая конструкция

<400> 10

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ile Ser
45 20 25 30
Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Arg Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая конструкция
 5 <400> 15
 Leu Ile Tyr Arg Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
 5 10 15
 <210> 16
 <211> 15
 10 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая конструкция
 <400> 16
 15 Ala Arg Thr Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Asn Trp Phe Asp Pro
 5 10 15
 <210> 17
 <211> 471
 <212> БЕЛОК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая конструкция
 <400> 17
 Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
 25 5 10 15
 Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
 20 25 30
 Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45
 30 Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 65 70 75 80
 Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 35 85 90 95
 Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110
 Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125
 40 Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
 45 165 170 175
 Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
 180 185 190
 His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile

RU 2791034 C2

195 200 205
 Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
 210 215 220
 Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
 5 225 230 235 240
 Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255
 Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
 260 265 270
 10 Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285
 Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
 290 295 300
 Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 15 305 310 315 320
 Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
 325 330 335
 Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
 340 345 350
 20 Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
 355 360 365
 Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
 370 375 380
 Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
 25 385 390 395 400
 Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415
 Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
 420 425 430
 30 Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
 435 440 445
 Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu Ala Ala Ala Asp
 450 455 460
 Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 35 465 470
 <210> 18
 <211> 820
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Синтетическая конструкция
 <400> 18
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 5 10 15
 45 Gly Ser Thr Gly Asp His His His His His His Asp Ala His Lys Ser
 20 25 30
 Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala
 35 40 45

RU 2 791 034 C2

Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu
 50 55 60
 Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys
 65 70 75 80
 5 Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu
 85 90 95
 Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly
 100 105 110
 10 Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys
 115 120 125
 Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg
 130 135 140
 Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr
 145 150 155 160
 15 Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe
 165 170 175
 Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe
 180 185 190
 20 Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys
 195 200 205
 Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg
 210 215 220
 Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala
 225 230 235 240
 25 Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala
 245 250 255
 Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys
 260 265 270
 30 Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala
 275 280 285
 Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu
 290 295 300
 Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val
 305 310 315 320
 35 Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe
 325 330 335
 Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val
 340 345 350
 40 Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr
 355 360 365
 Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu
 370 375 380
 Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val
 385 390 395 400
 45 Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys
 405 410 415
 Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn
 420 425 430

RU 2791034 C2

Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro
435 440 445
Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys
450 455 460
5 Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu
465 470 475 480
Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val
485 490 495
10 Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg
500 505 510
Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu
515 520 525
Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser
530 535 540
15 Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val
545 550 555 560
Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp
565 570 575
20 Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu
580 585 590
Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala
595 600 605
Ala Leu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
610 615 620
25 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
625 630 635 640
Gly Arg Ala Ala Pro Met Gly Gly Pro Glu Leu Ala Gln His Glu Glu
645 650 655
Leu Thr Leu Leu Phe His Gly Thr Leu Gln Leu Gly Gln Ala Leu Asn
30 660 665 670
Gly Val Tyr Arg Thr Thr Glu Gly Arg Leu Thr Lys Ala Arg Asn Ser
675 680 685
Leu Gly Leu Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu Leu Gly Gln Glu Val Ser
690 695 700
35 Arg Gly Arg Asp Ala Ala Gln Glu Leu Arg Ala Ser Leu Leu Glu Thr
705 710 715 720
Gln Met Glu Glu Asp Ile Leu Gln Leu Gln Ala Glu Ala Thr Ala Glu
725 730 735
Val Leu Gly Glu Val Ala Gln Ala Gln Lys Val Leu Arg Asp Ser Val
40 740 745 750
Gln Arg Leu Glu Val Gln Leu Arg Ser Ala Trp Leu Gly Pro Ala Tyr
755 760 765
Arg Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala His Ala Asp Lys Gln Ser His Ile
770 775 780
45 Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg Gln Arg Arg Glu Met Val
785 790 795 800
Ala Gln Gln His Arg Leu Arg Gln Ile Gln Glu Arg Leu His Thr Ala
805 810 815

Ala Leu Pro Ala
820
<210> 19
<211> 455
5 <212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Синтетическая конструкция
<400> 19

10 Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
5 10 15
Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
20 25 30
Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
15 35 40 45
Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
50 55 60
Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
65 70 75 80
20 Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
85 90 95
Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
100 105 110
Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
25 115 120 125
Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
130 135 140
Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
145 150 155 160
30 Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
165 170 175
His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
180 185 190
Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
35 195 200 205
Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
210 215 220
Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
225 230 235 240
40 Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
245 250 255
Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
260 265 270
Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
45 275 280 285
Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
290 295 300
Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu

Thr Ala Ala Leu Pro Ala
 180
 <210> 21
 <211> 220
 5 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая конструкция
 <400> 21
 10 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 15 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Met Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 20 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 25 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 30 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 35 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 22
 <211> 220
 40 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая конструкция
 <400> 22
 45 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

RU 2791034 C2

Ala Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Met Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
5 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
10 Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
15 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
20 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220
25 <210> 23
<211> 220
<212> БЕЛЮК
<213> Искусственная последовательность
<220>
30 <223> Синтетическая конструкция
<400> 23
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
5 10 15
35 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Met Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
40 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
45 Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая конструкция

5 <400> 25
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 10 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Met Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 15 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Ile Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 20 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 25 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 30 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

(57) Формула изобретения

1. Антитело, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека, содержащее определяющие комплементарность области легкой цепи, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 и определяющие комплементарность области тяжелой цепи, HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

LCDR1 имеет аминокислотную последовательность RSSQSLLDSDDGNTYLD (SEQ ID NO: 11),

LCDR2 имеет аминокислотную последовательность YMLSYRAS (SEQ ID NO: 12),

LCDR3 имеет аминокислотную последовательность MQRIEFPLT (SEQ ID NO: 13),

HCDR1 имеет аминокислотную последовательность TFSGFSLISISGVGVG (SEQ ID NO: 14),

HCDR2 имеет аминокислотную последовательность LIYRNDDKRYSPSLKS (SEQ ID NO: 15), и

HCDR3 имеет аминокислотную последовательность ARTYSSGWYGNWFDP (SEQ ID

NO: 16).

2. Антитело по п.1, содержащее переменную область легкой цепи (LCVR), где LCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

3. Антитело по п.1, содержащее переменную область тяжелой цепи (HCVR), где
5 HCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

4. Антитело по любому из пп.1-3, где

LCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и

HCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

5. Антитело по любому из пп.1-4, где антитело представляет собой изотип IgG4.

10 6. Антитело, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека, содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), где

LC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 21, 22, 23, 24 и 25, и

HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

15 7. Антитело по п.6, где

LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и

HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

8. Антитело по п.6, где

LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и

20 HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

9. Антитело по п.6, где

LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

10. Антитело по п.6, где

25 LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

11. Антитело по п.6, где

LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и

HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

30 12. Антитело по п.6, где

LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и

HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

13. Антитело, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека, полученное
35 путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу кДНК, где молекула кДНК кодирует полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 и 6, в таких условиях, что полипептиды экспрессируются, и выделения антитела.

14. Антитело, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека, полученное
40 путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу кДНК, где молекула кДНК кодирует антитело, содержащее аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 21 и 6, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделения антитела.

15. Антитело, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека, полученное
45 путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу кДНК, где молекула кДНК кодирует антитело, содержащее аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22 и 6, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделения антитела.

16. Антитело, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека, полученное
путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу кДНК, где молекула кДНК кодирует антитело, содержащее аминокислотные последовательности

SEQ ID NO: 23 и 6, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделения антитела.

17. Антитело, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека, полученное путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу кДНК, где молекула кДНК кодирует антитело, содержащее аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 6, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделения антитела.

18. Антитело, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека, полученное путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу кДНК, где молекула кДНК кодирует антитело, содержащее аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25 и 6, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделения антитела.

19. Антитело, которое связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека, полученное путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей по меньшей мере две молекулы кДНК, где первая молекула кДНК кодирует легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 21, 22, 23, 24 и 25, и вторая молекула кДНК кодирует тяжелую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделения антитела.

20. Антитело по любому из пп.1-19, где указанное антитело связывает и нейтрализует комплекс ANGPTL3/8 человека в стандартном анализе активности липопротеинлипазы с EC₅₀ 3,0 нМ или менее.

21. Антитело по любому из пп.1-19, где антитело связывается с комплексом ANGPTL3/8 человека с константой диссоциации менее или равной 1×10^{-6} М.

22. Антитело по любому из пп.1-19, где антитело связывается с ANGPTL3 человека и ANGPTL8 человека с константой диссоциации более 1×10^{-6} М.

23. Антитело по любому из пп.1-19, где указанное антитело демонстрирует положительное связывание с комплексом ANGPTL3/8 человека зависимым от концентрации образом и не демонстрирует детектируемое связывание с ANGPTL3 человека и ANGPTL8 человека вплоть до концентрации антигена, равной 100 нМ.

24. Антитело по любому из пп.1-19, где антитело снижает уровень триглицеридов *in vivo* по меньшей мере на 50% по сравнению с контролем IgG при дозе 10 мг/кг через 14 дней после введения дозы.

25. Фармацевтическая композиция для снижения уровня триглицеридов, содержащая указанное антитело по любому из пп.1-24 и приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

26. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 и 6, где клетка способна экспрессировать антитело по п.13.

27. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 21 и 6, где клетка способна экспрессировать антитело по п.14.

28. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22 и 6, где клетка способна экспрессировать антитело по п.15.

29. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 6, где клетка способна экспрессировать антитело по п.16.

5 30. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 6, где клетка способна экспрессировать антитело по п.17.

10 31. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25 и 6, где клетка способна экспрессировать антитело по п.18.

32. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего по пп.26-31 в условиях, при которых происходит экспрессия антитела, и выделение экспрессированного антитела.

15 33. Способ лечения заболевания, связанного с метаболизмом липидов, выбранного из группы, состоящей из: атеросклеротического сердечно-сосудистого заболевания (АССЗ), диабета, ожирения, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), хронической почечной недостаточности (ХПН) или гипертриглицеридемии или их комбинации, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества указанного антитела по любому из пп.1-24.

20 34. Способ снижения уровня триглицеридов, включающий введение пациенту эффективного количества указанного антитела по любому из пп.1-24.

35. Антитело по любому из пп.1-24 для применения при лечении АССЗ, диабета, ожирения, НАСГ, ХПН или гипертриглицеридемии, или их комбинации.

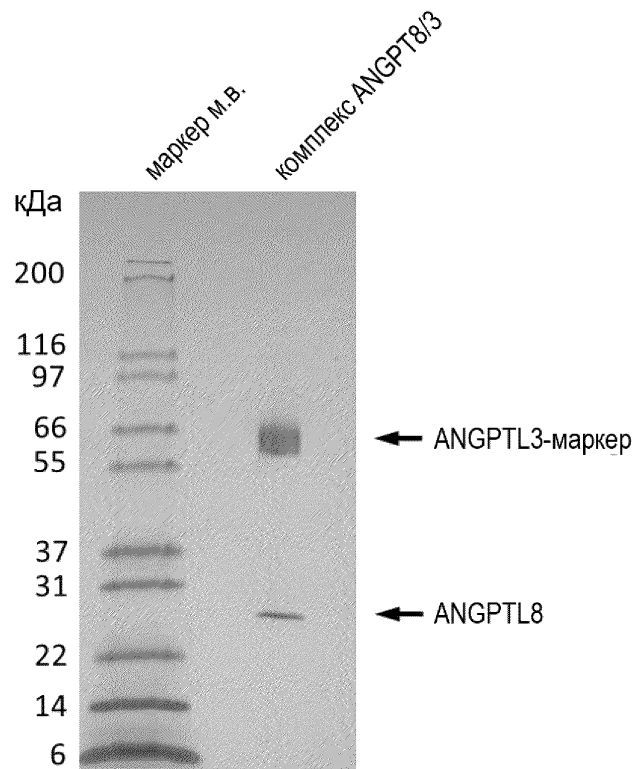
25 36. Фармацевтическая композиция для применения при лечении АССЗ, диабета, ожирения, НАСГ, ХПН или гипертриглицеридемии, или их комбинации, содержащая эффективное количество указанного антитела по любому из пп.1-24.

30

35

40

45



4-20% TG TGX гель, окрашенный Кумасси

Фиг. 1